



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

“Modulación de la consolidación de la memoria por la desacetilasa HDAC3 y su vínculo con el factor de transcripción NF- κ B en el ratón *Mus musculus*”

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

Lic. Agustina Denise Robles

Director de tesis: Dr. Arturo Romano

Consejera de Estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE – UBA - CONICET). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2025

Resumen

Modulación de la consolidación de la memoria por la desacetilasa HDAC3 y su vínculo con el factor de transcripción NF-kB en el ratón *Mus musculus*

La desacetilasa HDAC3 ha sido propuesta como un potente modulador negativo de la memoria. Además de estar vinculada a la desacetilación de histonas, se ha visto implicada en la inactivación del factor de transcripción NF-kB. Durante la fase de consolidación es necesaria la síntesis de proteínas y de ARN que ocurre en dos etapas, la primera durante o inmediatamente después de la adquisición, y la segunda entre 4 y 8 horas más tarde. Hasta el momento, no se ha estudiado el vínculo funcional entre HDAC3 y NF-kB *in vivo* durante la formación de una memoria, ni tampoco la dinámica temporal de su actividad durante la consolidación en ratones. En el presente trabajo se estudió la función de ambas proteínas durante la ventana de consolidación mediante experimentos farmacológicos en los que se inyectaron inhibidores específicos a distintos tiempos luego del aprendizaje en la tarea de Reconocimiento de Objeto Novedoso. Nuestros hallazgos muestran que la inhibición sistémica de HDAC3 con RGFP966 tiene un claro efecto facilitador de la memoria, evaluada a los 7 días, cuando la inyección ocurre inmediatamente o 6 horas después de un entrenamiento débil, mientras que la administración a las 3 o 9 horas no tiene efecto. Por el contrario, la administración sistémica del mismo inhibidor no tuvo efecto sobre una memoria de condicionamiento de miedo. Si bien el tratamiento no produjo cambios en la acetilación de la subunidad p65 de NF-kB en el hipocampo ni tampoco mostró cambios en la abundancia general de p65 en el núcleo en distintas regiones del cerebro, se observaron indicios de una mayor acumulación de p65 en puntas dentro del núcleo en algunas células. Por otro lado, la inhibición localizada de NF-kB con BAY 11-7082 en el hipocampo dorsal produce un déficit en la memoria cuando el inhibidor es inyectado inmediatamente o 6 horas después de un entrenamiento fuerte, pero no 3 horas después. También se observó que este inhibidor reduce el número de células con marca positiva para p65 en la región CA1 del hipocampo de animales entrenados, 45 minutos después de la inyección. Estos resultados apoyan la hipótesis de que HDAC3 actúa como modulador negativo de la memoria, posiblemente interfiriendo con un patrón bifásico de expresión génica necesario para la consolidación, en el cual el factor de transcripción NF-kB cumple un rol clave.

Palabras clave:

HDAC3; NF-kB; consolidación; memoria de reconocimiento de objeto novedoso

Abstract

Modulation of memory consolidation by HDAC3 deacetylase and its link to the transcription factor NF- κ B in the mouse *Mus musculus*

HDAC3 deacetylase has been proposed as a potent negative modulator of memory. In addition to being linked to histone deacetylation, it has been implicated in the inactivation of the NF- κ B transcription factor. During the consolidation phase, protein and RNA synthesis is necessary, which occurs in two stages: the first during or immediately after acquisition, and the second between 4 and 8 hours later. To date, the functional link between HDAC3 and NF- κ B in vivo during memory formation has not been studied, nor has the temporal dynamics of their activity during consolidation in mice. In the present study, the function of both proteins during the consolidation window was studied using pharmacological experiments in which specific inhibitors were injected at different times after learning in the Novel Object Recognition task. Our findings show that systemic inhibition of HDAC3 with RGFP966 has a clear memory-facilitating effect, assessed at 7 days, when the injection occurs immediately or 6 hours after weak training, while administration at 3 or 9 hours has no effect. In contrast, systemic administration of the same inhibitor had no effect on fear conditioning memory. Although treatment did not produce changes in the acetylation of the p65 subunit of NF- κ B in the hippocampus, nor did it show changes in the overall abundance of p65 in the nucleus in different regions of the brain, there were signs of increased accumulation of p65 in puncta within the nucleus in some cells. On the other hand, localized inhibition of NF- κ B with BAY 11-7082 in the dorsal hippocampus produces a memory deficit when the inhibitor is injected immediately or 6 hours after intensive training, but not 3 hours later. This inhibitor was also found to reduce the number of p65-positive cells in the CA1 region of the hippocampus of trained animals 45 minutes after injection. These results support the hypothesis that HDAC3 acts as a negative modulator of memory, possibly interfering with a biphasic pattern of gene expression necessary for consolidation, in which the transcription factor NF- κ B plays a key role.

Key words:

HDAC3; NF- κ B; consolidation; novel object recognition memory

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
1. Introducción	7
1.1 Consolidación de la memoria.....	8
1.2 Epigenética y memoria	9
1.3 Rol de HDAC3 en la memoria.....	11
1.4 Rol de NF- κ B en la memoria.....	12
1.5 Relación entre HDAC3 y NF- κ B.....	13
1.6 BDNF y Zif268 en la memoria.....	14
1.7 Fases de consolidación	15
1.8 Reconocimiento de Objeto Novedoso.....	16
1.8.1 Estructuras involucradas en la memoria de reconocimiento.....	17
1.8.1.1 Corteza Perirrinal.....	17
1.8.1.2 Hipocampo	17
1.8.1.3 Corteza Prefrontal.....	18
1.8.1.4 Corteza Retrosplenial	18
Objetivos e Hipótesis	19
Hipótesis	19
Objetivos	19
Objetivos específicos	19
2. Materiales y métodos	20
2.1 Animales.....	21
2.2 Procedimientos comportamentales.....	21
2.2.1 Tareas de reconocimiento de objeto	21
2.2.1.1 Dispositivo	21
2.2.1.2 Sesiones.....	22
2.2.1.3 Análisis	23
2.2.2 Tarea de Condicionamiento de Miedo.....	23
2.2.2.1 Dispositivo	23
2.2.2.2 Sesiones.....	24
2.2.2.3 Análisis	25
2.3 Cirugía estereotáxica.....	25
2.3.1 Procedimiento quirúrgico	25

2.3.2 Analgesia	26
2.4 Drogas y vías de administración	27
2.5 Determinación de los sitios de inyección	28
2.6 Extractos enriquecidos en proteínas.....	30
2.6.1 Extractos totales	30
2.6.2 Extractos fraccionados.....	30
2.7 Western blot	31
2.7.1 Cuantificación de proteínas.....	31
2.7.2 SDS-PAGE	31
2.7.3 Incubación con anticuerpos	31
2.8 Inmunofluorescencia	32
2.8.1 Obtención del tejido	32
2.8.2 Incubación	33
2.8.3 Adquisición y análisis de imágenes.....	34
2.9 Análisis de datos	36
2.9.1 Experimentos moleculares.....	36
2.9.2 Experimentos de inmunofluorescencia.....	36
2.9.3 Experimentos comportamentales.....	37
3. Resultados.....	38
Estudio de los cambios moleculares producidos durante la ventana temporal de la consolidación.....	38
4. Resultados.....	44
Participación de HDAC3 en la consolidación de la memoria.....	44
4.1 Efecto del inhibidor RGFP966 sobre la memoria	45
4.1.1 Reconocimiento de Objeto Novedoso	45
4.1.2 Miedo Condicionado	53
4.2 Nivel de acetilación de p65 y expresión de proteínas target de NF-kB y HDAC3.....	58
4.3 Efecto de la inhibición de HDAC3 sobre NF-kB. Análisis inmunohistoquímico.....	62
5. Resultados.....	72
Estudio farmacológico de la participación de NF-kB en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objeto novedoso	72
5.1 Efecto de la inhibición de NF-kB sobre la memoria de reconocimiento de objeto	73
5.2 Análisis inmunohistoquímico del efecto de la inyección localizada de BAY 11-7082 ..	81
6. Discusión	86
6.1 Estudio de los cambios moleculares producidos durante la ventana de consolidación	87

6.2 Participación de HDAC3 en la consolidación de la memoria.....	89
6.2.1 Efecto de la inhibición de HDAC sobre la memoria	89
6.2.2 Nivel de acetilación de p65 y expresión de proteínas blanco de NF-kB y HDAC390	
6.2.3 Análisis inmunohistoquímico del efecto de la inhibición de HDAC3 sobre NF-kB	92
6.3 Estudio farmacológico de la participación de NF-kB en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objeto novedoso	96
6.3.1 Efecto de la inhibición de NF-kB sobre la memoria de reconocimiento de objeto	96
6.3.2 Análisis inmunohistoquímico del efecto de la inyección localizada de BAY 11-7082	97
Conclusiones	99
Material suplementario.....	100
Referencias.....	137

1. Introducción

1.1 Consolidación de la memoria

La memoria es la retención de información, adquirida a través del aprendizaje, a lo largo del tiempo. Ésta puede clasificarse según su duración en memoria de corto o largo término, y sólo ésta última depende de expresión génica y síntesis de proteínas que permiten su posterior evocación (Alberini 2009).

Luego de la adquisición, la información se encuentra almacenada en un estado lábil y, con el paso del tiempo, se estabiliza mediante un proceso conocido como *consolidación* de la memoria (McGaugh 2000). Esta fase, también conocida como *consolidación sináptica o celular*, abarca desde algunos minutos hasta algunas horas después de la adquisición e involucra cambios moleculares y fisiológicos a nivel de cada célula que participa en la codificación de la información, permitiendo el establecimiento de un circuito neuronal -o engrama- en el que se almacenará la memoria (Dudai 2004; Josselyn et al., 2015).

Durante un evento de aprendizaje, distintos estímulos activan vías de señalización que desencadenan expresión génica y síntesis de proteínas. Las proteínas sintetizadas modifican la fisiología celular alterando la eficacia sináptica y favoreciendo el establecimiento de un circuito neuronal que codifica una memoria (Kandel 2001; McGaugh 2000). En este proceso participan mecanismos de remodelación de la cromatina, incluyendo mecanismos epigenéticos, y distintos factores de transcripción (Zovkic et al., 2013).

Una vez consolidada, la memoria se vuelve resistente a interrupciones. Sin embargo, bajo ciertas condiciones ésta puede labilizarse nuevamente, volviendo transitoriamente a un estado inestable que requiere otro proceso de estabilización. A este proceso se lo conoce como *reconsolidación* y es disparado por determinados recordatorios de la experiencia aprendida (Haubrich & Nader 2018). Al igual que para la consolidación, durante esta fase se puede intervenir el proceso de reestabilización alterando la memoria final.

Durante la consolidación, mientras la memoria aún se encuentra en un estado lábil, es posible realizar intervenciones que alteran la persistencia ([Figura 1](#)). Clásicamente se ha demostrado que ciertos tipos de interferencia aplicados luego del aprendizaje pueden inducir amnesia retrógrada, reduciendo o incluso eliminando la expresión de la memoria. Entre estas intervenciones se incluyen procedimientos como shocks electroconvulsivos (McGaugh 1966), y fármacos que afectan la síntesis de proteínas o de ARN.

Sin embargo, no todas las interferencias post-entrenamiento deterioran la memoria; por el contrario, algunas pueden promoverla. Diversos estudios han mostrado que ciertas intervenciones después de la adquisición como la administración de drogas convulsivantes o

estimulantes del sistema nervioso central (McGaugh 1973) o la exposición a un estímulo novedoso (Moncada & Viola 2007), pueden facilitar la consolidación y dar lugar a hipermnesia, es decir, una mejora de la retención más allá de lo que se observaría sin la intervención.

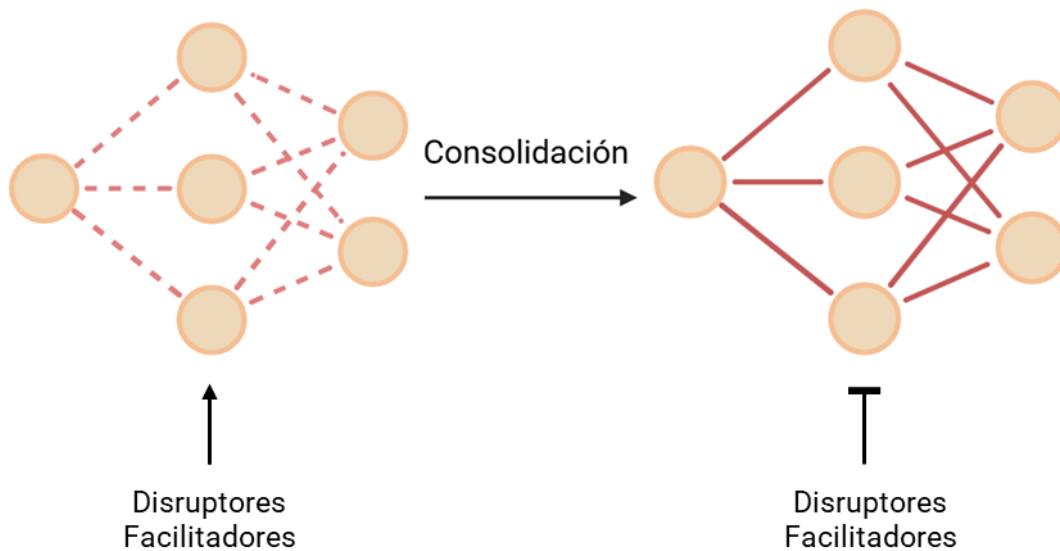


Figura 1. Consolidación de la memoria. Luego de la adquisición la memoria se encuentra en un estado lábil en el cual es susceptible a modificaciones que la disrumen o facilitan. El proceso de consolidación sináptica produce cambios en las conexiones sinápticas de las neuronas que forman parte del engrama volviéndola estable y resistente a disrupciones. Created in <https://BioRender.com>

1.2 Epigenética y memoria

La modificación en los patrones de expresión génica y subsecuente síntesis de proteínas dependen no solo de la presencia de factores de transcripción, sino también de mecanismos epigenéticos. Entre los mecanismos epigenéticos más estudiados se encuentran la metilación del ADN y las modificaciones post-traduccionales de histonas, aunque en los últimos años también han cobrado relevancia otros mecanismos de remodelación de la cromatina como el reposicionamiento nucleosomal (Vogel-Ciernia et al., 2013) y la regulación por microARNs (Konopka et al., 2010).

Dentro de las modificaciones de histonas se encuentra la acetilación, que consiste en la adición de un grupo acetilo a un residuo de Lisina en la porción N-terminal o “cola” de las histonas. Esta reacción es catalizada por la familia de enzimas histona acetil-transferasas (HATs), y produce la relajación o apertura de la cromatina debido a que la adición del grupo

acetilo neutraliza la carga positiva de los residuos de lisina, haciendo que las histonas pierdan afinidad por el ADN cargado negativamente. La reacción de de-acetilación es catalizada por enzimas histona desacetilasas (HDACs), que remueven el grupo acetilo promoviendo la compactación de la cromatina.

Teniendo en cuenta el efecto de la acetilación de histonas sobre la estructura de la cromatina y considerando que la consolidación de la memoria requiere de transcripción activa, se puede predecir que favorecer un estado más acetilado favorecerá la expresión génica en un contexto de formación de una memoria. Esto fue puesto a prueba en un trabajo fundacional de Levenson et al. en el cual, luego de demostrar que la inhibición general de HDACs con TSA produce un aumento en el LTP, probaron el efecto del inhibidor Butirato de Sodio (otro inhibidor general de HDACs) sobre la consolidación de una memoria de miedo en la tarea de Fear Conditioning y encontraron que los animales inyectados con la droga presentaban un mayor porcentaje de freezing respecto de los controles inyectados con salina (Levenson et al., 2004). Por el contrario, se ha observado que modelos de ratones con mutaciones o deleciones de CBP -una HAT- presentan alteraciones en la memoria de reconocimiento de objeto y en la memoria espacial (Korzus et al., 2004), o en memorias de miedo (Alarcón et al., 2004).

Posteriormente surgieron múltiples estudios en los cuales se estudió el efecto de la inhibición de HDACs sobre la memoria, pero resulta de particular interés uno en el cual observan que la administración sistémica de Butirato de Sodio no solo facilita la consolidación de una memoria de reconocimiento de objeto, sino que ésta persiste más allá de lo que duraría una memoria convencional (Stefanko et al., 2009). En este sentido, trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que la acetilación de histonas es un mecanismo reclutado durante la formación de memorias persistentes. Por ejemplo, un entrenamiento fuerte de 30 ensayos en el paradigma de memoria contexto-señal en el cangrejo *Neohelice granulata* produce un aumento en la acetilación de la histona H3 mientras que un entrenamiento estándar de 15 ensayos, que produce una memoria de largo término pero que no persiste tanto en el tiempo, no lo hace (Federman et al., 2009). Por otro lado, en ratones se observaron resultados similares utilizando el paradigma de *Reconocimiento de Objeto Novedoso* (NOR por sus siglas en inglés). Un entrenamiento fuerte que genera una memoria que persiste al menos 7 días genera un aumento en la acetilación de la histona H3 en el hipocampo, mientras que un entrenamiento estándar, que genera memoria a las 24 horas pero no a los 7 días, no produce dicho aumento. Asimismo, la inhibición de CBP/p300 -variantes de HAT- no afecta la consolidación de la memoria dado que ésta aparece inalterada a las 24hs, pero impide la persistencia de la misma a los 7 días (Federman et al., 2013).

1.3 Rol de HDAC3 en la memoria

Dentro de las HDACs de clase I, que se caracterizan por su localización nuclear, se encuentra HDAC3 que es la de mayor expresión en el cerebro (Broide et al., 2007). A diferencia del resto de los miembros de esta clase, HDAC3 puede translocarse entre el núcleo y el citoplasma. En el núcleo se encuentra formando parte de un complejo de proteínas co-represoras -NCoR y SMRT- sin las cuales no puede ejercer su actividad.

Diversos trabajos en ratones muestran, mediante el uso de herramientas genéticas, que la eliminación de HDAC3 o de su función en regiones específicas del cerebro tiene un efecto facilitador de la memoria. Por ejemplo, la intervención en el hipocampo dorsal, ya sea mediante la delección de HDAC3 o la sobreexpresión de una variante mutante sin actividad catalítica, facilita la consolidación en la tarea de *Localización de Objeto* (NOL por sus siglas en inglés) y de *Condicionamiento de Miedo Contextual* (McQuown et al., 2011; Kwapis et al., 2017), así como también facilita la extinción del *Condicionamiento de Preferencia de Lugar* (CPP) inducido por cocaína (Alaghband et al., 2017). Por otro lado, esta intervención en el núcleo accumbens promueve la consolidación de CPP (Rogge et al., 2013).

Experimentos farmacológicos también han mostrado resultados similares en cuanto a la facilitación de la memoria. La inhibición sistémica de HDAC3 mediante el uso del inhibidor específico RGFP966 promueve la consolidación de la memoria en los paradigmas de NOL y NOR, así como también la extinción de CPP inducido por cocaína (Malvaez et al., 2013).

Las evidencias que hay hasta el momento indican que la acción represora que tiene HDAC3 está dada principalmente por la desacetilación de histonas en regiones promotoras de genes relacionados con la actividad y plasticidad neuronal. Por un lado, se ha observado de manera consistente que la eliminación de la actividad de HDAC3 tanto de manera farmacológica como genética, produce un aumento en la acetilación de histonas -principalmente H4K8- tanto en ratones (McQuown et al., 2011; Malvaez et al., 2013; Rogge et al., 2013; Kwapis et al., 2017) como en cultivos de células HEK-293 y SH-SY5Y (Sartor et al., 2019). Asimismo, experimentos de ChIP muestran que HDAC3 se encuentra en regiones promotoras de genes como *Bdnf*, *cFos*, *Nr4a2* y *Npas*, y que su inhibición no solo reduce su presencia, sino que también aumenta la acetilación en dichos sitios (Malvaez et al., 2013; Rogge et al., 2013; Kwapis et al., 2017; Louis Sam Titus et al., 2019).

Por otro lado, mediante el uso de registros electrofisiológicos, se observó que la inhibición de HDAC3 con la droga RGFP966 en secciones de cerebro de ratón produce un aumento en la

magnitud del LTP en las sinapsis de la vía perforante con las células granulares del giro dentado (Franklin et al., 2014).

En conjunto, todos estos antecedentes muestran que HDAC3 tiene una función represora mediante la desacetilación de histonas en regiones promotoras de genes relacionados con la plasticidad neuronal.

1.4 Rol de NF- κ B en la memoria

NF- κ B es un factor de transcripción altamente conservado y de expresión ubicua, que ha sido relacionado principalmente con respuestas inflamatorias y la regulación de la expresión de distintas proteínas relacionadas con el sistema inmune. Sin embargo, se ha descubierto que en el sistema nervioso, particularmente en neuronas, actúa como un detector de actividad sináptica en las dendritas, así como regulador transcripcional de genes relacionados con la plasticidad y la memoria. Algunos de estos genes son CamKII α , Zif268, C/EBP, BDNF, la subunidad α de PKA, entre otros (de la Fuente et al., 2015).

NF- κ B es un dímero compuesto por proteínas de la familia Rel: RelA (o p65), RelB, c-Rel, p50 y p52. La forma más frecuentemente encontrada en las células es el heterodímero p65/p50, el cual está involucrado en la vía canónica de activación. Básicamente, p65/p50 (de ahora en adelante, NF- κ B) se encuentra en el citoplasma unido a una proteína inhibidora I κ B -de la cual hay tres isoformas- que enmascara la secuencia de localización nuclear (NLS). Frente a un estímulo, I κ B es fosforilada por una I κ B-kinasa (IKK) y esta fosforilación desencadena su degradación mediada por el sistema ubiquitina-proteasoma. Una vez que el dímero de NF- κ B está libre, se transloca al núcleo donde se une a regiones del ADN que contienen el elemento κ B y favorece la transcripción. Por último, se ha reportado que p65 sufre modificaciones post-traduccionales -específicamente fosforilaciones y acetilaciones- que aumentan su actividad transcripcional (Moynagh 2005).

Las primeras evidencias de la participación de NF- κ B en procesos de memoria se encontraron en experimentos con el cangrejo *Neohelice granulata*, donde un entrenamiento fuerte en el paradigma de memoria contexto-señal produce un aumento en su actividad (Freudenthal & Romano 2000), mientras que su inhibición mediante una inyección sistémica de Sulfasalazina impide la formación de la memoria (Merlo et al., 2002).

Posteriormente, experimentos en ratones mostraron que 45 minutos luego del entrenamiento hay un aumento en la actividad de NF- κ B en el hipocampo en tareas como Evitación Inhibitoria, Condicionamiento de Miedo y Reconocimiento de Objeto Novedoso (Freudenthal et al., 2005; de la Fuente et al., 2014; Zalcman et al., 2015). En estos trabajos también se

observó que la inhibición de NF- κ B mediante la inyección localizada de Sulfasalazina o un oligonucleótido con la secuencia consenso κ B (κ B-Decoy) tiene efecto amnésico sobre la memoria de largo término (Federman et al., 2013).

1.5 Relación entre HDAC3 y NF- κ B

Algunos trabajos realizados en cultivos celulares proponen una relación funcional entre el factor de transcripción NF- κ B y la desacetilasa HDAC3.

Como se mencionó anteriormente, la subunidad p65 de NF- κ B está sujeta a distintas modificaciones post-traduccionales, entre ellas, acetilaciones. Estas acetilaciones pueden ocurrir en distintos residuos de lisina, y se ha propuesto que una vez que el heterodímero p50/p65 ingresa al núcleo forma un complejo con la HAT CBP/p300, la cual acetila a p65 aumentando su actividad transcripcional, y también acetila histonas de las regiones promotoras donde se une NF- κ B aumentando la accesibilidad de la cromatina. Por el contrario, se encontró que HDAC3 -pero no otras HDACs nucleares como HDAC1 y 2- desacetila a p65, promoviendo la unión a la proteína inhibidora I κ B y su posterior expulsión al citoplasma contribuyendo así a la terminación de la señal (Chen et al., 2001; [Figura 2](#)).

Hasta la fecha, hay un solo trabajo en el cual se estudia esta relación funcional durante la formación de una memoria de miedo en ratas. Los resultados muestran que 30 minutos después del aprendizaje hay un aumento en la acetilación total de p65 y de su interacción con la HAT CBP en la amígdala, acompañado por un aumento en la actividad de unión al ADN 2 horas después del entrenamiento. Al estudiar la interacción entre p65 y HDAC3, se encontró un aumento a las 2 horas del entrenamiento, pudiendo tratarse del inicio de la terminación de la señal de NF- κ B. Por último, la administración de TSA en la amígdala extendió la acetilación de p65 hasta 6 horas después del entrenamiento, impidió el aumento en la interacción entre p65 y HDAC3, y produjo una mayor respuesta de miedo a nivel comportamental (Yeh et al., 2004).

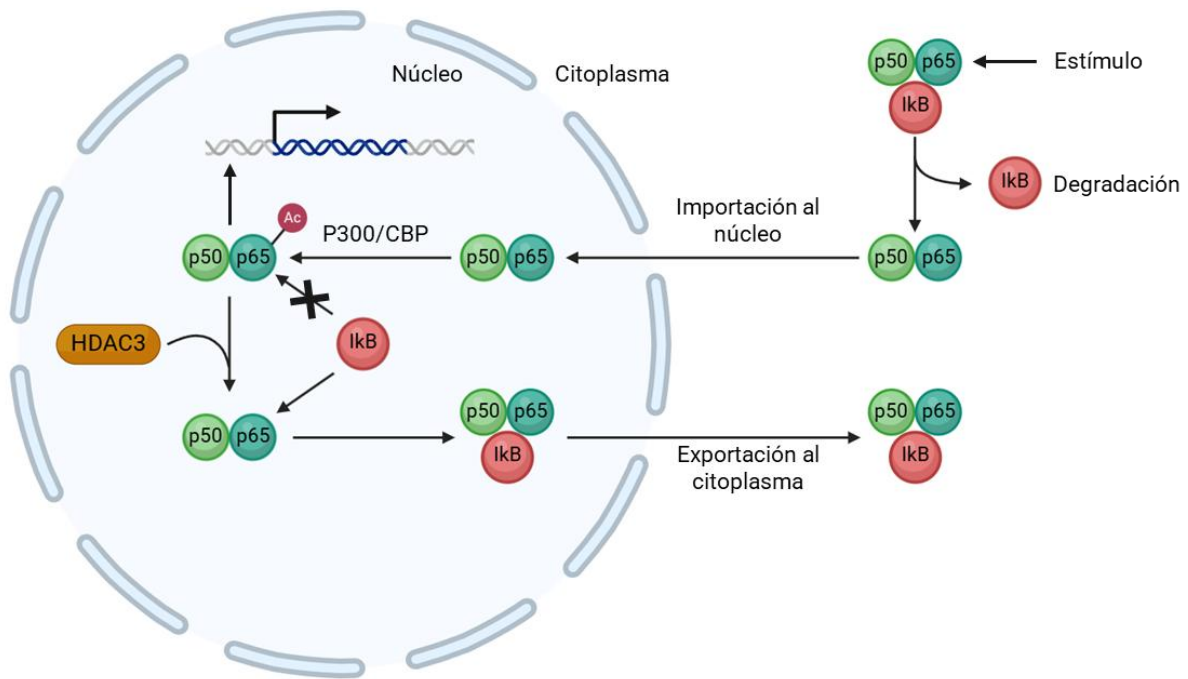


Figura 2. Modelo propuesto sobre la participación de HDAC3 en la vía de NF-κB. La proteína inhibidora IκB es degradada en respuesta a un estímulo permitiendo la translocación de NF-κB al núcleo. Allí se acetila aumentando su actividad de unión al ADN e impidiendo la unión de IκB. HDAC3 remueve la acetilación de p65, promoviendo la unión de IκB y su posterior expulsión al citoplasma. Adaptado de Chen & Greene 2003. Created in <https://BioRender.com>

1.6 BDNF y Zif268 en la memoria

Zif268 es un gen temprano que es activado luego de la inducción de LTP, y contribuye en su mantenimiento (Veyrac et al., 2014). Este hallazgo llevó a estudiar su función en relación al aprendizaje y la memoria donde se determinó que la expresión es necesaria para la consolidación tanto de memorias de miedo (Maddox et al., 2010) como de reconocimiento de objeto (Zalcman et al., 2015). En este último trabajo, no solo se observó un aumento en la expresión de Zif268 en respuesta al entrenamiento en la tarea de NOR, sino que éste depende de la actividad de NF-κB dado que la administración del inhibidor κB-Decoy impide dicho aumento. Por otro lado, un trabajo en aves reportó que la inhibición de HDAC3 con el inhibidor RGFP966 produce un aumento en la expresión del gen temprano zenk (homólogo a Zif268 en aves), indicando un posible vínculo regulatorio entre ambas (Phan et al., 2017).

BDNF es una proteína relacionada con la función neuronal y es considerada un gen tardío dentro del proceso de consolidación de la memoria. Se ha observado que BDNF no solo es necesario para la consolidación de la memoria, sino que también cumple un rol clave en su persistencia (Bekinschtein et al., 2008). Su regulación ha sido vinculada a la función de

HDAC3 que actúa como un represor de su expresión. No solo HDAC3 se encuentra en la región promotora de BDNF, sino que su inhibición produce un aumento en la acetilación de histonas del promotor, así como de la expresión tanto del mensajero como de la proteína (Sartor et al., 2019; Louis Sam Titus et al., 2019). También se ha encontrado que la vía de señalización activada por la interacción de BDNF con el receptor TrkB tiene un efecto inductor sobre el factor de transcripción NF- κ B, quien a su vez puede promover la expresión de BDNF (Lima Giacobbo et. al., 2019).

Dado que ambos genes han sido asociados tanto a la actividad de NF- κ B como a la función de HDAC3, resultan buenos candidatos para evaluar los efectos río abajo de cada una de estas vías de señalización.

1.7 Fases de consolidación

Como se mencionó anteriormente, durante la consolidación ocurren distintos procesos moleculares como modificaciones epigenéticas, expresión génica y síntesis de proteínas, y la interrupción de cualquiera de ellos puede disrumpir la formación de la memoria.

Ahora bien, se ha observado en múltiples ocasiones que el patrón de expresión génica y síntesis de proteínas no es continuo a lo largo del tiempo, sino que presenta una modalidad bifásica. Trabajos de fines de la década del 70 y principios del 80 ya muestran que la síntesis de proteínas durante la consolidación de memorias aversivas en ratas presenta un patrón bifásico, donde la primer ola de síntesis ocurre durante la primer hora después del entrenamiento y la segunda alrededor de 8 horas más tarde (Grecksch & Matthies 1980). En ese mismo trabajo también observaron que la inhibición de la síntesis de proteínas mediante la inyección localizada de Anisomicina en el hipocampo cerca del entrenamiento o entre 4 y 6 horas después produce un déficit en la memoria, mientras que en un momento intermedio (de 1 a 3 horas después del entrenamiento) no tiene efecto. Otros trabajos muestran un efecto similar de la Anisomicina en distintos modelos y tipos de aprendizaje, por ejemplo, en una memoria aversiva en pollos (Freeman et al., 1995), en la tarea de evitación inhibitoria en ratas (Quevedo et al., 1999), en una memoria de reconocimiento social (Richter et al., 2005) y en una memoria de miedo social (Kornhuber & Zoicas 2020).

Ahora bien, la síntesis de proteínas no es el único proceso en el que se observó una dinámica bifásica. La inhibición de la síntesis de RNA mediante la inyección localizada de dos inhibidores diferentes -DRB o α -amanitina- en el hipocampo produce un déficit en la tarea de evitación inhibitoria en ratas en dos momentos: inmediatamente y de 3 a 6 horas después del entrenamiento (Igaz et al., 2002). Varios trabajos realizados utilizando el paradigma de

memoria contexto-señal en el cangrejo *Neohelice granulata* mostraron que, por un lado, la inhibición de la actividad de PKA con el inhibidor Rp-8-CI-cAMPS produce un déficit en la memoria de largo término cuando es administrado 15 minutos antes o entre 4 y 8 horas después del entrenamiento (Locatelli et al., 2002); mientras que la administración del inhibidor general de HDACs de clase I, Butirato de Sodio, produce una facilitación de la memoria cuando es inyectado 10 minutos antes, inmediatamente o 6 horas después del entrenamiento (Federman et al., 2009). Por último, también se observó un aumento en la actividad del factor de transcripción NF- κ B en el núcleo tanto inmediatamente como 6 horas después de un entrenamiento fuerte capaz de producir una memoria de largo término (Freudenthal & Romano 2000).

El consenso general respecto de la dinámica bifásica indica que la primera ola de expresión está relacionada con genes tempranos, en muchos casos factores de transcripción, que luego están involucrados en la segunda ola de expresión de genes estructurales o efectores relacionados con la memoria, como por ejemplo, receptores AMPA y NMDA o proteínas como NCAM y BDNF.

En función de la bibliografía recabada, se puede concluir que la naturaleza bifásica de los procesos moleculares subyacentes a la consolidación no solo es compartida por distintos tipos de memorias, sino que también está altamente conservada a lo largo de la evolución.

1.8 Reconocimiento de Objeto Novedoso

La memoria de reconocimiento implica la identificación de una novedad en un entorno por demás familiar. Para estudiar este tipo de memoria se utiliza la tarea de reconocimiento de objeto que, en su forma más básica, consiste en la identificación de un objeto novedoso -visto por primera vez- respecto de un objeto familiar conocido previamente. Este tipo de memoria tiene dos componentes principales: la **familiaridad**, definida como la identificación rápida de algo como “conocido”, y la **recolección**, que implica la evocación de información sobre el contexto o detalles más específicos del evento experimentado (Brown & Aggleton 2001). Es decir, la familiaridad está relacionada con el “¿Qué?” y la recolección con el “¿Dónde? o ¿Cuándo?” de la memoria de un episodio o evento. Si bien existen muchas variantes de esta tarea que hacen foco en distintos aspectos de la memoria, en este trabajo nos centraremos en la memoria de reconocimiento de objeto novedoso en su forma más básica.

El protocolo está compuesto por tres etapas: *la habituación*, en la cual los animales son expuestos al entorno en el cual se llevará a cabo el experimento. Luego le sigue el *entrenamiento*, que consiste en la sesión de aprendizaje en la cual son presentados dos objetos idénticos. Por último, se encuentra la etapa de *testeo*, en la cual los animales son

enfrentados a uno de los objetos familiares contra un objeto novedoso. Esta tarea está basada en el concepto de que los animales tienen una tendencia innata a explorar objetos novedosos por sobre los conocidos. En este contexto, una mayor exploración del objeto novedoso indica que el animal recuerda al objeto familiar (Antunes & Biala 2012).

1.8.1 Estructuras involucradas en la memoria de reconocimiento

1.8.1.1 Corteza Perirrinal

Dentro de las estructuras que se encuentran en el lóbulo temporal medial, la corteza perirrinal ha sido fuertemente implicada en distintas fases de la memoria de reconocimiento, particularmente con la memoria del objeto, es decir, con el componente de familiaridad. La inactivación de esta región mediante la administración de lidocaína de manera localizada antes y después de la adquisición, así como antes de la evocación produce un déficit en la memoria de corto término (Winters & Bussey 2005). Experimentos utilizando antagonistas de receptores AMPA y NMDA mostraron resultados similares, indicando que es necesaria la transmisión glutamatérgica en esta región para la formación de la memoria de reconocimiento (Winters & Bussey 2005). Por otro lado, al evaluar la memoria de largo término, se encontró que tanto la inhibición localizada de la síntesis de proteínas con Anisomicina luego del entrenamiento como la inactivación transitoria con Muscimol produce un déficit en la memoria evaluada a las 24 horas (Balderas et al., 2008; de Landeta et al., 2020).

1.8.1.2 Hipocampo

La participación del hipocampo en la consolidación de la memoria en el paradigma de NOR es discutida. Si bien es ampliamente aceptado que el hipocampo está implicado en la consolidación de memorias espaciales, como por ejemplo en la memoria de ubicación de los objetos evaluada en el paradigma de *Novel Object Location* (NOL), los resultados en cuanto a su participación en la memoria de reconocimiento de objetos son contradictorios. Muchos trabajos muestran que intervenciones localizadas en el hipocampo dorsal no producen déficits en la memoria de objeto a las 24hs (McQuown et al., 2011; Alaghband et al., 2017; Kwapis et al., 2019; de Landeta et al., 2020), mientras que otros indican lo contrario (Federman et al., 2013; Zalcman et al., 2015). De hecho, un trabajo reciente en el que se utilizan distintos tipos de DREADDs muestra que la inhibición del hipocampo dorsal mediada por el receptor hM4Di no afecta la consolidación de la memoria en el paradigma de NOR, pero la inhibición de esta misma región mediada por el receptor KORD sí produce un déficit en la memoria de reconocimiento de objeto (Tuscher et al., 2018), indicando que tal vez los resultados

contradictorios reportados en la literatura están relacionados con el mecanismo mediante el cual se está interviniendo en la región.

1.8.1.3 Corteza Prefrontal

La corteza prefrontal medial (mPFC) es una estructura que está asociada a diversas funciones, entre ellas, la representación espacial en base a claves egocéntricas, el orden temporal y la atención. En relación a la memoria de reconocimiento, se cree que esta región está involucrada en la integración de la información del objeto y la ubicación en el contexto (Morici et al., 2015). Trabajos recientes mostraron que la inactivación transitoria de esta región con Muscimol inmediatamente después del entrenamiento produce un déficit en la memoria a las 24 horas en ratas (de Landeta et al., 2021), mientras que la inhibición quimiogénica de neuronas glutamatérgicas mediante el uso de DREADDs también produce un déficit a las 24 horas en ratones (Tuscher et al., 2018), confirmando que la actividad de esta región es necesaria para la consolidación de la memoria de reconocimiento de objeto.

1.8.1.4 Corteza Retrosplenial

Experimentos en ratas han mostrado que la inactivación de esta corteza mediante la inyección localizada de Muscimol produce un déficit en la memoria de objetos en una variante del paradigma de NOR (Y-OR) en el cual los objetos se encuentran en los brazos de un laberinto en Y, prácticamente sin claves visuales, el cual supone un componente mínimo de memoria espacial (de Landeta et al., 2020). Estos resultados sirven como evidencia para mostrar que esta región está involucrada en la codificación de la memoria de los objetos.

Objetivos e Hipótesis

Hipótesis

HDAC3 es una desacetilasa que actúa como modulador negativo de la memoria mediante la desacetilación de histonas de genes relacionados con la memoria, por lo que la inhibición de su actividad facilita la consolidación.

HDAC3 desacetila la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B dentro del núcleo, lo que promueve su unión con la proteína inhibidora I κ B y posterior expulsión al citoplasma, terminando así la señal. Este proceso contribuye a la función moduladora negativa de la memoria,

Durante la consolidación de la memoria existe un patrón de actividad transcripcional bifásico en el que participa el factor de transcripción NF- κ B.

La acetilación de histonas es un mecanismo de regulación de la expresión génica implicado en la consolidación de memorias persistentes.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo es caracterizar los mecanismos moleculares subyacentes a la consolidación de una memoria persistente, haciendo foco en la relación funcional entre HDAC3 y el factor de transcripción NF- κ B.

Objetivos específicos

Estudiar la dinámica de acetilación y translocación al núcleo de NF- κ B a lo largo de la ventana de consolidación de una memoria de reconocimiento de objeto en el hipocampo. Evaluar la expresión de genes relacionados con la memoria dentro de ese intervalo temporal.

Determinar si la inhibición de HDAC3 provoca un aumento de la acetilación de p65 y de su translocación al núcleo durante la consolidación de la memoria en distintas regiones del cerebro, provocando una facilitación de la consolidación.

Estudiar el efecto de la inhibición tanto de HDAC3 como de NF- κ B sobre la memoria en las dos fases de actividad transcripcional propuestas.

2. Materiales y métodos

2.1 Animales

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL6, machos y hembras, de entre 2 y 5 meses de edad provistos por el bioterio de La Plata y por la Academia Nacional de Medicina.

Los animales fueron alojados en grupos de 2 a 4 animales, en una sala de alojamiento en el IFIBYNE con ciclos de luz/oscuridad de 12hs (encendido de luces a las 7.30am), y provistos de agua y alimento marca Ganave *ad libitum*.

Para los experimentos comportamentales que involucran la inyección de RGFP966 3 o 9 horas después de la conducta se utilizaron ratones macho CF1 provistos por el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. Dichos animales fueron alojados en las mismas condiciones enunciadas anteriormente.

Todos los procedimientos realizados fueron previamente aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, bajo el protocolo N°153

2.2 Procedimientos comportamentales

2.2.1 Tareas de reconocimiento de objeto

2.2.1.1 Dispositivo

La arena experimental consiste en una caja de poliuretano color blanco de 31 x 23 cm, con velcros adheridos al piso donde se colocan los objetos, y una cámara web en la parte superior para grabar los videos (Genius Ecam 800 Full HD).

Para todos los experimentos se cubrió el piso de la arena con una capa de viruta limpia de manera tal que quede toda la superficie cubierta.

Los objetos utilizados fueron bloques Lego color azul, pelotas de ping pong color naranja y vasos de precipitado de vidrio de 50ml dados vuelta. Para asegurarnos de que la naturaleza de estos objetos no presenta una preferencia espontánea en los animales, realizamos tests de preferencia en los que se observa que los animales exploran ambos objetos por igual ([Figura S1](#)). Los objetos familiares y novedosos y su posición en la arena experimental fueron asignados de manera aleatoria y balanceada. Para corroborar esto, se realizaron análisis de preferencia por el objeto y la posición durante los testeos.

2.2.1.2 Sesiones

Los dos días previos al inicio del experimento los animales fueron sometidos a sesiones de *handling* una vez por día, imitando las manipulaciones que recibirán durante el experimento.

Luego le siguieron dos sesiones de *habitución* en dos días consecutivos, en las cuales los animales fueron colocados en la arena experimental vacía durante 5 y 15 minutos respectivamente.

La sesión de *entrenamiento* ocurrió al día siguiente de la última habituación y consistió en colocar a los animales en la arena experimental en presencia de dos objetos iguales. La duración del entrenamiento varía según el experimento entre 1, 3 o 15 minutos.

Una semana después del entrenamiento se evaluó la memoria en una sesión de *testeo* de 5 minutos en la cual los animales fueron colocados nuevamente en la arena experimental en presencia de un objeto ya conocido durante el entrenamiento -familiar- y un objeto desconocido -novedoso- ([Figura 3](#)).

Entre cada animal y el siguiente, los objetos fueron removidos de la arena y limpiados exhaustivamente con papel y etanol 70%; la viruta fue mezclada y re-acomodada para que no quede ningún rastro de algún camino en particular.

Al momento de colocar a los animales en la arena, se tuvo la precaución de ponerlos de espaldas y a la misma distancia de ambos objetos, con el fin de que el tiempo de exploración no se vea sesgado por la cercanía a alguno de ellos.

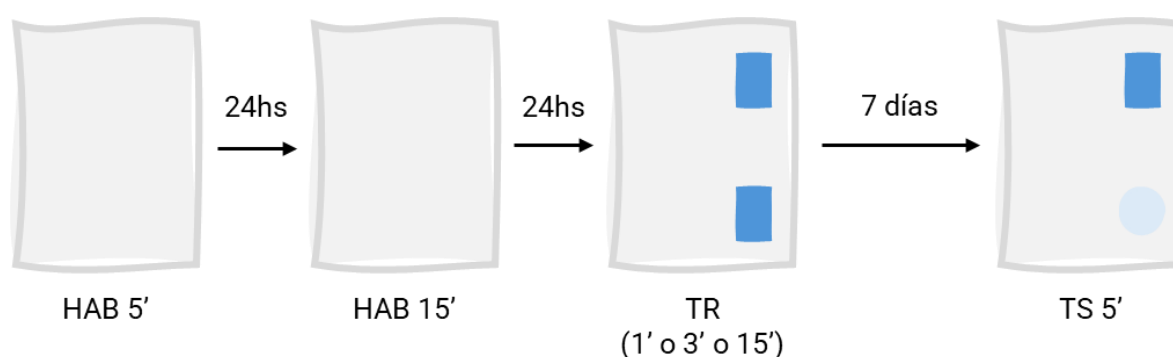


Figura 3. Esquema del dispositivo experimental utilizado para las tareas de reconocimiento de objetos. Las primeras dos sesiones son de habituación a la arena experimental vacía (HAB) seguidas por la sesión de entrenamiento (TR) con dos objetos iguales. Por último, en la sesión de testeo (TS) el animal es presentado con un objeto familiar y uno novedoso.

2.2.1.3 Análisis

Los videos se analizaron utilizando el programa AnyMaze con el que se realizó una cuantificación manual del tiempo de exploración de cada objeto en la arena.

Se consideró exploración todo momento que el animal se encuentra con la cabeza orientada hacia el objeto a una distancia igual o menor a 1 cm del perímetro del mismo, o está olfateándolo. No se considera exploración cuando el animal está arriba del objeto o mordiéndolo.

Luego se calculó un índice de discriminación, que consiste en el porcentaje de tiempo que el animal pasó explorando el objeto novedoso, utilizando la siguiente ecuación:

$$ID\% = \frac{\text{tiempo novedoso}}{\text{tiempo total de exploración}} \times 100$$

2.2.2 Tarea de Condicionamiento de Miedo

2.2.2.1 Dispositivo

El dispositivo experimental consiste en una caja de acrílico transparente (24.5 x 24.5 x 42 cm) colocada dentro de una caja de madera blanca que contiene una lámpara de intensidad regulable, un parlante, un ventilador de extracción de aire y una cámara web en el techo para registrar los videos. El piso de la caja de acrílico posee una grilla metálica compuesta de varillas paralelas mediante la cual se puede entregar un shock eléctrico a los animales.

Este dispositivo está conectado a un sistema de control mediante el cual se pueden configurar los parámetros del ensayo, como la intensidad de la luz, la intensidad del shock eléctrico, la presencia y frecuencia de un tono, y los intervalos de tiempo, entre otros.

Al contexto descrito arriba, utilizado tanto en el entrenamiento como el testeo de memoria contextual, lo llamaremos contexto A. Para testear la memoria de clave es necesario utilizar un contexto diferente al del entrenamiento. Con tal fin, se hicieron las siguientes modificaciones al contexto A para generar uno nuevo al que llamaremos contexto B: Se colocó una base blanca en el piso para ocultar la grilla metálica, se colocó una plancha de acetato color verde translúcido sobre las paredes con forma de semicírculo, se adhirió un papel secante embebido en esencia de vainilla a la pared, y se bajó la intensidad de la luz.

2.2.2.2 Sesiones

Antes del entrenamiento los animales fueron sometidos a tres sesiones de handling en días consecutivos en las cuales se los manipuló de la misma manera que durante el experimento.

El día del entrenamiento los animales fueron colocados dentro de la caja de condicionamiento y luego de 2 minutos de aclimatación recibieron uno o tres ensayos (entrenamiento débil o fuerte respectivamente) espaciados por 1 minuto. Cada ensayo consistió de un tono (10 segundos, 80 dB) que co-termina con un shock eléctrico (1 segundo, 0.6 mA). Luego del último shock, los animales permanecieron en la caja durante 60 segundos ([Figura 4b](#)).

Para testear la memoria de miedo contextual, los animales fueron colocados en la caja de condicionamiento durante 5 minutos en las mismas condiciones que el día del entrenamiento (contexto A), pero en ausencia de tono.

Para testear la memoria de clave, los animales fueron colocados en el contexto B y luego de 2 minutos se hizo sonar el mismo tono que durante el entrenamiento de manera continua durante 4 minutos.

Tanto en las sesiones de entrenamiento como las de testeo, se limpiaron y secaron todas las superficies de la caja entre un animal y el siguiente a fin de eliminar cualquier tipo de clave olfativa. En el caso del entrenamiento y el testeo de contexto se utilizó una solución de etanol 70% mientras que para el testeo de clave se utilizó ácido acético 2% como parte del cambio contextual.

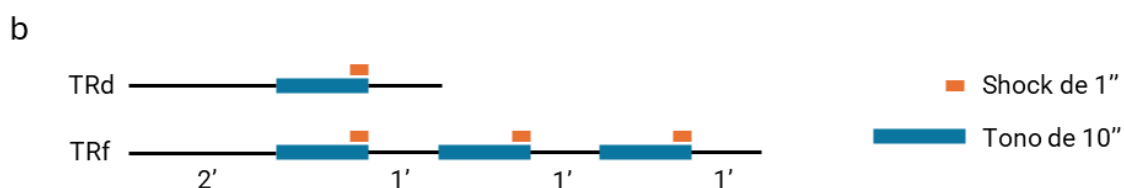
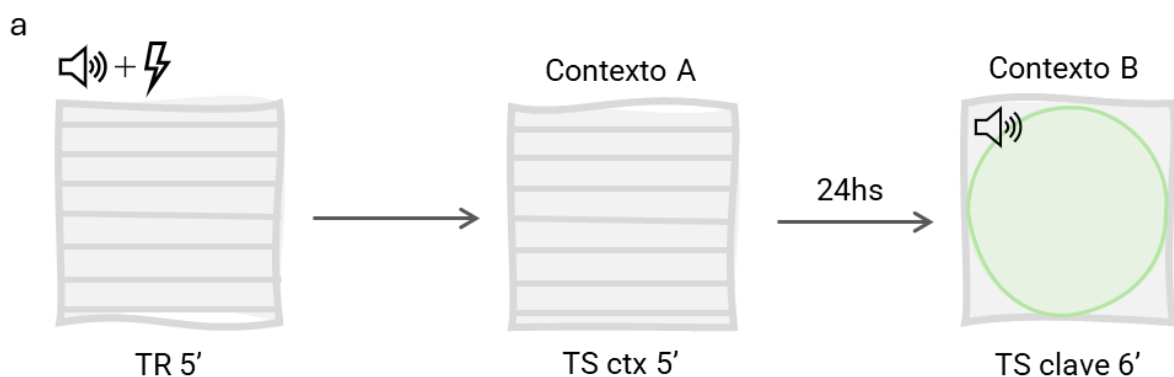


Figura 4. Esquema del dispositivo experimental y los entrenamientos utilizados para la tarea de Condicionamiento de Miedo. (a) Dispositivo experimental. Durante el entrenamiento (TR) los animales recibieron uno o tres shocks pareados con un tono en el contexto A. En el testeo de contexto (TS ctx) los animales fueron colocados nuevamente en el contexto A. 24hs después del TS ctx los animales fueron colocados en contexto B donde se evalúa la memoria de clave (TS clave) en presencia del tono. **(b)** Esquema de los entrenamientos. Los animales que recibieron un solo ensayo del par tono-shock corresponden al grupo con entrenamiento débil (TRd), mientras que los que recibieron tres ensayos pertenecen al grupo con entrenamiento fuerte (TRf).

2.2.2.3 Análisis

Se cuantificó de manera manual el comportamiento de freezing, el cual se define como la ausencia de movimientos excepto los necesarios para respirar. El procedimiento consistió en observar cada 5 segundos la conducta del animal y determinar si está o no haciendo freezing. Luego, se calculó el porcentaje de freezing como la cantidad de eventos positivos sobre la cantidad de eventos totales registrados.

2.3 Cirugía estereotáctica

2.3.1 Procedimiento quirúrgico

En los procedimientos quirúrgicos se utilizó anestesia inhalatoria (Isoflurano Baxter) vehiculizada con oxígeno.

Para anestesiarse a los animales, primero se los colocó en una cámara de inducción que consiste en una caja pequeña con una vía de ingreso del flujo de anestesia y una vía de egreso hacia un sistema de extracción de aire. La inducción duró entre 1 minuto y 1 minuto y medio, con una concentración de Isoflurano del 3%. Una vez anestesiados fueron colocados en el marco estereotáctico (Stoelting) que posee una mascarilla en la pieza de fijación de la nariz a través de la cual se puede administrar la anestesia. La dosis de mantenimiento durante la cirugía fue de 1.5 -2%.

Una vez fijada la cabeza se limpió la superficie con iodopovidona, se inyectaron 50 µl de anestesia local clorhidrato de lidocaína 1% con jeringa hipodérmica y se colocó gel oftálmico Acrylarm (ácido poliacrílico 0.2%) para evitar que se sequen los ojos.

Luego se procedió a cortar la piel de la cabeza para dejar expuesto el cráneo y se limpió la zona de trabajo con agua oxigenada (10 vol.) y cotonetes para poder visualizar bien las suturas craneales.

Se localizó el bregma y partiendo de allí se marcaron los puntos correspondientes al hipocampo dorsal según las coordenadas anteroposterior: -1.9 mm y medio-lateral: ± 1.2 mm ([Figura 5](#)). Se perforó el cráneo utilizando un torno marca Dremel con una fresa de grabado N°105 $\frac{1}{8}$ ".

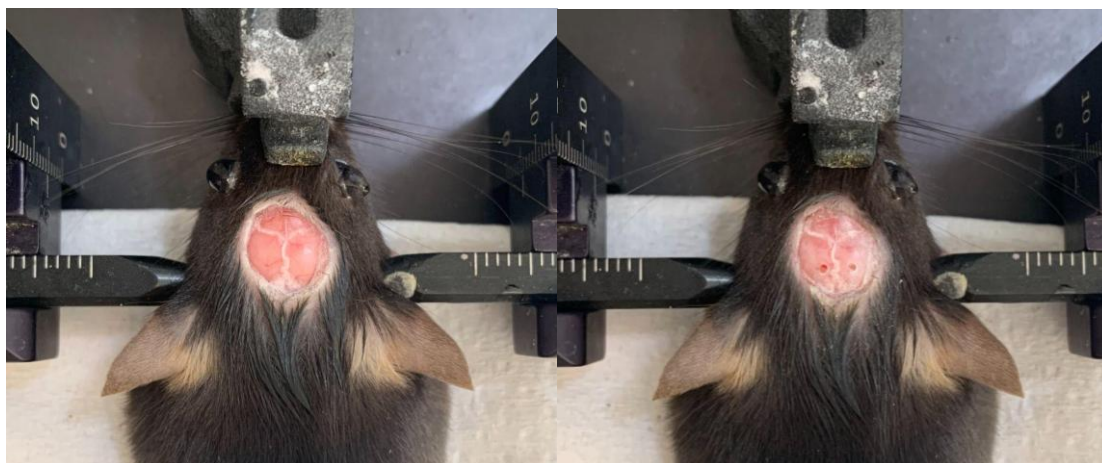


Figura 5. Imágenes ilustrativas de la cirugía estereotáxica y el posicionamiento de las cánulas. A la izquierda se observa el cráneo expuesto con las suturas marcadas en blanco. A la derecha, una imagen del mismo animal con los orificios hechos en las coordenadas correspondientes al hipocampo.

Las cánulas se realizaron a partir de tubos hipodérmicos de acero 304 calibre 23G y 8 mm de largo. Se introdujeron 1.2mm desde la superficie del cráneo (coordenada dorsoventral - 1.2mm) y luego se fijaron con adhesivo instantáneo de cianoacrilato “La gotita” en gel.

Finalmente se cubrió toda la superficie expuesta con acrílico dental (acrílico autocurado + monomero auto cross-linked Dentalab) formando un “casco” que mantiene las cánulas fijas en su lugar hasta finalizar el experimento.

Una vez finalizada la cirugía, los animales fueron colocados en cajas con viruta sobre una almohadilla térmica hasta su completa recuperación de la anestesia.

2.3.2 Analgesia

Al terminar la cirugía, con el animal aún anestesiado, se administró una inyección subcutánea de Meloxicam (5mg/ml Meloxivet inyectable) diluido 1:10 en solución fisiológica inyectable en una dosis de 5mg/kg.

Por otro lado, se administró Tramadol en gotas en el agua de bebida (Clorhidrato de Tramadol 100mg/ml), 1 gota cada 100 ml por 48hs.

Durante las primeras 24 horas de la recuperación post-quirúrgica se colocaron pellets de alimento embebidos en agua con Tramadol dentro de la caja para facilitar tanto la ingesta de alimento como del analgésico.

2.4 Drogas y vías de administración

Para la inhibición de HDAC3 se utilizó el inhibidor específico RGFP966 por vía intraperitoneal (i.p.) en una dosis 10mg/kg (Malvaez et al., 2013), diluido en vehículo compuesto por DMSO 15%, polietilenglicol 400 10%, Tween-20 2% y solución fisiológica.

Para la inhibición de NF- κ B con Sulfasalazina (SSZ) se utilizaron tres dosis distintas (15.5, 30 y 150 mg/kg) administradas vía i.p. Dado que en los trabajos en los que se utilizó SSZ para estudiar la conducta ésta fue inyectada de manera localizada, se tomó como referencia la dosis que se utiliza en humanos. En el ámbito clínico, la SSZ es administrada en forma de comprimidos orales con un porcentaje de absorción de 10-20% en el intestino (Das & Dubin 1976). Teniendo esto en cuenta y que el peso promedio de una persona es de 60kg (Nair & Jacob 2016) se calculó la dosis efectiva en mg/kg. Finalmente, se realizó la conversión de la dosis de humanos a ratones según se describe en Nair & Jacob 2016. De esta manera obtuvimos la dosis de partida de 15.5mg/kg. La dosis de 150mg/kg fue elegida en función de la dosis administrada en Freudenthal et al., 2005 por vía intracerebroventricular (i.c.v.) En ese trabajo se inyectó una solución de concentración 5mM, entonces calculamos la cantidad de mg de droga para lograr una concentración similar en circulación tomando un valor de volemia de 1.5ml (fuente: nc3rs.org.uk). La SSZ fue disuelta en vehículo compuesto por 35% DMSO, Hepes 10mM y solución fisiológica.

Para la inhibición sistémica de NF- κ B con BAY 11-7082 se utilizó una dosis de 20mg/kg (Jiang et al., 2017) disuelta en DMSO 25%, Tween-20 2% y solución fisiológica. Volumen de inyección 100 μ l/ratón.

Para la inhibición localizada de NF- κ B con BAY 11-7082 se utilizó un dispositivo compuesto por una aguja dental de calibre 30G con un tope hecho con cola vinílica de manera tal que sobrepase la cánula guía por 1 mm dentro del hipocampo; una jeringa de precisión Hamilton de 5 μ l; y una tubuladura que conecta la jeringa con la aguja de inyección. Se realizaron inyecciones bilaterales de 0.5 μ l/hipocampo de droga disuelta en DMSO en una concentración de 65mM. Esta concentración fue adaptada de un trabajo en el cual inyectan 500 μ g de droga por animal por vía i.c.v. (Zhang et al., 2018); teniendo en cuenta este dato, el peso molecular

de la droga y que el volumen de líquido cefalorraquídeo es de 35-40 μ l (Šakić 2019) se llegó a una concentración de 65mM.

2.5 Determinación de los sitios de inyección

Una vez finalizados los experimentos de conducta en los que se realizaron inyecciones localizadas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente los cerebros fueron sumergidos en una solución de paraformaldehído (PFA) 4% en buffer fosfato por al menos 24 horas. Cada cerebro fue cortado bajo lupa a la altura de las cánulas y se determinó la posición de los sitios de inyección de manera macroscópica utilizando el atlas de Paxinos y Franklin ([Figura 6](#) y [7](#)).

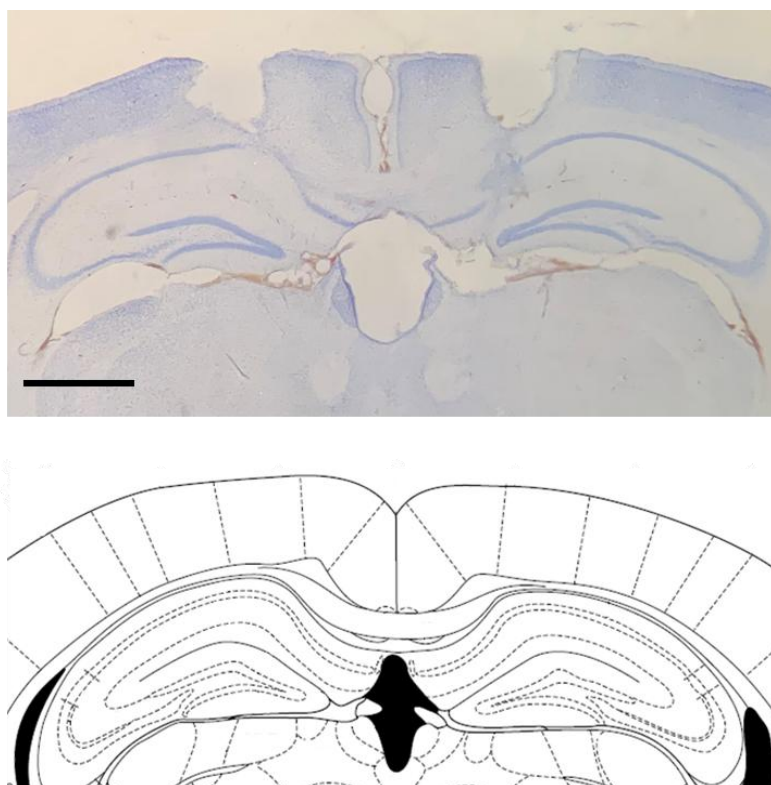


Figura 6. Imagen demostrativa del posicionamiento de las cánulas. En la parte superior se muestra un corte histológico teñido con Violeta de Cresilo a la altura del hipocampo con la marca de donde estaban colocadas las cánulas (corte de 40 μ m de espesor teñido con Violeta de Cresilo observado en Lupa Olympus 7x). En la parte inferior se muestra la sección correspondiente en el atlas (Figura 49, - 2.18 mm del bregma). Barra de escala $\cong$ 1mm determinada a partir de la escala del atlas.

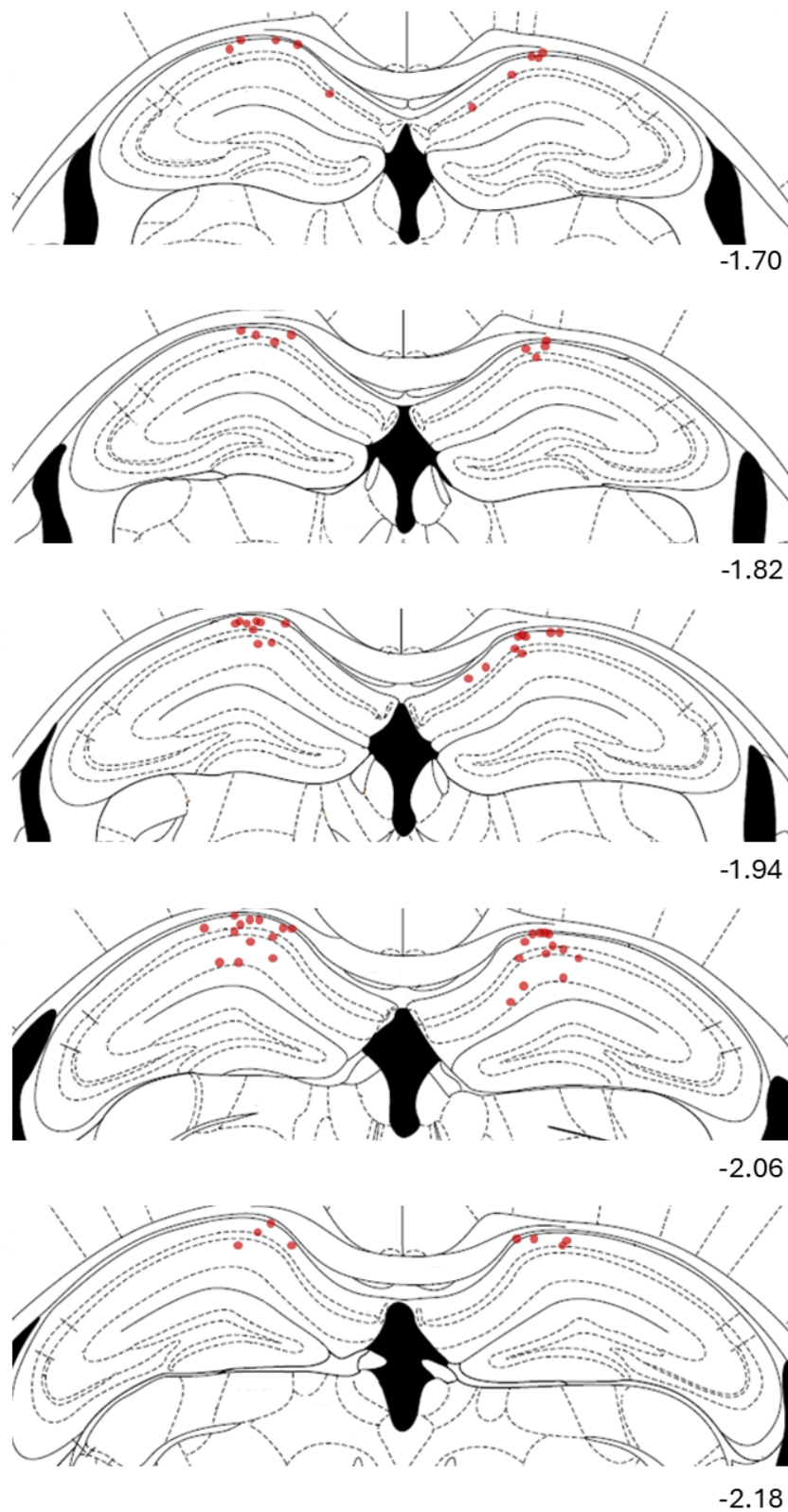


Figura 7. Sitios de inyección en la región CA1 del hipocampo dorsal. Los puntos rojos muestran los sitios donde se realizaron las inyecciones en los experimentos comportamentales en los que los animales recibieron inyecciones localizadas de BAY 11-7082. El número en la esquina inferior derecha

muestra la posición anteroposterior desde el bregma en mm. Figuras adaptadas del atlas de Paxinos y Franklin.

2.6 Extractos enriquecidos en proteínas

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente después se realizó la disección bilateral del hipocampo. Dependiendo del experimento se realizaron extractos totales o fraccionados, para obtener por separado fracciones enriquecidas tanto en proteínas citosólicas como en proteínas nucleares.

En todos los casos se utilizó un homogeneizador vidrio-vidrio Dounce, émbolo tipo “Tight” (Wheaton).

2.6.1 Extractos totales

El tejido fue homogeneizado con 15 golpes en 250 μ l de buffer A (10mM HEPES pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 1 μ g/ml pepstatina A, 10 μ g/ml leupeptina, 0.5mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinina, 5mM Butirato de sodio, 1mM ortovanadato de sodio, y 50mM NaF), posteriormente fue centrifugado 15 minutos a 1000g a 4°C para eliminar el debris, y se recuperó el sobrenadante que fue almacenado a -20°C hasta su uso.

2.6.2 Extractos fraccionados

El tejido fue homogeneizado con 8 golpes en 250 μ l de buffer A, posteriormente fue centrifugado 15 minutos a 1000g a 4°C para eliminar el debris, y se recuperó el sobrenadante correspondiente a la fracción citosólica. El pellet fue resuspendido en 30 μ l de buffer B (20mM HEPES pH 7.9, 0.8M KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.4mM EDTA, 0.5mM DTT, 50% Glicerol, 1 μ g/ml pepstatina A, 10 μ g/ml leupeptina, 0.5mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinina, 5mM butirato de sodio, y 1mM ortovanadato de sodio) e incubado durante 30 minutos a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras 15 minutos a 10000 g a 4°C, y se recuperó el sobrenadante correspondiente a la fracción de proteínas nucleares solubles. Todas las fracciones fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su uso.

En todos los casos se separó una alícuota de 2 μ l que fue disuelta en 23 μ l de NaCl 0.15 M, para la posterior cuantificación de proteínas. Estas muestras también fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

2.7 Western blot

2.7.1 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de la concentración de proteínas se utilizó el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kit con las siguientes modificaciones: se utilizó el protocolo en microplaca de 96 wells, utilizando una curva de calibración de BSA en un rango de 40-800µg/ml. Se utilizó 1µl de muestra diluido en 11.5µl de NaCl 0.15M y 100µl de la mezcla de reactivos A y B en las proporciones indicadas por el fabricante. La curva de calibración se midió por triplicado y las muestras por duplicado.

2.7.2 SDS-PAGE

Para la separación de las proteínas en base a su peso molecular, se realizó una electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. Los geles resolutivos se prepararon utilizando 15% de acrilamida:bisacrilamida (29:1) para la resolución de proteínas de bajo peso molecular, como BDNF; mientras que, para proteínas de mayor peso molecular como NF-κB, se utilizó 12.5%. El gel de stacking se preparó con 5% de acrilamida.

Las muestras fueron diluidas en buffer de siembra (5x: 0.3125M Tris base, 50% glicerol, 5% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 2.5% azul de bromofenol) y agua. El volumen de muestra utilizado fue tal que contuviera 20µg de proteína; el volumen final de siembra fue de 20 o 25µl, de manera tal que se utilizó 4 o 5µl de buffer de siembra para obtener una concentración final de 1x, y el resto del volumen se completó con H₂O.

Luego de sembrar las muestras se realizó la corrida electroforética, primero a 70V durante 30 minutos aproximadamente (hasta que la muestra ingresó en el gel resolutivo), luego se subió el voltaje a 100V y se corrió otros 90 minutos (buffer de corrida: 25mM Tris, 192mM glicina, 0.1% p/v SDS, pH 8.3). En todos los geles se sembró 1µl de un marcador de peso molecular (PageRuler Plus - Thermo Scientific).

Una vez finalizada la corrida, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF, previamente activada en metanol durante 1 minuto, 1 hora a 350mA (buffer de transferencia: 25mM Tris, 192mM glicina, 10% v/v metanol, pH 8.3). Finalmente, se dejaron secar las membranas completamente antes de proceder a la incubación con anticuerpos.

2.7.3 Incubación con anticuerpos

Primero se activaron las membranas en metanol durante 1 minuto seguido de varios lavados con H₂O. Luego se incubaron en solución de bloqueo para prevenir la unión inespecífica del anticuerpo, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Luego se realizaron 3

lavados de 5 minutos con buffer TBS-T (20mM Tris base, 137mM NaCl, Tween-20, pH 7.6) y se procedió a la incubación con anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante toda la noche, a 4°C en agitación. Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados con TBS-T y se procedió a la incubación con anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa del rabanito (HRP), 1 hora a temperatura ambiente. El detalle de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, así como sus respectivas diluciones se encuentran en la [Tabla 1](#).

Luego se realizaron dos lavados de 5 minutos con TBS-T y un último lavado con TBS.

El revelado se realizó con luminol, mezclando partes de iguales de las soluciones 1 (0.1M Tris pH= 8.8, 0.4mM ácido p-cumárico, 2.5mM luminol) y 2 (0.1M Tris pH= 8.8, 0.02% H₂O₂).

Las imágenes fueron adquiridas en un equipo Amersham Imager 600, y posteriormente analizadas utilizando el software Fiji/ImageJ.

Anticuerpo	Tipo	Especie	Concentración	Marca	# Catálogo
α -p65	Monoclonal	Ratón	1:1000	Cell Signaling	6956S
α -p65(acetyl K310)	Monoclonal	Conejo	1:1000	Abcam	ab218533
α -Erg1	Policlonal	Conejo	1:1000	Santa Cruz	sc-110
α -BDNF	Policlonal	Conejo	1:1000	Santa Cruz	sc-546
α -GAPDH	Monoclonal	Ratón	1:1000	Santa Cruz	sc-32233
α -Mouse HRP	Policlonal	Caballo	1:10000	Cell Signaling	7076S
α -Rabbit HRP	Monoclonal	Ratón	1:5000	Santa Cruz	sc-2357-CM

Tabla 1. Listado de anticuerpos utilizados para western blot.

2.8 Inmunofluorescencia

2.8.1 Obtención del tejido

Para determinar los niveles de NF- κ B en tejido cerebral por inmunofluorescencia se procedió a la fijación del tejido 45 minutos después del tratamiento farmacológico mediante una perfusión intracardíaca. Para ello, se anestesiaron los animales utilizando una solución de Ketamina (150 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg) y luego se realizó la perfusión, haciendo primero un pasaje de 15-20 ml de solución fisiológica para blanquear el tejido seguido de 30 ml de

PFA 4% en PB 0.1M. Se extrajeron los cerebros, se realizó una post-fijación por inmersión en PFA 4% por 24hs a 4°C y luego se los pasó a sacarosa 30% en PB 0.1M durante al menos 24 horas. Los cerebros fueron mantenidos en heladera a 4°C hasta su uso.

Para obtener las secciones coronales, los cerebros fueron removidos de la sacarosa, secados cuidadosamente y luego congelados a -80°C durante al menos 2 horas. Se realizaron cortes coronales de 40µm de espesor en criostato (Leica Microm HM 505 N, temperatura de corte: -20 °C), que fueron colectados y almacenados en solución criopreservadora (3 vol. glicerol, 3 vol. etilenglicol, 4 vol. PB 0.2M) a -20°C hasta su uso.

2.8.2 Incubación

Primero se seleccionaron los cortes con las regiones de interés tomando como referencia el atlas “The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates” (Paxinos & Franklin 2001). Para analizar hipocampo, corteza perirrinal y corteza retrosplenial se tomaron secciones entre bregma -1.58 y -2.06 mm (Figuras 44 a 48 del Paxinos). Para analizar la corteza prefrontal se tomó entre bregma 1.98 y 1.54 mm (Figuras 14 a 18 del Paxinos). Una vez seleccionados los cortes se realizaron lavados con PBS seguido de un retrieval antigénico con citrato de sodio 10mM, 0.05% Tween20 pH= 6 25 minutos a 85°C. Se volvieron a lavar las secciones con PBS y luego se bloquearon en una solución de BSA 2.5% en PBS durante 15 minutos a 37°C. Se incubó con anticuerpo primario disuelto en PBS con 0.05% Tritón y 0.5% BSA durante toda la noche a 4°C, y al día siguiente se incubó con anticuerpo secundario fluorescente diluido en PBS con 0.1% Tritón y 0.5% BSA 90 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se realizaron sucesivos lavados con PBS para eliminar los restos de anticuerpo secundario. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (1:1000) disuelto en PBS. El detalle de los anticuerpos utilizados y sus diluciones se encuentran en la [Tabla 2](#).

Los cortes se montaron en portaobjetos positivizados y se cubrieron con Mowiol como medio de montaje.

Anticuerpo	Tipo	Especie	Concentración	Marca	# Catálogo
α-p65	Monoclonal	Ratón	1:200	Cell Signaling	6956S
α-p65	Monoclonal	Conejo	1:100	Cell Signaling	8242S
α-Mouse Alexa 488	Policlonal	Cabra	1:1000	Invitrogen	A-11001
α-Rabbit Alexa 647	Policlonal	Cabra	1:1000	Invitrogen	A-21245

Tabla 2. Listado de anticuerpos utilizados para la técnica de inmunofluorescencia.

2.8.3 Adquisición y análisis de imágenes

Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM900 con un objetivo 40x NA 1.3. Para cada animal se tomó un stack de imágenes en cada región de interés, en cuatro secciones de tejido distintas. En el caso de la corteza prefrontal, se tomaron imágenes de dos secciones de tejido por animal. Cada stack está compuesto por entre 10 - 20 imágenes, con una profundidad de 0.5µm cada una en escala de 16 bits.

En el experimento en el que se inyectó BAY 11-7082 en el hipocampo, el conteo del número de células p65-positivas se realizó de manera manual utilizando el programa Fiji. Para generar las imágenes ilustrativas de las figuras, se realizó una proyección de suma de intensidad entre un rango representativo de imágenes del stack.

Para el análisis de intensidad de fluorescencia y distribución de la señal dentro del núcleo, primero se realizó la segmentación tridimensional de los núcleos utilizando el programa Cellpose (Stringer et al., 2021). Para ello, se entrenó un modelo personalizado capaz de identificar de manera confiable los núcleos celulares en imágenes de las distintas regiones de interés, partiendo de uno de los modelos pre-entrenados incluidos en la versión 2.0 (Pachitariu & Stringer 2022). Para mejorar la calidad de las imágenes y evitar errores en la detección de núcleos, se utilizó el filtro “denoise” de la versión 3.0 antes de realizar la segmentación (Stringer & Pachitariu 2025). El producto de esta segmentación es una máscara de los núcleos en 3 dimensiones ([Figura 8](#)). Una vez delimitados los núcleos, se procedió a la cuantificación de la señal utilizando el programa Cellprofiler versión 4.2.8 (Stirling et al., 2021). Para analizar el tamaño, número e intensidad de partículas dentro de cada núcleo se generó una máscara tridimensional de estos objetos, que fueron asociados a cada núcleo correspondiente, y luego se tomaron las medidas de número de objetos por núcleo, superficie e intensidad ([Figura 9](#)). Al analizar el tamaño de las partículas se evaluó tanto la superficie como el volumen dando resultados muy similares, posiblemente porque parecen ser estructuras esféricas, por lo que decidimos mostrar sólo el análisis de la superficie. En la cuantificación de intensidad de fluorescencia de los núcleos, se tomó como variable de estudio la intensidad media de cada núcleo en lugar de la intensidad total, dado que de esta manera se tiene en cuenta el tamaño del núcleo.

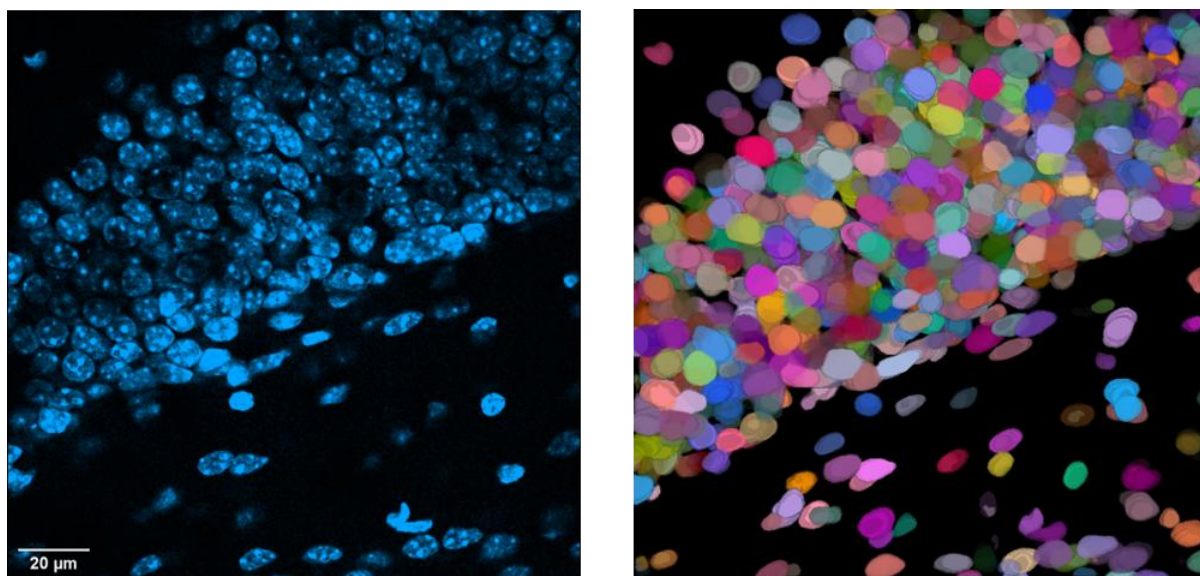


Figura 8. Segmentación de los núcleos utilizando Cellpose. A la izquierda se observa la imagen original del giro dentado con los núcleos teñidos con DAPI y a la derecha se muestra el resultado de la segmentación. Se ajustaron el brillo y contraste de la imagen de la derecha para generar una visualización más clara. El modelo utilizado en Cellpose puede encontrarse en este [link](#).

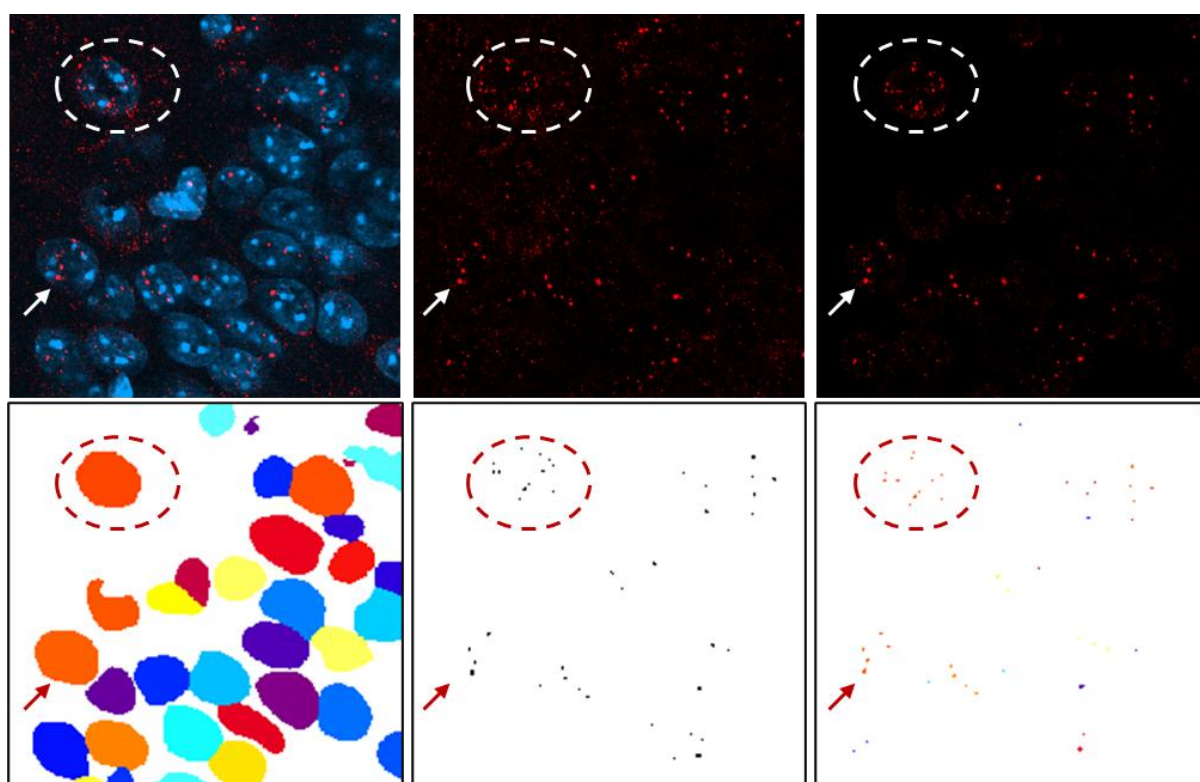


Figura 9. Delimitación de las partículas de p65 con Cellprofiler. Superior: imágenes de la señal de p65 y DAPI (izquierda); p65 (centro) y p65 dentro de la máscara de los núcleos (derecha). Inferior: se muestra la máscara generada con Cellpose (izquierda); la máscara generada para aislar las partículas de señal de p65 (centro); y las partículas asociadas a su núcleo correspondiente (derecha) -todas del mismo color que el núcleo en el que se encuentran. La flecha y el círculo marcan dos núcleos, los

misimos en todas las imágenes, como ejemplo del producto final del procesamiento. Los pipelines utilizados en Cellprofiler para el análisis de imágenes pueden encontrarse en este [link](#).

2.9 Análisis de datos

El análisis gráfico y estadístico de los datos se realizó con R (versión 4.4.1; R core team 2024) y RStudio (versión 2025.5.0.496; Posit team 2025). Se utilizaron modelos lineales generales mixtos o GLMMs, dependiendo de la variable en estudio. Para los modelos generales, se evaluaron los supuestos de homocedasticidad y normalidad de manera gráfica, y este último también mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En los GLMMs se evaluaron los supuestos distribucionales utilizando el paquete DHARMA (Hartig 2022). En los casos en los que se trabajó con variables discretas con distribuciones como binomial o Poisson también se evaluó la sobredispersión de los datos. El análisis estadístico se realizó mediante test de t o ANOVA, y los contrastes post-hoc se realizaron utilizando el método de Tukey con el paquete emmeans (Lenth 2024). En los experimentos en los que se incluyen animales de ambos sexos, éste fue incluido como variable aleatoria en el modelo (modelo mixto) y se calculó el coeficiente de correlación intraclass (CCI) que da cuenta de la proporción de variabilidad explicada por el factor aleatorio.

2.9.1 Experimentos moleculares

En todos los experimentos de western blot se relativizó la señal de interés a la señal de un control, ya sea proteína total (para los experimentos en los que se evaluó acetilación), una proteína housekeeping como GAPDH o un control de carga como la tinción de rojo Ponceau. En los experimentos en los que se muestra la señal relativizada al grupo control, dicha relativización se realizó sobre los ratios proteína de interés / control de carga calculados previamente.

Para el análisis estadístico se utilizaron modelos lineales generales seguidos de test de t o ANOVA dependiendo del caso.

2.9.2 Experimentos de inmunofluorescencia

El análisis estadístico del ratio de intensidad núcleo/total y del número de puntas por núcleo se realizó utilizando GLMMs con distribución beta y binomial negativa respectivamente. Las demás mediciones de intensidad, superficie, y número de células por unidad de volumen se analizaron utilizando modelos generales.

2.9.3 Experimentos comportamentales

En los experimentos de reconocimiento de objeto novedoso se analizó el tiempo de exploración utilizando un modelo lineal general, poniendo al sexo como variable aleatoria en los experimentos que hay animales de ambos sexos. Para analizar el tiempo de exploración por objeto se realizó un ANOVA de dos factores utilizando las variables “Tratamiento” (droga o vehículo) y “Tipo de objeto” (familiar o novedoso), y al ratón como variable aleatoria para corregir la falta de independencia entre las observaciones puesto que hay dos datos por cada animal (tiempo familiar y tiempo novedoso). En este análisis consideramos que la interacción entre ambos factores refleja el efecto de la droga sobre la memoria. Por último, se analizó el índice de discriminación utilizando un GLMM con distribución beta.

Para analizar la conducta de freezing en los experimentos de condicionamiento de miedo se tomaron los eventos de freezing positivos sobre la cantidad de eventos totales (12 por minuto) y se analizó esta proporción utilizando un GLMM con distribución binomial seguido de ANOVA. Como cada animal fue testeado más de una vez, se realizó un análisis de medidas repetidas agregando al ratón como variable aleatoria. Para el análisis del porcentaje de freezing total se utilizó un modelo con las variables “Grupo” (en este caso una combinación entre el tipo de entrenamiento -fuerte o débil - y el tratamiento -droga o vehículo), “Testeo” (1, 2 o 3) y su interacción. Los contrastes post-hoc se realizaron comparando grupos dentro de cada nivel de la variable Testeo. El análisis minuto a minuto se realizó por separado para cada testeo con las variables “Grupo”, “Minuto” y su interacción.

3. Resultados

Estudio de los cambios moleculares producidos durante la ventana temporal de la consolidación

Teniendo en cuenta toda la evidencia en favor de que durante la consolidación de la memoria hay un proceso bifásico de actividad transcripcional, y considerando que se vio un patrón bifásico de actividad de NF-kB en un modelo de memoria en cangrejos, nos propusimos estudiar la dinámica temporal de NF-kB durante la consolidación de una memoria de NOR en ratones. Con este fin, se realizó un primer estudio en el cual dos grupos de animales recibieron un entrenamiento fuerte de 15 minutos o permanecieron en la arena experimental vacía durante la misma cantidad de tiempo (grupo habituado). Los animales fueron luego sacrificados por dislocación cervical 45 minutos, 3, 6 o 9 horas después del entrenamiento y se extrajo el hipocampo para la obtención de extractos enriquecidos en proteínas citosólicas y nucleares ([Figura 10a](#)). Se realizaron experimentos independientes para cada punto temporal (cuatro en total). Dado que la activación de la vía de NF-kB promueve su translocación al núcleo, se midieron los niveles de p65 en la fracción nuclear para determinar si había un aumento en respuesta al entrenamiento en alguno de los tiempos estudiados. Por otro lado, se midieron los niveles de BDNF en la fracción citosólica debido a su rol en la consolidación de la memoria y su posible relación con el factor de transcripción NF-kB.

Al evaluar tanto la presencia de NF-kB en el núcleo ([Figura 10b](#)) como la expresión de BDNF en el citosol ([Figura 10c](#)), no se observaron diferencias entre los grupos entrenados y habituados para ninguno de los tiempos. Una posibilidad es que estos cambios no ocurran en el hipocampo, sino en alguna otra región involucrada en la consolidación de la memoria de NOR. Dado que típicamente se asocia la función del hipocampo con memorias espaciales o contextuales, también es posible que la experiencia de ingresar en el contexto dispare cambios que no dependen de la presencia de objetos, motivo por el cual no se observan diferencias entre los grupos. Es importante notar que, para el caso de NF-kB, parece haber un cambio en la cantidad de proteína a lo largo del tiempo, pero esta hipótesis no se puso a prueba dado que se trata de cuatro experimentos independientes.

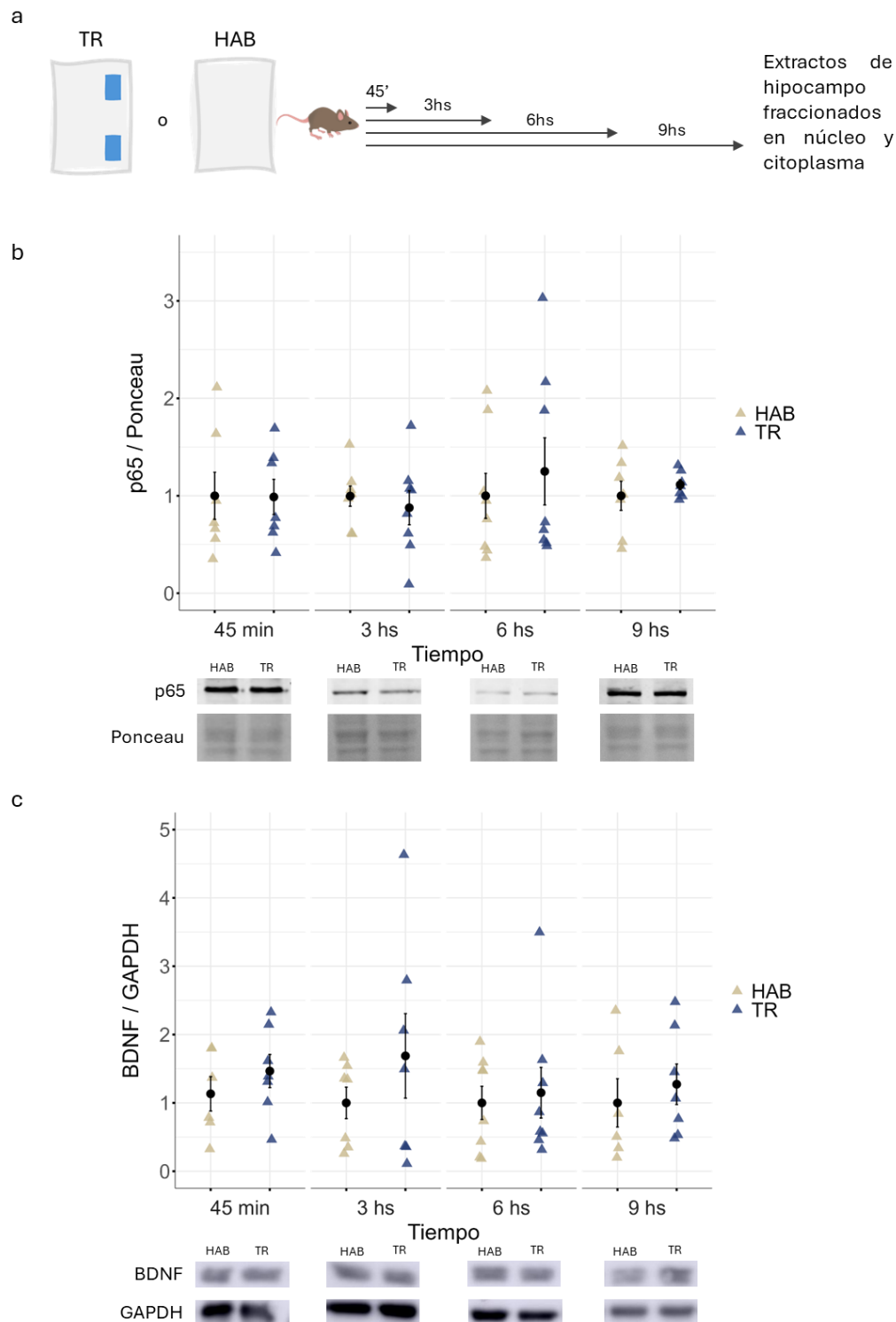


Figura 10. Expresión de NF- κ B en el núcleo y de BDNF en el citosol a lo largo del tiempo, durante la consolidación de una memoria de NOR. (a) Diseño experimental. Los animales fueron colocados en la arena experimental durante 15 minutos en presencia (TR) o ausencia (HAB) de objetos ($n = 7-8$). Luego fueron sacrificados a distintos tiempos para realizar extractos proteicos de hipocampo. (b) Abundancia de NF- κ B en el núcleo. Superior: cuantificación de la densidad óptica de p65 relativo a las bandas teñidas con Ponceau. Inferior: bandas representativas obtenidas por western blot. (c)

Abundancia de BDNF en el citoplasma relativo a GAPDH. Superior: cuantificación de la densidad óptica. Inferior: bandas representativas. Se grafica media $\pm$ error estándar. Los triángulos representan cada observación. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. Las comparaciones se realizaron mediante test de t entre habituado y entrenado para cada tiempo. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S2](#).

Dado que uno de nuestros objetivos principales es determinar si hay un vínculo funcional entre HDAC3 y NF- κ B, nos interesó evaluar los niveles de acetilación de p65 a lo largo del tiempo luego de un entrenamiento fuerte en la tarea de NOR. Para ello utilizamos un anticuerpo específico contra la acetilación en la lisina 310 de p65, pero encontramos que en las fracciones nucleares y citosólicas no hay señal, mientras que en esos mismos extractos antes del fraccionamiento sí la hay. Por lo tanto, realizamos un nuevo experimento similar al anterior ([Figura 11a](#)) pero en este caso se realizaron extractos totales enriquecidos en proteínas solubles y se incluyeron todos los tiempos en el mismo experimento para poder incluir dicha variable en el análisis.

Al evaluar la acetilación de p65 no se observan diferencias entre los grupos entrenados y habituados, aunque sí hay un aumento cualitativo a las 3 y 6 horas respecto de los 45 minutos. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico no se encontró efecto de ninguno de los factores (entrenamiento y tiempo) ni de su interacción ([Figura 11b](#)). En cuanto a la expresión de p65, se observa que la media del grupo entrenado es mayor que la del grupo habituado para todos los tiempos, pero hay que destacar que estos datos presentan una alta variabilidad. El resultado del ANOVA no muestra efecto de ninguno de los factores ni de su interacción ([Figura 11c](#)).

Considerando que existe un antecedente en el cual se observó un aumento en la expresión del gen temprano Zif268 en el hipocampo 45 minutos después de un entrenamiento de NOR (Zalcman et al., 2015), decidimos evaluar los niveles de Zif268 a lo largo del tiempo. En este caso no se observaron diferencias entre los grupos ni a lo largo del tiempo, pero cabe aclarar que en este caso se utilizaron extractos totales, mientras que en el trabajo citado se utilizaron extractos de la fracción nuclear, por lo tanto, no se descarta que haya cambios en los niveles de Zif268 que no se pueden observar bajo estas condiciones experimentales ([Figura 11d](#)).

Por último, se midieron los niveles de BDNF pero tampoco se encontraron diferencias entre los grupos ni a lo largo del tiempo ([Figura 11e](#)).

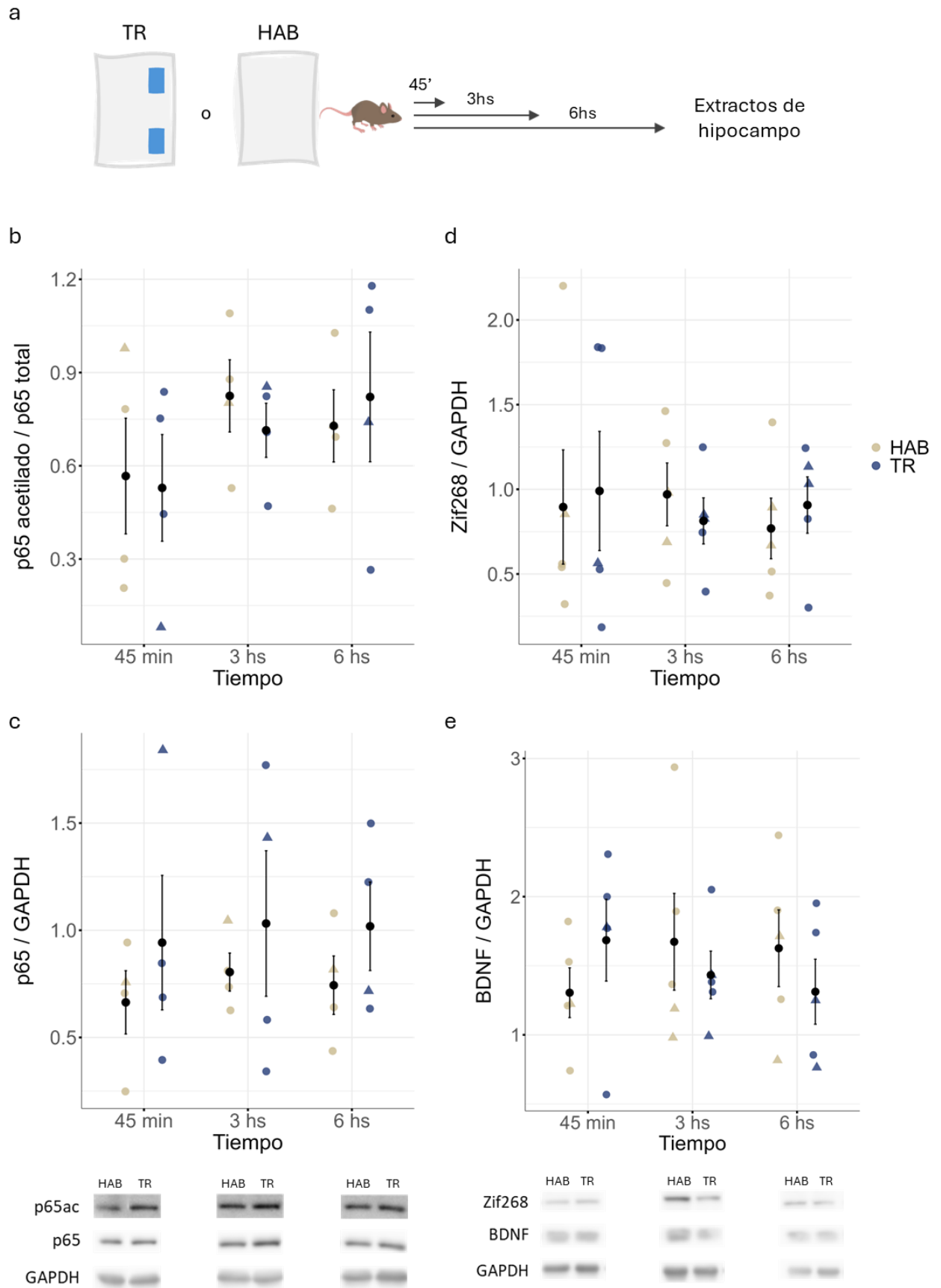


Figura 11. Niveles de p65 acetilado, p65 total, Zif268 y BDNF en el hipocampo a lo largo del tiempo, durante la consolidación de una memoria de NOR. (a) Diseño experimental. Los animales

fueron entrenados o habituados a la arena de NOR durante 15 minutos y luego fueron sacrificados a distintos tiempos para realizar extractos totales de hipocampo. **(b)** Niveles de acetil-p65 respecto de p65 total. **(c)** Niveles de p65 total, **(d)** Zif268 y **(e)** BDNF relativo a GAPDH. En la parte inferior se muestran imágenes representativas de los western blots. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos factores (entrenamiento y tiempo). Los círculos y triángulos corresponden a animales hembra y macho respectivamente. Se grafica la media $\pm$ error estándar. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S3](#).

4. Resultados

Participación de HDAC3 en la consolidación de la memoria

4.1 Efecto del inhibidor RGFP966 sobre la memoria

4.1.1 Reconocimiento de Objeto Novedoso

Para estudiar el rol de HDAC3 durante la consolidación de la memoria decidimos realizar experimentos de inhibición farmacológica. Considerando que la acetilación de histonas es característica de memorias más persistentes, y que HDAC3 es una enzima que afecta este proceso, resultó de interés evaluar la memoria una semana después del entrenamiento.

En experimentos previos de nuestro laboratorio hemos encontrado que la inhibición de HDAC3 con el inhibidor específico RGFP966 luego de un entrenamiento débil de un minuto tiene efecto facilitador de la memoria en la tarea de NOR cuando éste es administrado inmediatamente o 6 horas después del entrenamiento ([Figura 12](#); adaptado de Robles 2018). Considerando estos hallazgos surge la pregunta de si esta ventana de acción de la droga es continua durante la consolidación de la memoria en las horas posteriores al entrenamiento o si se trata de momentos puntuales.

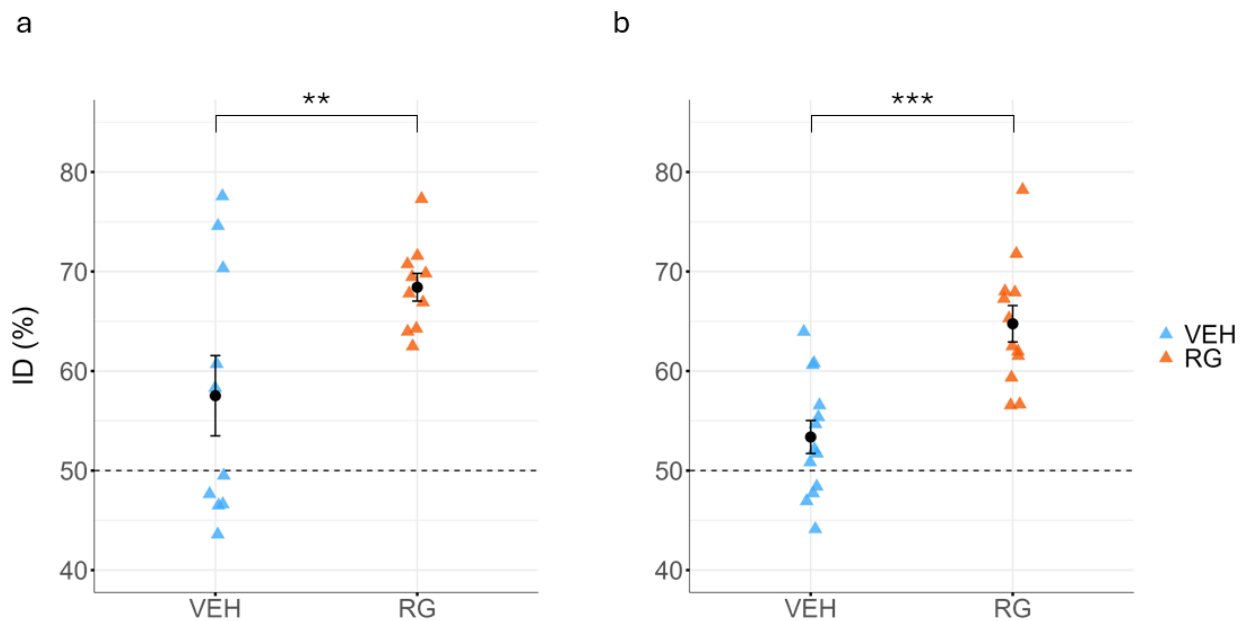


Figura 12. La inhibición de HDAC3 inmediatamente o 6 horas después de un entrenamiento débil tiene efecto facilitador a los 7 días. (a) Índice de discriminación de los animales inyectados con RGFP966 o vehículo inmediatamente después de un entrenamiento de 1 minuto. **(b)** Índice de discriminación para los animales inyectados 6 horas después del entrenamiento. Adaptado de Robles 2018. En negro se grafica la media $\pm$ error estándar de cada grupo. En color se muestran los datos de cada individuo. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$.

Hay antecedentes que muestran que en las horas posteriores a la adquisición de una nueva memoria existen fases de actividad transcripcional que ocurren en momentos específicos y que parecen estar conservados entre distintas especies.

En base a estas evidencias nos planteamos la hipótesis de que la facilitación de la memoria ocurre si HDAC3 es inhibida durante estos momentos de alta actividad transcripcional, mientras que si es inhibida en otro momento no produce tal efecto.

Para investigar esto se realizaron dos experimentos en los cuales se inyectó el inhibidor RGFP966 3 o 9 horas después de un entrenamiento débil. Es decir, en un momento intermedio entre los puntos donde se observó susceptibilidad, y un momento más tardío, en el cual se supone que la ventana de consolidación ya se cerró. La memoria se evaluó a los 7 días ([Figuras 13a](#) y [14a](#)).

La inyección de RGFP966 3 horas después del entrenamiento no tuvo efecto sobre la memoria, como se ve reflejado en el índice de discriminación ([Figura 13b](#)) que no difiere del del grupo control ($ID_{VEH} = 53.6 \pm 4.01\%$; $ID_{RG} = 53 \pm 3.38\%$; $\chi^2(1) = 0.0256$, $p = 0.87$). En ambos grupos los animales pasaron aproximadamente el 50% del tiempo explorando cada uno de los objetos, indicando que no hay memoria del objeto familiar. Esto también se observa al analizar el tiempo de exploración de cada objeto ([Figura 13c](#)), donde ambos grupos muestran tiempos de exploración similares tanto para el objeto familiar como para el novedoso. En este caso, no se encontró efecto de ninguno de los factores (Tratamiento y Tipo de objeto) ni de su interacción. Tampoco se encontraron diferencias en el tiempo de exploración total ([Figura 13d](#)). Para descartar que exista algún sesgo en la exploración se evaluó la preferencia por la posición de los objetos y por el objeto en sí, pero no se encontraron diferencias ([Figura S2](#)). Por último, se analizaron los entrenamientos para descartar que haya habido algún factor que confunda los resultados observados en el testeo, por ejemplo que los animales no hayan explorado. No se observó ninguna preferencia espontánea y el tiempo de exploración total fue similar en ambos grupos ([Figura S3](#)).

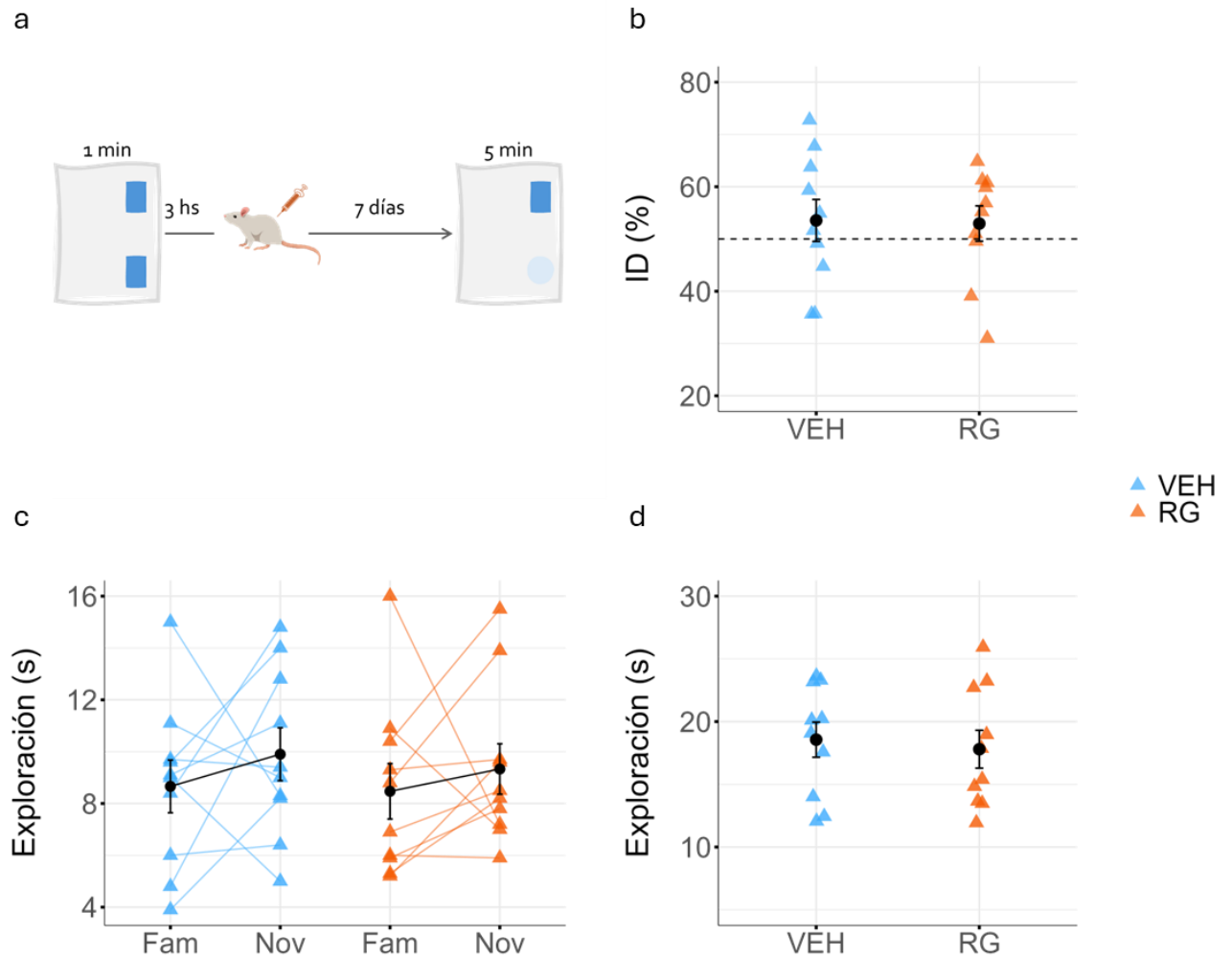


Figura 13. La inhibición de HDAC3 3 horas después del entrenamiento no produce facilitación de la memoria. (a) Diseño experimental. **(b)** Índice de discriminación ($n = 10$). Comparación de medias utilizando un GLMM seguido de Anova - Test de Wald tipo II ($\chi^2(1) = 0.0256$, $p = 0.87$). **(c)** Tiempo de exploración de cada objeto. ANOVA de 2 factores con interacción tipo de objeto x tratamiento. **(d)** Tiempo total de exploración. ANOVA ($F_{1, 18} = 0.1364$, $p = 0.7162$). En negro se grafica la media $\pm$ error estándar de cada grupo. En color se muestran los datos de cada individuo. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S4](#).

En el experimento donde la inyección ocurrió 9 horas después del entrenamiento ambos grupos presentan índices de discriminación similares ($ID_{VEH} = 59.2 \pm 6.05\%$; $ID_{RG} = 58.1 \pm 2\%$; $\chi^2(1) = 0.0656$, $p = 0.7978$) indicando que no hubo efecto de la droga ([Figura 14b](#)). Al analizar el tiempo de exploración se encontró un efecto global del tipo de objeto ([Figura 14c](#)), indicando que los animales pasaron significativamente más tiempo explorando el objeto novedoso que el familiar independientemente del tratamiento (VEH: $t_{familiar} = 6.55 \pm 0.89s$, $t_{novedoso} = 9.81 \pm 1.21s$; RG: $t_{familiar} = 6.66 \pm 0.78s$, $t_{novedoso} = 9.09 \pm 0.84s$; Factor tipo de objeto:

$F_{(1, 2)} = 8.9323_{(1, 17)}$, $p = 0.0082$). Esto es un indicio de que, a pesar de haber utilizado un protocolo de entrenamiento débil, existe una memoria del objeto familiar y que el tratamiento con RGFP966 no la modifica. No se encontraron diferencias en el tiempo total de exploración entre los grupos ([Figura 14d](#)), aunque sí se observa una mayor dispersión en el grupo inyectado con RG. Los animales tampoco presentaron preferencia por alguna de las posiciones en particular o por alguno de los objetos ([Figura S4](#)). Tampoco se encontraron problemas durante el entrenamiento, en el cual los animales presentaron tiempos de exploración similares entre los grupos y no mostraron ninguna preferencia espontánea ([Figura S5](#)).

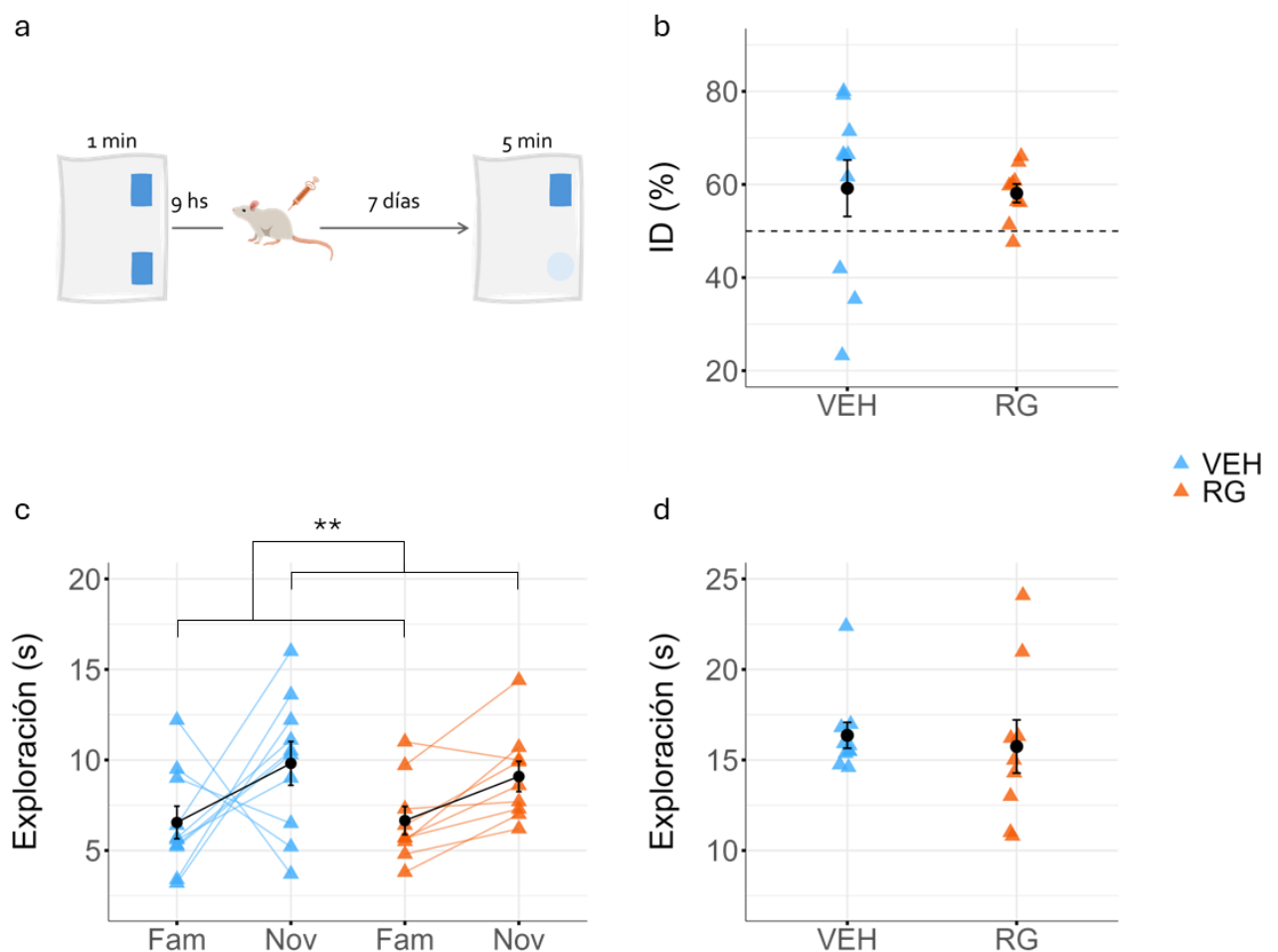


Figura 14. La inhibición de HDAC3 9 hs después del entrenamiento no produce facilitación de la memoria. (a) Diseño experimental. **(b)** Índice de discriminación ($n = 9-10$). Comparación de medias utilizando un GLMM seguido de Anova - Test de Wald. **(c)** Tiempo de exploración de cada objeto. ANOVA de 2 factores con interacción tipo de objeto x tratamiento - ANOVA de dos factores con interacción. **(d)** Tiempo total de exploración. ANOVA. En negro se grafica la media $\pm$ error estándar de

cada grupo. En color se muestran los datos de cada individuo. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S7](#). * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Los resultados presentados en esta sección, en conjunto con los resultados que hemos obtenido previamente en el laboratorio, muestran que el efecto facilitador de la droga depende del momento de la inyección. Mientras que la administración inmediatamente o 6 horas después del entrenamiento producen un marcado efecto sobre la memoria a los 7 días, la inyección a las 3 o 9 horas no tiene efecto ([Figura 15](#)). Esto coincide con los períodos críticos de actividad transcripcional mencionados previamente, indicando que no es suficiente con que aumente la acetilación de histonas y de otras proteínas para que haya memoria, sino que estos fenómenos deben ocurrir en momentos puntuales. Resulta muy interesante analizar los resultados de la inyección a las 6 horas, dado que está sugiriendo que el entrenamiento débil desencadenó algún proceso relacionado con la memoria que hace que ésta sea susceptible de ser facilitada varias horas después.

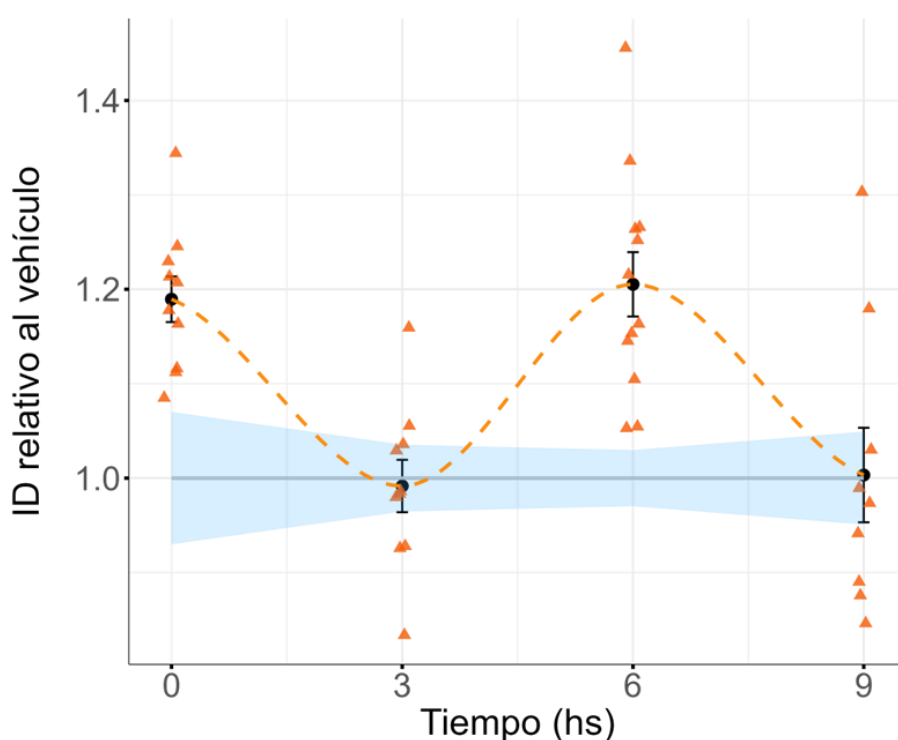


Figura 15. La inhibición sistémica de HDAC3 inmediatamente o 6 horas después del entrenamiento facilita la memoria de reconocimiento de objeto novedoso. Índice de discriminación del grupo inyectado con droga relativo a su grupo control inyectado con vehículo. El ID es significativamente mayor cuando el inhibidor es administrado inmediatamente o 6 horas después

del entrenamiento. En los experimentos donde se inyectó a las 3 o 9 horas no se encontraron diferencias entre los grupos. La línea gris corresponde a la media del grupo VEH de cada experimento y la zona sombreada al error estándar. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar de cada grupo. En color se muestran los datos de cada individuo.

Los efectos de la droga RGFP966 observados hasta este punto fueron determinados en ratones exocriados de la línea CF1, pero nos resultaba de interés continuar con los experimentos utilizando la cepa C57. Por un lado, se quería ampliar el estudio a otros tipos de memoria, particularmente a la memoria de miedo generada en la tarea de Miedo Condicionado (Fear Conditioning). En esta tarea se utiliza el comportamiento de freezing como medida de la memoria y, considerando que los ratones CF1 casi no presentan este tipo de conducta, su utilización representaba una gran limitación a la hora de estudiar este tipo de memorias. Esto no quiere decir que los ratones sean incapaces de aprender la tarea, sino que probablemente expresan otro tipo de comportamientos que no están estandarizados de la misma manera que el freezing.

Por otro lado, una de las líneas de investigación de nuestro laboratorio utiliza un modelo triple transgénico de la enfermedad de Alzheimer en ratones con background genético C57. Dado que los mecanismos estudiados en el presente trabajo podrían estar vinculados a alteraciones presentes en la patología, nos resultó de vital importancia que los resultados producidos puedan ser fácilmente trasladables a esta otra línea de investigación.

Con el fin de validar el efecto de la inhibición de HDAC3 en ratones C57, se realizó un experimento en el cual los animales fueron sometidos a un entrenamiento débil en la tarea de NOR e inmediatamente después recibieron una inyección de droga o vehículo ([Figura 16a](#)). Al evaluar la memoria a los 7 días se encontró un marcado efecto de la droga, reflejado en el aumento significativo del índice de discriminación del grupo inyectado con RGFP966 respecto del vehículo ($ID_{VEH} = 62.5 \pm 1.46\%$; $ID_{RG} = 72.2 \pm 2.14\%$; $\chi^2(1) = 17.294$, $p < .001$; [Figura 16b](#)). Al analizar el tiempo de exploración de cada objeto se observa una disminución en la exploración del objeto familiar en el grupo RG respecto del control (VEH: $t_{familiar} = 4.21 \pm 0.29s$, $t_{novedoso} = 7.06 \pm 0.54s$; RG: $t_{familiar} = 2.59 \pm 0.27s$, $t_{novedoso} = 6.73 \pm 0.53s$). Sin embargo, el resultado del ANOVA muestra que la interacción entre el tipo de objeto y el tratamiento no llega a dar significativa (interacción tratamiento x tipo de objeto: $F_{(1,2)} = 4.0059_{(1,12)}$, $p = 0.068$). Los contrastes post-hoc muestran que ambos grupos exploran más el objeto novedoso que el familiar, pero en el grupo con RG hay una tendencia a explorar menos el objeto familiar en comparación con el grupo control ([Figura 16c](#)). Por último, se analizó el tiempo total de exploración y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ([Figura 16d](#)). No

se encontraron preferencias por las posiciones ni por algún objeto en particular durante el testeo ([Figura S6](#)). Tampoco se encontraron diferencias en la exploración durante el entrenamiento, aunque sí se observó una preferencia por una de las posiciones ([Figura S7](#)). Esto puede deberse a la acotada duración de la sesión de entrenamiento, que de todas formas no se vio reflejado en el testeo.

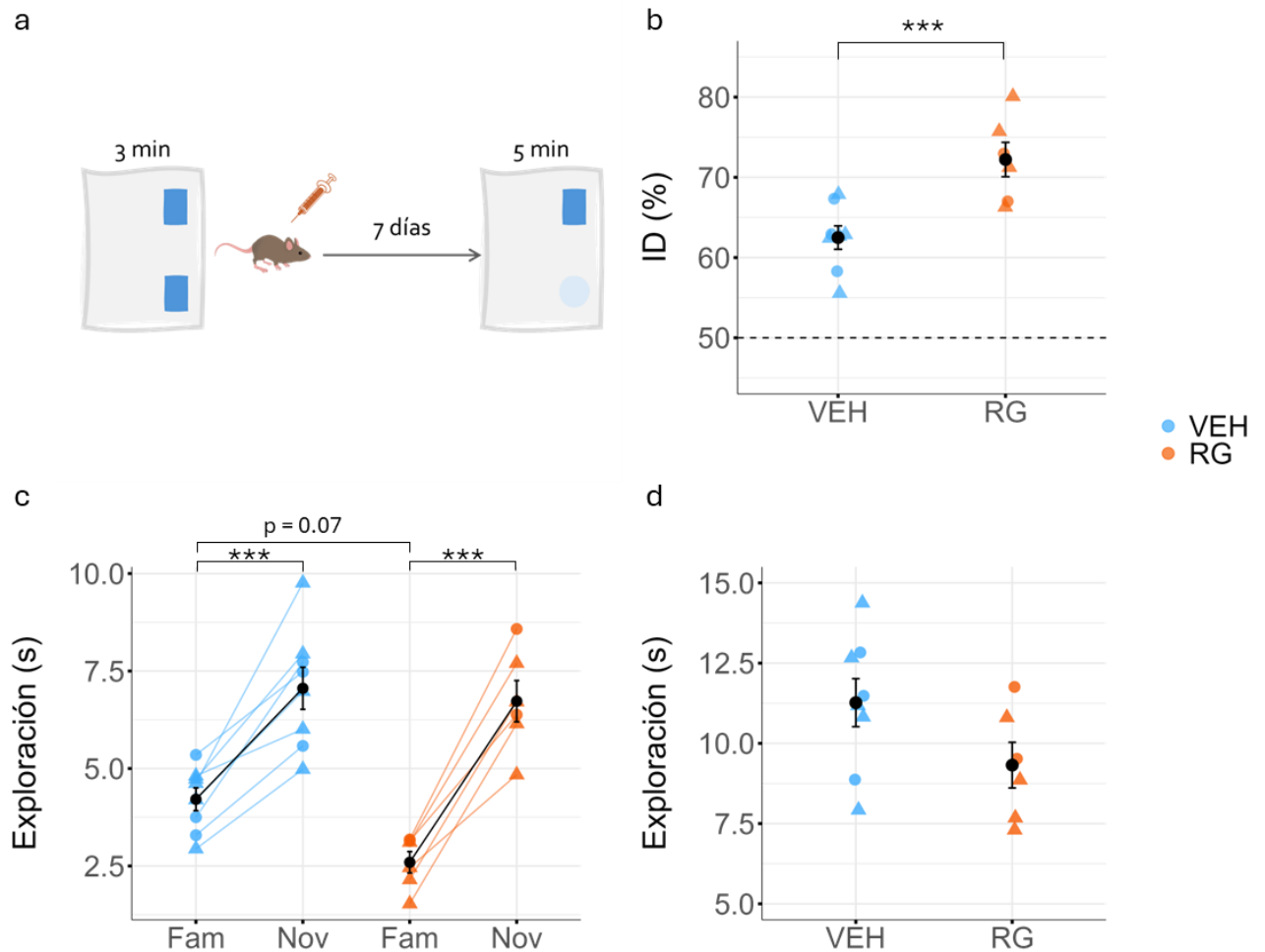


Figura 16. La inhibición de HDAC3 inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de NOR facilita la consolidación de una memoria persistente en ratones C57. (a) Diseño experimental. (b) Índice de discriminación (n = 6-8). Comparación de medias utilizando un GLMM seguido de ANOVA. (c) Tiempo de exploración de cada objeto. ANOVA de 2 factores con interacción tipo de objeto x tratamiento. Comparación entre tipo de objeto. (d) Tiempo total de exploración. En negro se grafica la media $\pm$ error estándar de cada grupo. En color se muestran los datos de cada individuo. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S10](#). * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Los resultados presentados en esta sección muestran que la inhibición farmacológica de HDAC3 mediante la administración sistémica de la droga RGFP966 facilita la formación de una memoria que persiste 7 días en la tarea de NOR, tanto en ratones CF1 como en C57. Más aún, esta facilitación se observa cuando la administración ocurre inmediatamente después o 6 horas después del entrenamiento, pero no en un punto intermedio o uno más tardío.

4.1.2 Miedo Condicionado

Para estudiar más en detalle el efecto de la inhibición sistémica de HDAC3 sobre la conducta, se realizó un experimento utilizando la tarea de Miedo Condicionado.

Brevemente, los animales recibieron un entrenamiento débil de 1 shock (TRd) pareado con un tono e inmediatamente después recibieron una inyección de RGFP966 o vehículo. La memoria contextual fue testada en el mismo contexto del entrenamiento en ausencia de tono 24hs, 7 días y 14 días después del entrenamiento. Por otro lado, la memoria de clave fue evaluada en un contexto diferente en presencia del tono al día siguiente del testeo de contexto, es decir, 48hs, 8 días y 15 días después del entrenamiento. Adicionalmente, se utilizó un grupo de animales que recibió un entrenamiento fuerte de 3 shocks (TRf) e inyectados con vehículo como control positivo de retención ([Figura 17a](#)).

Los animales no presentaron comportamiento de freezing antes del entrenamiento como puede observarse en los dos minutos previos a recibir el primer shock ([Figura 17b](#)). Al finalizar la sesión de entrenamiento solo el grupo que recibió 3 shocks presenta un aumento en el porcentaje de freezing ([Figura 17c](#)).

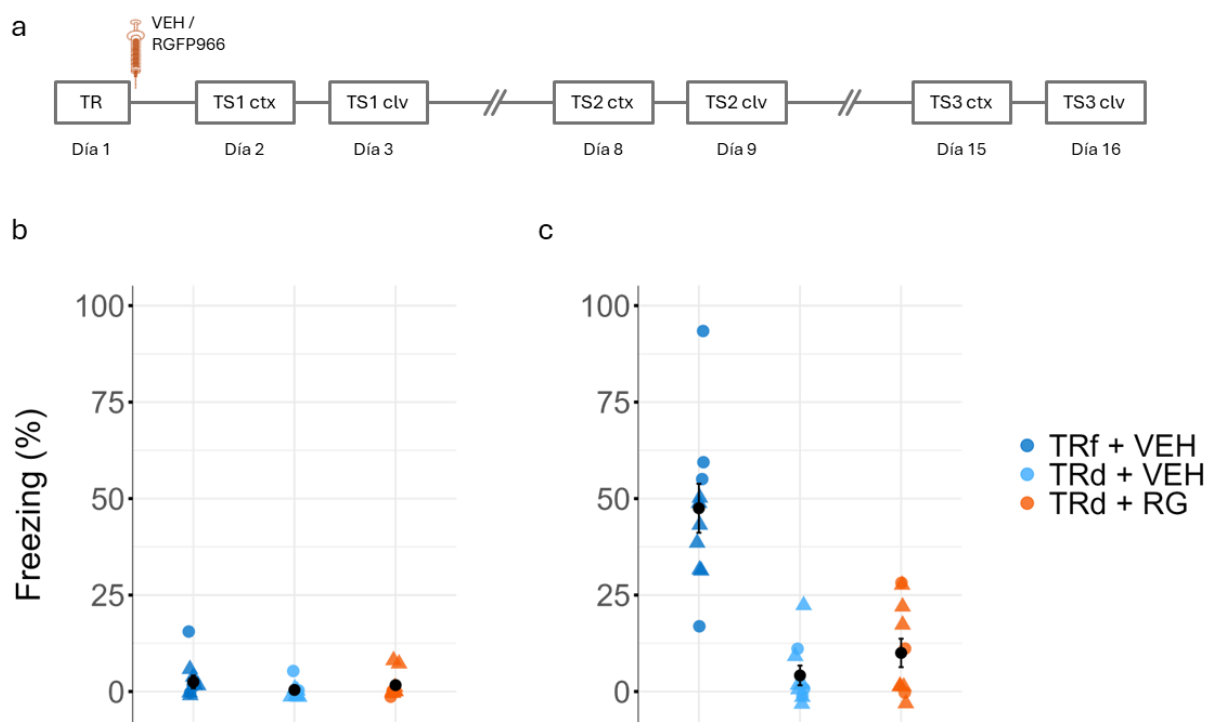


Figura 17. Diseño experimental para la tarea de Fear Conditioning. (a) Diseño experimental. Luego del entrenamiento los animales fueron testados para la memoria de contexto (ctx) y al día siguiente para la memoria de clave (clv). Los testeos se realizaron a las 24 horas, 7 días y 14 días después del entrenamiento. (b) Análisis del entrenamiento. A la izquierda se observan los niveles de Freezing

durante los 2 minutos previos a recibir el primer shock. A la derecha se observan los niveles de Freezing durante el último minuto del entrenamiento, luego de recibir todos los shocks (1 o 3 dependiendo del grupo). En negro se grafica la media $\pm$ error estándar de cada grupo. En color se muestran los datos de cada individuo. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S13](#).

Al evaluar la memoria contextual, se observa de manera general que el entrenamiento fuerte produce un aumento significativo en el comportamiento de freezing respecto de los animales que recibieron un entrenamiento débil, independientemente de la droga (Grupo x Testeo: $\chi^2(4) = 14.258$, $p < .01$). Este efecto se observa tanto a las 24 horas ([Figura 18a](#)) como a los 7 días ([Figura 18c](#)). A las dos semanas aún hay una diferencia significativa entre el grupo TRf y TRd RG ([Figura 18e](#)), aunque a ese tiempo se observa una marcada caída en los niveles de freezing de los animales que recibieron el entrenamiento fuerte ([Figura S8a y b](#)). En ninguno de los tres testeos se observó efecto de la droga sobre el porcentaje de freezing total. Por otro lado, se analizó el porcentaje de freezing en cada minuto de la sesión de testeo para determinar si hay diferencias en la dinámica del comportamiento a lo largo del tiempo que no están siendo consideradas al calcular el freezing total. Al analizar el comportamiento minuto a minuto se observan resultados similares que al evaluar el freezing total. A las 24 horas hay un efecto significativo del Grupo (TRf VEH, TRd VEH o TRd RG; $\chi^2(2) = 38.7457$, $p < .001$) y del Minuto ($\chi^2(4) = 27.484$, $p < .001$), pero no de su interacción ([Figura 18b](#)). Los contrastes indican que hay diferencias significativas entre los grupos TRf VEH y los otros dos grupos, pero no entre TRd VEH y TRd RG reafirmando que no hay un efecto de la droga. Por otro lado, también muestran que hay un decaimiento general del freezing a lo largo de la sesión de testeo independientemente del grupo (el detalle de los contrastes se encuentra en la [Tabla S14](#)). A los 7 días hay interacción significativa entre los factores Grupo y Minuto ($\chi^2(8) = 20.844$, $p < .01$), pero al realizar los contrastes entre tratamientos para cada minuto no se encontraron diferencias entre los grupos TRd inyectados con droga o vehículo, sino que éstas se deben a las diferencias entre TRf y los otros dos grupos con entrenamiento débil ([Figura 18d](#)). En el testeo de las dos semanas los niveles de freezing fueron muy bajos para todos los grupos a lo largo de toda la sesión por lo que no se pudieron realizar estimaciones confiables, pero los gráficos muestran que las curvas de los tres grupos son muy similares entre sí.

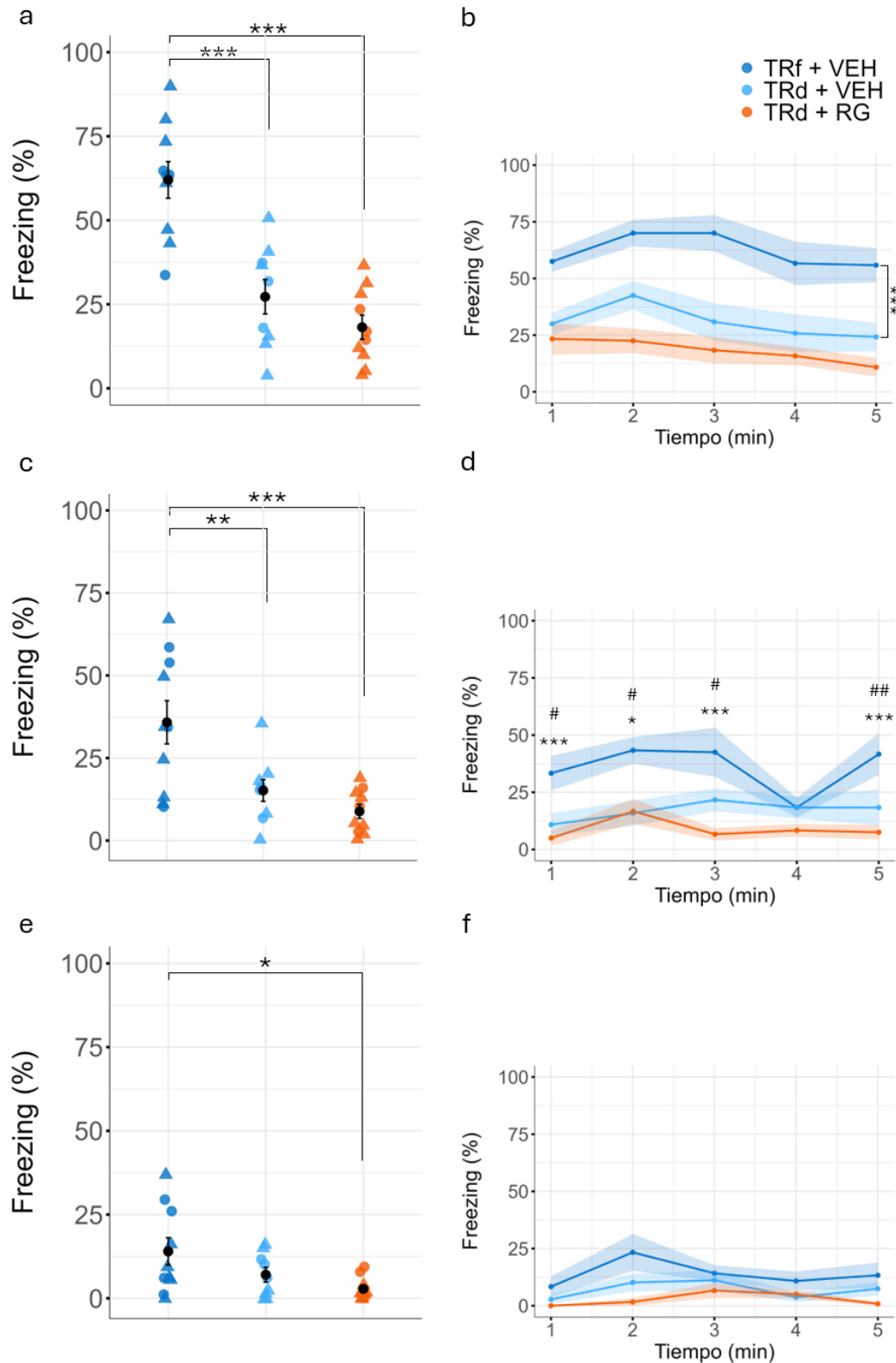


Figura 18. La administración sistémica de RGFP966 no tiene efecto sobre la memoria de condicionamiento de miedo contextual. (a) Porcentaje de freezing de cada grupo durante el testeo a las 24hs y el desglose por cada minuto de testeo **(b)**. **(c y d)** Porcentaje de freezing total y por cada minuto de testeo a los 7 días. # indican diferencias entre TRf VEH y TRd VEH, * indican diferencias

entre TRf VEH y TRd RG . **(e y f)** Porcentaje de freezing total y por cada minuto de testeo a las 2 semanas. En los gráficos de freezing total se muestra en negro la media $\pm$ error estándar. Cada punto representa un animal, los círculos son hembras y los triángulos machos. En los gráficos por minuto cada punto representa la media y el área sombreada es el error estándar. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S14](#). *p < .05, ** p < .01, *** p < .001

En cuanto a la memoria de clave, se observa de manera general que todos los animales presentan mayores niveles de freezing en presencia del tono indicando que hay memoria de clave, pero en ninguno de los testeos se observó un efecto del tratamiento con RGFP966 ([Figura 19 a, c y e](#)). Si bien la media del grupo TRf es más alta que en los otros dos grupos en todas las sesiones de testeo, solo a los 8 días esta diferencia es significativa ([Figura 19c](#)). Al analizar cada minuto del testeo durante la presentación del tono se observó un efecto significativo del Grupo y del Minuto pero no de su interacción, tanto a las 48 horas (Grupo: χ^2 (2) = 8.3506, p < .05; Minuto χ^2 (3) = 99.1659, p < .001; [Figura 19b](#)) como a los 8 días (Grupo: χ^2 (2) = 6.1698, p < .05; Minuto χ^2 (3) = 55.1575, p < .001; [Figura 19d](#)). Al igual que para la memoria de contexto, los contrastes post-hoc muestran que el efecto del Grupo corresponde a diferencias significativas entre el grupo TRf y los otros dos grupos con entrenamiento débil, mientras que el efecto del Minuto indica un decaimiento del freezing de manera global a lo largo de la sesión de testeo ([Figura S8c y d](#), [Tabla S15](#)).

En conjunto, estos resultados muestran que, bajo estas condiciones experimentales, la droga no produce un efecto facilitador de la memoria de miedo en ninguna de sus dos modalidades: contextual y de clave.

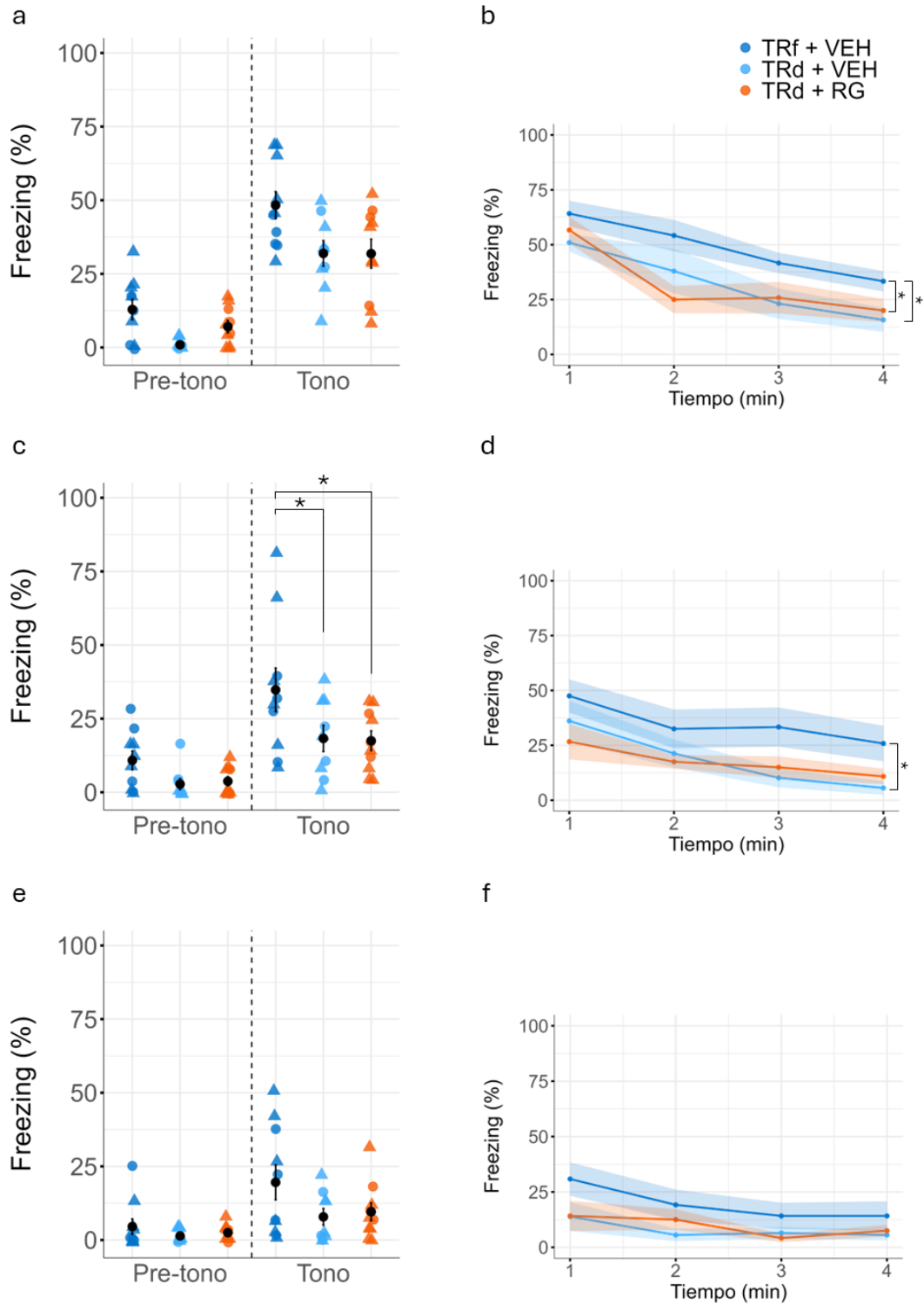


Figura 19. La administración sistémica de RGFP966 no tiene efecto sobre la memoria de condicionamiento de miedo de clave. (a) Porcentaje de freezing de cada grupo durante el testeo a las 24hs y el desglose por cada minuto de testeo durante la presentación del tono (b). (c y d) Porcentaje de freezing total y por cada minuto de testeo a los 7 días. (e y f) Porcentaje de freezing total y por cada minuto de testeo a las 2 semanas. En los gráficos de freezing total se muestra en negro la media $\pm$ error estándar. Cada punto representa un animal, los círculos son hembras y los triángulos machos.

En los gráficos por minuto cada punto representa la media y el área sombreada es el error estándar. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S15](#). * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

4.2 Nivel de acetilación de p65 y expresión de proteínas blanco de NF-kB y HDAC3

Considerando el efecto observado sobre la conducta en el paradigma de NOR, nuestro siguiente objetivo fue determinar qué cambios moleculares ocurren en el cerebro que dan como resultado la facilitación de la memoria.

Para ello se realizó un primer experimento en el cual machos y hembras C57 naive recibieron una inyección i.p. de RGFP966 o vehículo y a los 45 minutos fueron sacrificados para realizar extractos totales de hipocampo ([Figura 20a](#)) que fueron analizados mediante la técnica de western blot.

En primer lugar, se midieron los niveles de acetilación de p65 dado que, bajo nuestra hipótesis de trabajo, es uno de los targets directos de HDAC3. No se encontraron diferencias en la acetilación ([Figura 20b](#)) ni tampoco en la expresión ([Figura 20c](#)) de p65 entre los grupos. Por otro lado, se determinaron los niveles de Zif268 y BDNF, dos genes regulados tanto por HDAC3 como por NF-kB. En el caso de BDNF no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ([Figura 20e](#)), pero considerando que éste es un gen tardío es posible que 45 minutos no sea tiempo suficiente para observar cambios en los niveles de proteína. Por el contrario, se observó una disminución significativa en los niveles de Zif268 ($F_{(1, 2)} = 5.4673_{(1, 10.033)}$, $p < .05$; [Figura 20f](#)) que parece estar asociada al sexo, dado que dicha disminución se observa solo en los individuos macho mientras que las hembras presentan niveles bajos en ambos tratamientos. Esta posible presencia de un dimorfismo sexual se ve respaldada por el valor del CCI de 0.428 que indica que el 42.8% de la variabilidad observada entre los tratamientos se debe a diferencias entre los sexos. Aun así, la disminución observada en los machos es inesperada ya que, tratándose de un gen temprano relacionado con la memoria y un target de HDAC3, hubiéramos esperado que el tratamiento con RGFP966 produzca un aumento.

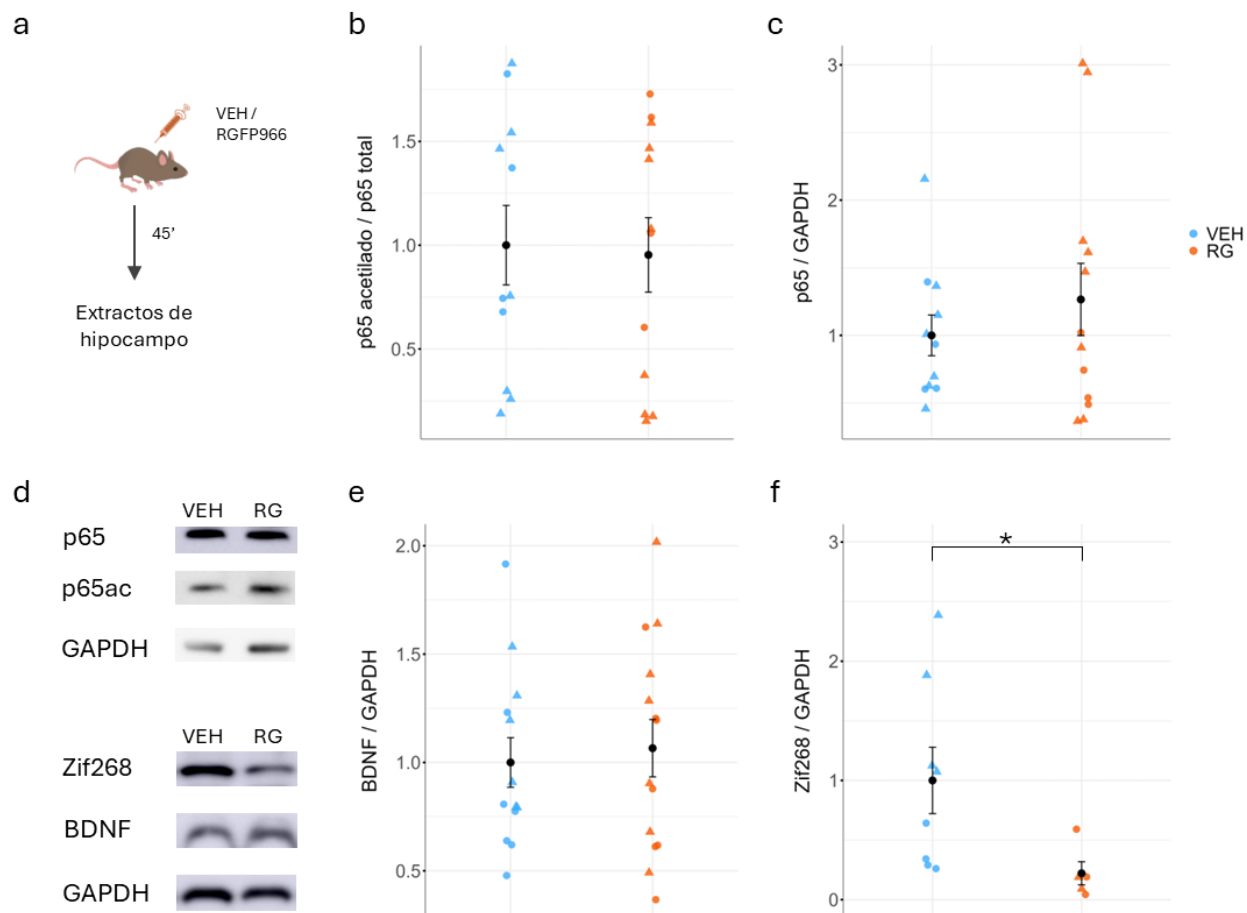
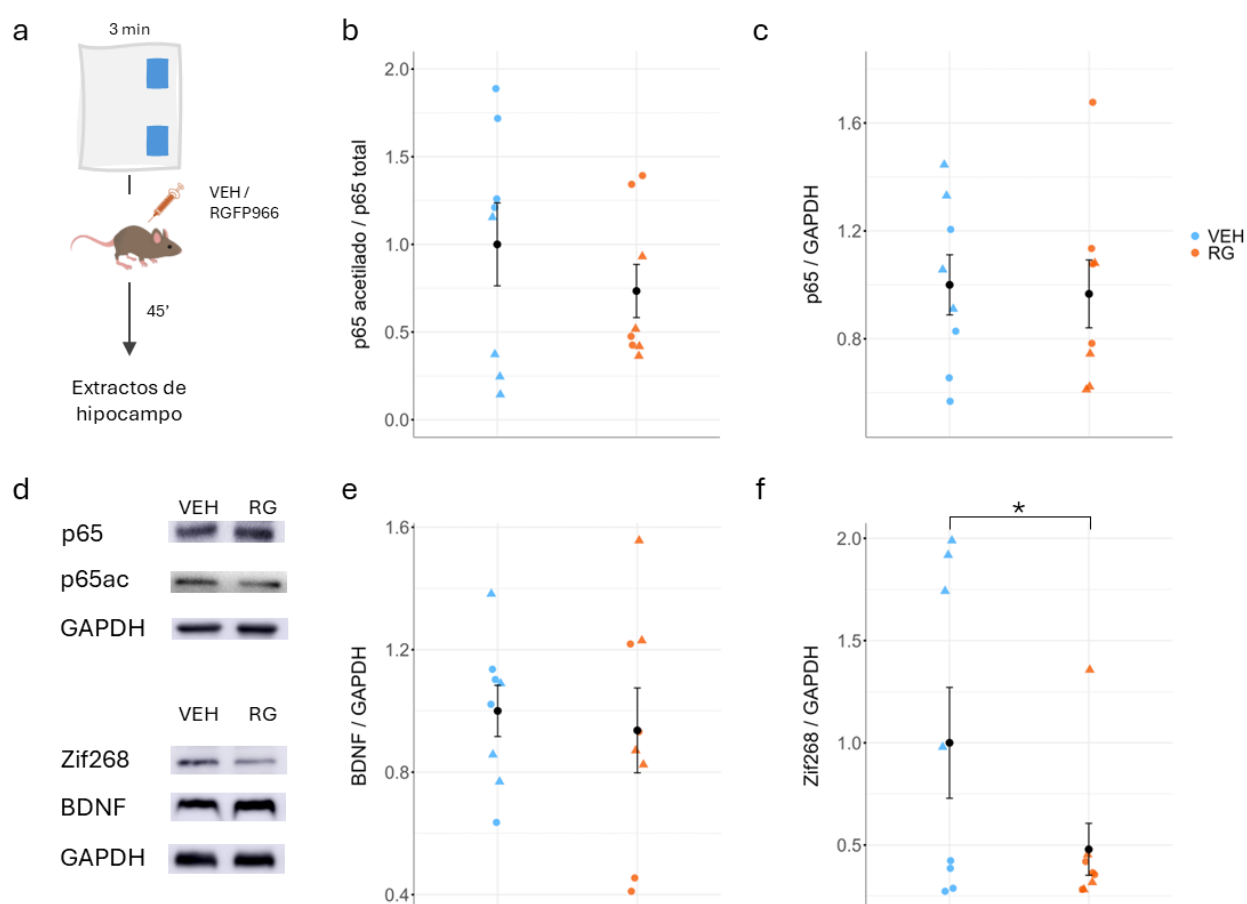


Figura 20. La inyección sistémica de RGFP966 produce una disminución en los niveles de Zif268 en el hipocampo de animales naive. (a) Diseño experimental. Los animales recibieron una inyección i.p. de droga o vehículo y a los 45 minutos fueron sacrificados para obtener extractos de proteínas del hipocampo. (b) Acetilación de p65 relativa a los niveles de p65 total. (c) Expresión de p65 medida como los niveles de p65 total relativo a los niveles de GAPDH. (d) Imágenes representativas de los western blots. (e) Niveles de BDNF. (f) Niveles de Zif268. Los gráficos muestran media $\pm$ error estándar. Los círculos corresponden a individuos hembra y los triángulos a individuos macho. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S16](#). * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Ahora bien, es posible que la experiencia de aprendizaje desencadene cambios moleculares sobre los cuales la droga hace efecto, y que al utilizar animales naive estos no puedan ser observados dado que falta la estimulación inducida por la tarea. Teniendo esto en cuenta, se realizó un segundo experimento para poder estudiar el correlato molecular de lo observado a nivel conductual, en el cual machos y hembras C57 recibieron un entrenamiento débil de 3 minutos en la tarea de NOR seguido de una inyección i.p. de droga o vehículo, y 45 minutos después fueron sacrificados para realizar los extractos de hipocampo ([Figura 21a](#)). Si bien no se observaron diferencias significativas en los niveles de acetilación de p65 entre los grupos

(Figura 21b), los datos presentan un CCI de 0.533 indicando que hay mucha variabilidad entre los sexos (53.3%), con lo cual podría haber un dimorfismo sexual. En este caso, habría que aumentar el tamaño muestral para poder realizar comparaciones confiables entre machos y hembras. Por otro lado, el tratamiento con la droga no produjo cambios en la expresión de p65 ni de BDNF (Figura 21c y e). Sin embargo, nuevamente se observa una disminución significativa en los niveles de Zif268 ($F_{(1,2)} = 5.4564_{(1,13)}$, $p < .05$; Figura 21f) que parece estar asociada a los machos dada la alta variabilidad entre sexos (CCI = 0.584).



Estos resultados no muestran un efecto claro de la droga sobre la acetilación de p65, pero parecen indicar que durante la consolidación la inhibición de HDAC3 podría producir cambios diferenciales en machos y hembras, como se observó para los resultados de la [Figura 21b](#). En cuanto a los niveles de expresión de p65 y BDNF no se encontró efecto de la droga ni variabilidad sustancial entre sexos. Esto no descarta que el tratamiento afecte los niveles de estas proteínas, pero al menos no lo hace a los 45 minutos de la inyección. Por último, se encontró de manera consistente una disminución en los niveles de Zif268 en respuesta a la droga, que parece estar asociada al sexo. Tanto en este último caso, como en el de la acetilación de p65 se necesitan experimentos para aumentar el tamaño muestral y así poder determinar con mayor precisión el efecto de la droga en machos y hembras.

4.3 Efecto de la inhibición de HDAC3 sobre NF- κ B. Análisis inmunohistoquímico.

Considerando que la acetilación de NF- κ B impide la unión a la proteína inhibidora I κ B y su posterior expulsión del núcleo, y que la desacetilación por parte de HDAC3 promueve este proceso, nos preguntamos si el tratamiento con RGFP966 produce un aumento en la cantidad de p65 nuclear, que termina dando como resultado la facilitación en la consolidación. Para responder a esta pregunta, realizamos un experimento de inmunofluorescencia en secciones de cerebro en el cual dos grupos de animales fueron entrenados en la tarea de NOR durante 3 minutos, inmediatamente después recibieron una inyección i.p. de droga o vehículo y a los 45 minutos de la inyección fueron perfundidos para obtener los cerebros ([Figura 22a](#)). Se estudió la intensidad y distribución de marca de p65 en distintas regiones cerebrales que están involucradas en la consolidación de esta memoria ([Figura 22b y c](#)).

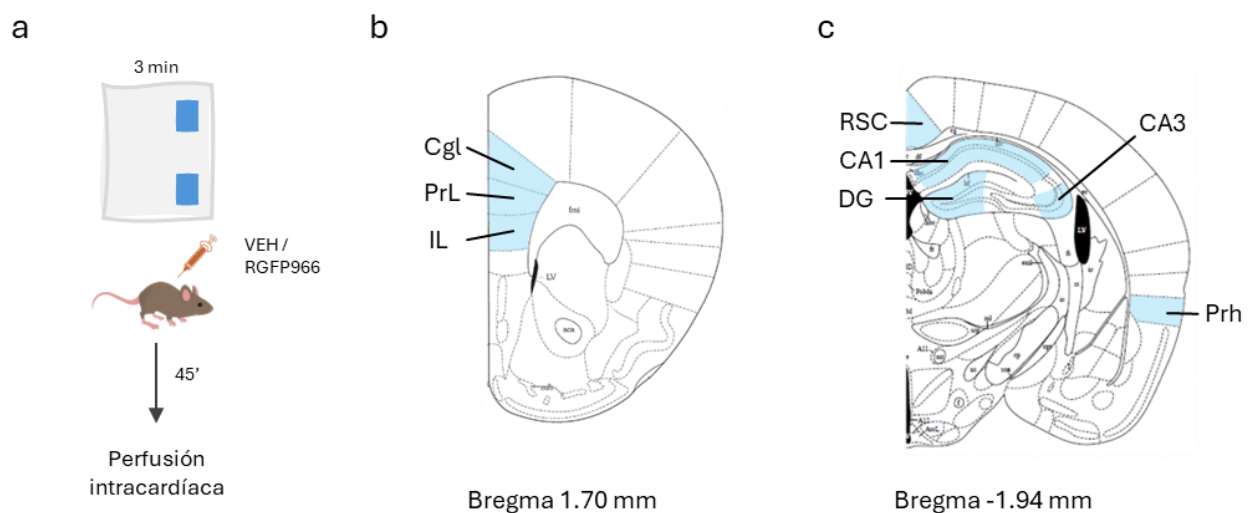


Figura 22. Regiones analizadas por inmunofluorescencia. (a) Diseño experimental. Los animales fueron entrenados durante 3 minutos, inmediatamente después recibieron una inyección i.p. de droga o vehículo y a los 45 minutos fueron perfundidos ($n = 3$). (b) Regiones de la corteza prefrontal (Cgl = Corteza cingulada anterior, PrL = Corteza prefrontal, IL = Corteza infralímbica). (c) Regiones del hipocampo (CA1, CA3 y DG = Giro dentado) y cortezas (RSC = Corteza retrosplenial, Prh = Corteza perirrinal). Los esquemas fueron adaptados de Paxinos & Franklin 2001. Debajo de cada imagen se muestra la distancia del bregma de cada corte.

Para determinar la cantidad de NF-kB nuclear, en primer lugar se midió la intensidad de fluorescencia media dentro del núcleo. Al medir la intensidad media en lugar de la intensidad total se está teniendo en consideración el tamaño de los núcleos, y así evitamos variaciones en la fluorescencia que pueden estar asociadas a distintos tamaños celulares en lugar de al efecto de la droga.

No se observó un efecto del tratamiento ni de la interacción entre el tratamiento y la región, pero sí se encontró efecto de la región, indicando que posiblemente hay distintas cantidades de NF-kB en distintas partes del cerebro (Tratamiento: $F_{(1, 2)} = 0.0522_{(1, 4)}$, $p = .8305$; Región: $F_{(1, 2)} = 23.1049_{(7, 108.9)}$, $p < .001$; Tratamiento x Región: $F_{(1, 2)} = 1.2881_{(7, 109.1)}$, $p = .2629$; [Figura 23](#)).

Observando los resultados se puede apreciar que el grupo RG presenta una variabilidad mayor en los datos en comparación con el grupo vehículo. Como aproximación para determinar si la variabilidad entre estos dos grupos es significativamente distinta comparamos dos modelos lineales, uno que asume varianzas homogéneas (m1) y otro que asigna varianzas distintas a cada tratamiento (m2) bajo la hipótesis de que, si las varianzas son efectivamente diferentes, el modelo m2 tendrá un mejor ajuste que el modelo m1. Esto se evaluó utilizando el criterio de información de Akaike (AIC). Considerando que el modelo con menor valor de AIC es el que mejor ajusta, en este caso el mejor modelo fue el que tenía una única varianza ($AIC_{m1} = 1484.6$; $AIC_{m2} = 1485.6$), con lo cual no se puede concluir que el tratamiento esté produciendo una mayor variabilidad en los niveles de intensidad nuclear.

Por otro lado, también se consideró la posibilidad de que la droga produzca cambios en una subpoblación de células y que al promediar los valores de toda la región este efecto se diluya. Para determinar si eso está sucediendo en este caso, se graficaron histogramas con la frecuencia de intensidades de cada núcleo, separado por región y tratamiento, con el fin de determinar si hay un cambio en la distribución de los datos. En el caso de que efectivamente hubiera una subpoblación de células en las que aumenta la intensidad, se esperaría que la distribución se ensanche o que aparezca una segunda moda, sin embargo, esto no se observó. Si bien las distribuciones son diferentes entre distintas regiones, las mismas son muy similares entre los grupos vehículo y RG ([Figura S9](#)).

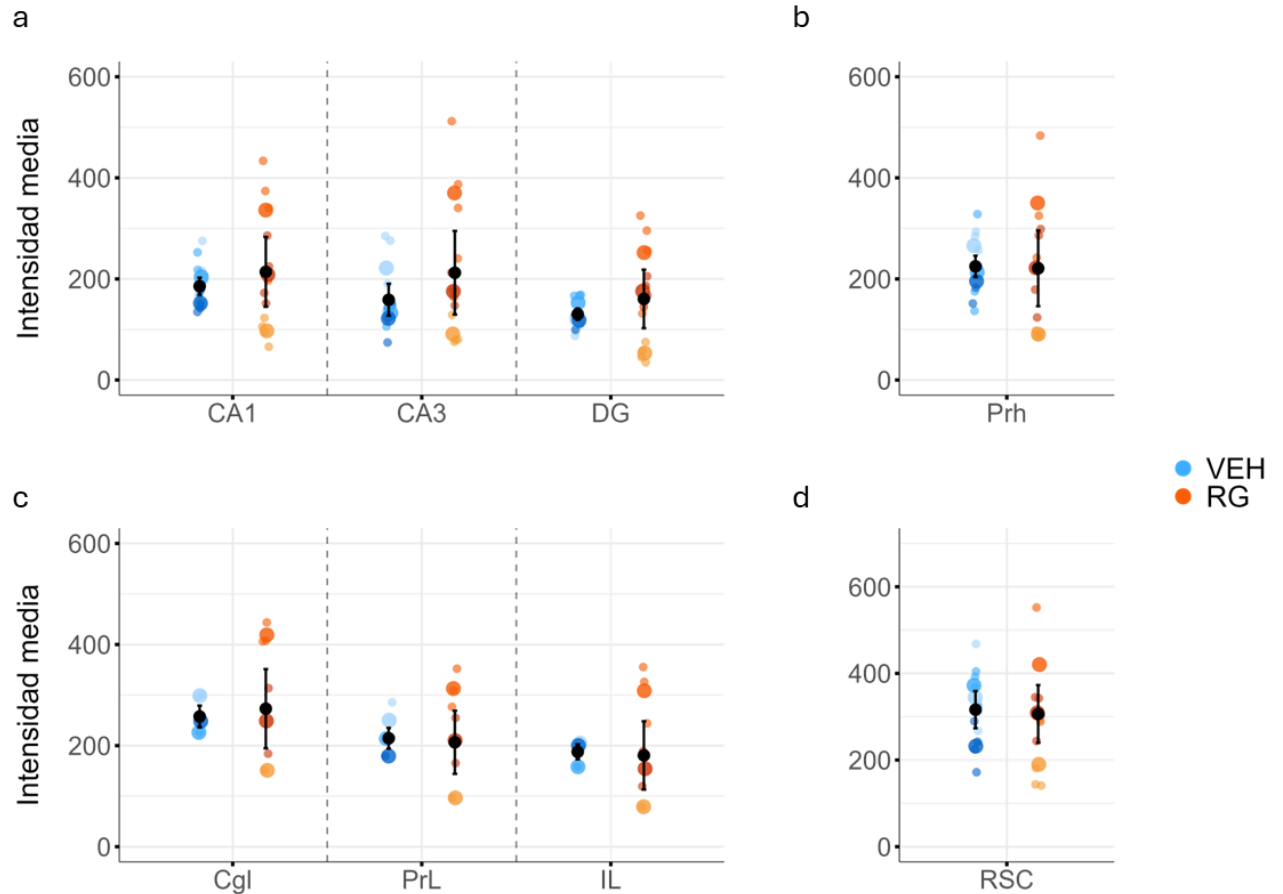


Figura 23. Intensidad de fluorescencia dentro del núcleo correspondiente a p65 en respuesta al tratamiento con RGFP966 luego de un entrenamiento débil en la tarea de NOR. (a) Hipocampo. (b) Corteza perirrinal. (c) Corteza prefrontal. (d) Corteza retrosplenial. Los círculos grandes de color representan la media de cada animal para cada región, los puntos pequeños representan cada observación individual y llevan el mismo color que el animal al que pertenecen. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S18](#).

Como la medida de la intensidad nuclear por sí sola puede estar sujeta a variaciones en la abundancia total de p65 entre animales, decidimos evaluar también el ratio de intensidad nuclear respecto de la intensidad total. En este caso se encontró un efecto tanto del tratamiento como de la región, pero no de su interacción (Tratamiento: $\chi^2 (1) = 6.2862$, $p < .05$; Región: $\chi^2 (7) = 258.8861$, $p < .001$; Tratamiento x Región: $\chi^2 (7) = 2.935$, $p = .9$). Al realizar los contrastes entre los grupos VEH y RG para cada una de las regiones, se encontró que hay un aumento significativo en el ratio en la región CA1 del hipocampo únicamente ([Figuras 23 y 24](#)). Esto, en conjunto con el resultado anterior, apunta a que hay un aumento en la translocación de NF- κ B al núcleo, pero que no se ve reflejado como un aumento absoluto en la intensidad nuclear, sino que hay una redistribución de la señal.

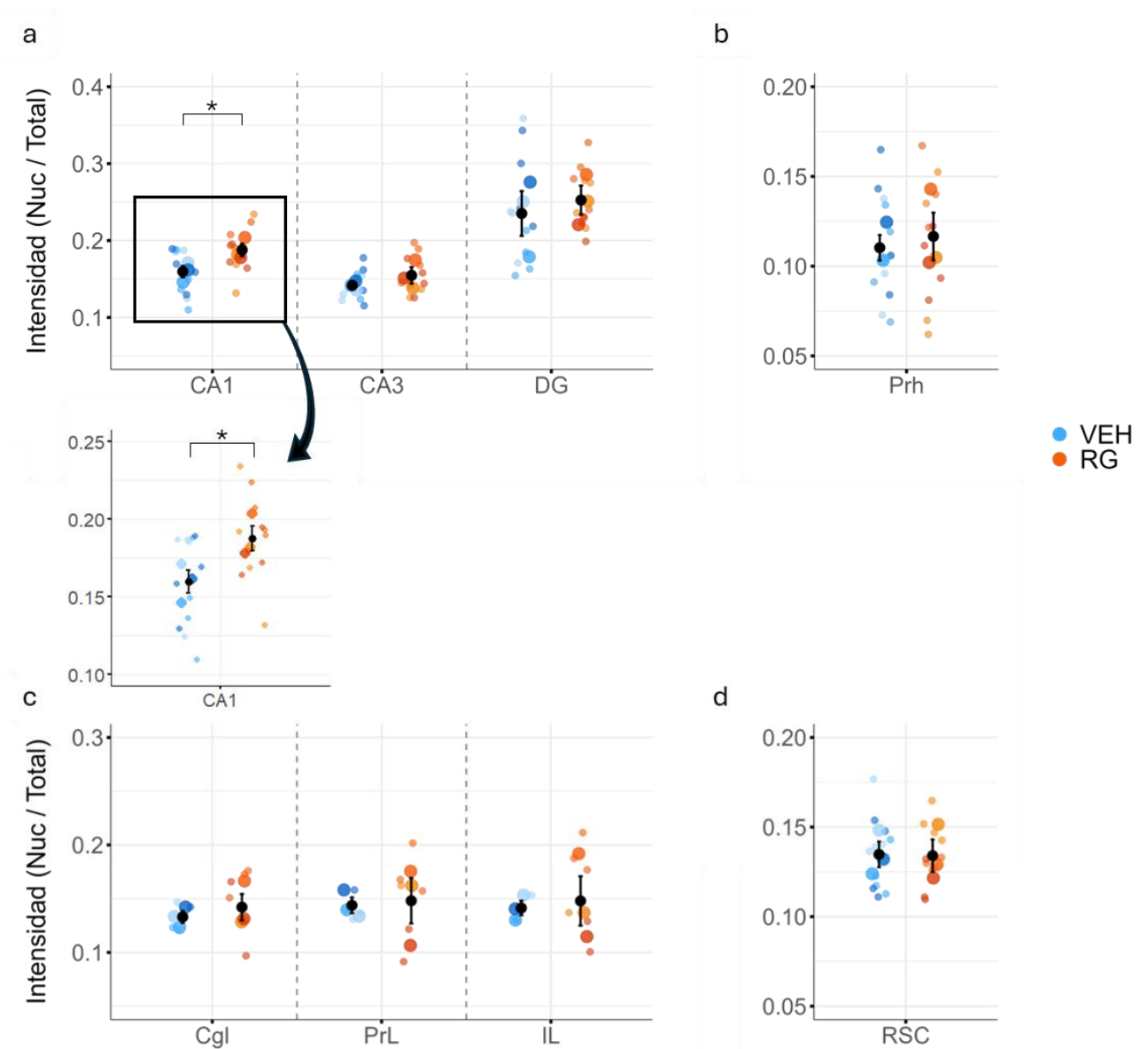


Figura 24. Proporción de fluorescencia nuclear (ratio núcleo / total) correspondiente a p65 en respuesta al tratamiento con RGFP966 luego de un entrenamiento débil en la tarea de NOR. (a) Hipocampo, debajo se muestra un detalle de los datos de CA1 en otra escala. **(b)** Corteza perirrinal. **(c)** Corteza prefrontal. **(d)** Corteza retrosplenial. Los círculos grandes de color representan la media de cada animal para cada región, los puntos pequeños representan cada observación individual y llevan el mismo color que el animal al que pertenecen. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S19](#). * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Cómo se observa en la [Figura 25](#), la marca de p65 no es homogénea, sino que se encuentra en forma de acúmulos o puntas conspicuas principalmente dentro de los núcleos. Teniendo esto en cuenta, decidimos analizar la cantidad de puntas por núcleo, su tamaño e intensidad, bajo la hipótesis de que tal vez el tratamiento produce una redistribución de la proteína dentro del núcleo, afectando de esta manera alguno de esos parámetros.

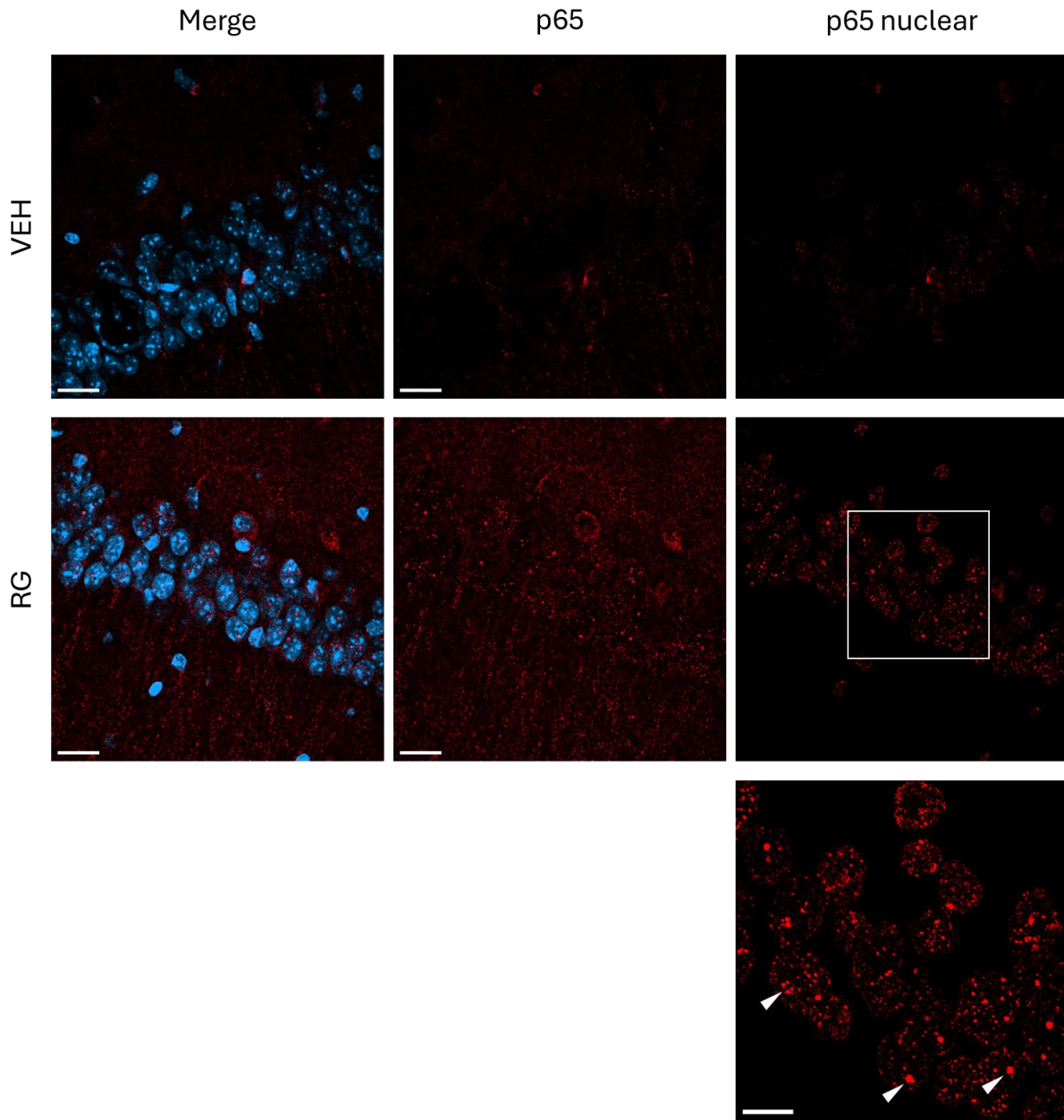


Figura 25. Señal de fluorescencia de p65 en la región CA1. Imágenes representativas de un animal inyectado con vehículo y otro inyectado con RGFP966. A la izquierda se observa la señal de p65 y de los núcleos teñidos con DAPI; en el centro, la señal total de p65; y a la derecha la señal de p65 dentro de la máscara de los núcleos. En la última fila se muestra un detalle ampliado de la sección marcada en el recuadro. Las puntas de flecha muestran las puntas de p65. La barra de escala equivale a 20µm excepto en el detalle de los núcleos donde equivale a 10µm. Imágenes representativas de todas las regiones pueden encontrarse en este [link](#).

En primer lugar, se midió el número de puntas por núcleo. Dado que había mucha heterogeneidad entre las distintas regiones de estudio, se analizó cada una de ellas por separado para poder realizar las comparaciones estadísticas. Tanto en el hipocampo como en la corteza prefrontal se encontró una interacción significativa entre el tratamiento y la subregión ([Figura 26a y c](#); Hipocampo: $\chi^2 (2) = 215.5434$, $p < .001$; Corteza prefrontal: $\chi^2 (2) = 173.1276$, $p < .001$) pero al realizar los contrastes post-hoc solo se hallaron diferencias significativas entre la droga y el vehículo en las cortezas prelímbica e infralímbica ([Figura 26c](#)). En las cortezas perirrinal y retrosplenial tampoco se hallaron diferencias ([Figura 26b y d](#)). Al analizar la distribución de los datos no se observaron diferencias entre los grupos RG y vehículo para ninguna de las áreas ([Figura S10](#)).

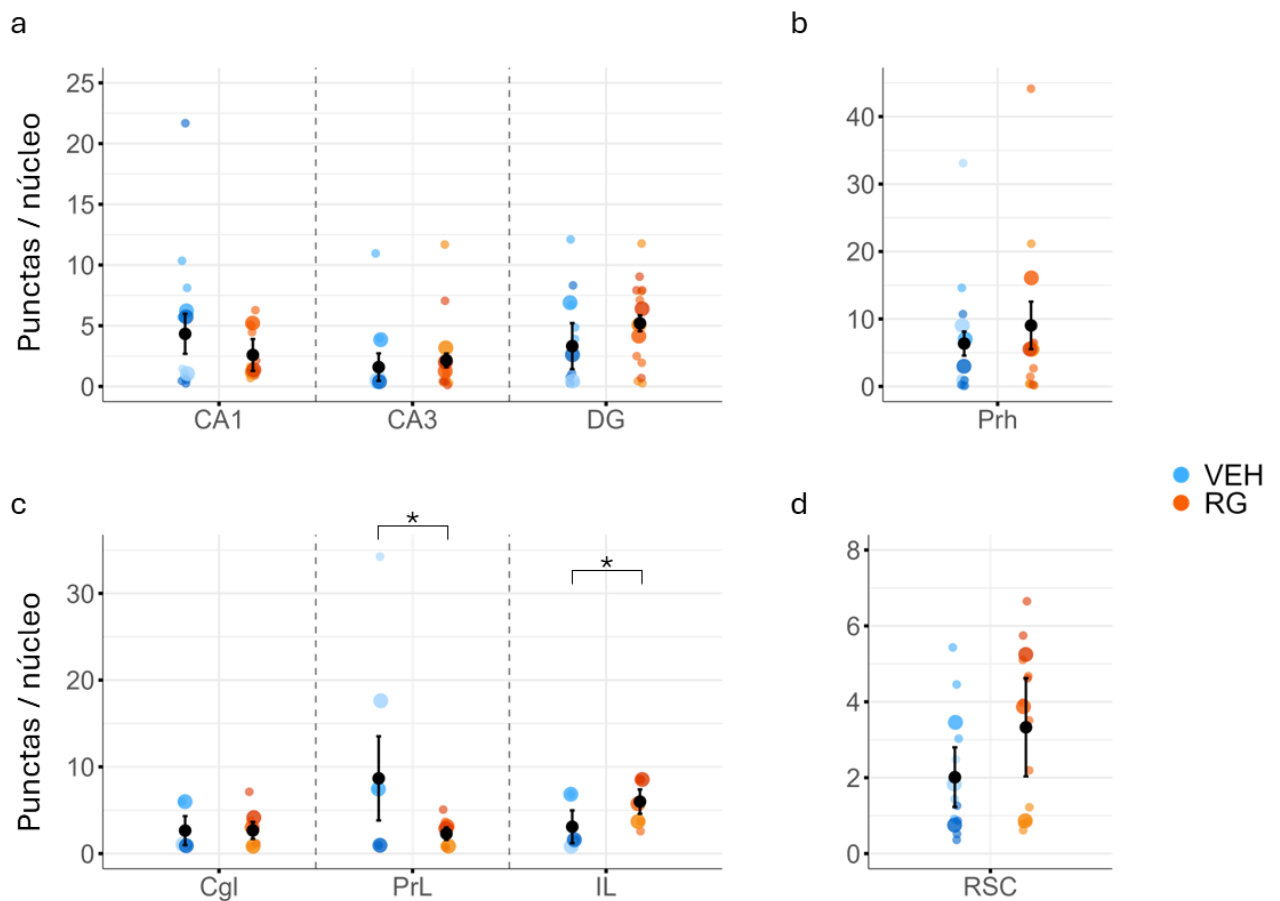


Figura 26. Número de puntas de p65 por núcleo. (a) Hipocampo. (b) Corteza perirrinal. (c) Corteza prefrontal. (d) Corteza retrosplenial. Los círculos grandes de color representan la media de cada animal para cada región, los puntos pequeños representan cada observación individual y llevan el mismo color que el animal al que pertenecen. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S20](#). * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Por otro lado, se midió el tamaño y la intensidad de las puntas para determinar si el tratamiento produce una modificación en el estado de agregación de la proteína dentro del núcleo. Para determinar el tamaño, se midió tanto la superficie como el volumen, pero al tratarse de estructuras bastante esféricas, los resultados son muy similares y por lo tanto, solo se muestran las medidas de superficie. El resultado del ANOVA muestra un efecto significativo de la región ($F_{(1, 2)} = 6.3443_{(7, 115)}$, $p < .001$), mientras que la interacción región x tratamiento está al borde de la significancia ($F_{(1, 2)} = 2.0467_{(7, 115)}$, $p = .055$). Los contrastes entre droga y vehículo para cada región muestran una disminución significativa en la superficie de las puntas en la corteza perirrinal ([Figura 27b](#)). En el resto de las regiones no hay diferencias entre tratamientos ([Figura 27a, c y d](#)). Tampoco se observaron modificaciones en la distribución de los datos ([Figura S11](#)). Es interesante notar que en los histogramas de la [Figura S11](#) se observa también la disminución y el aumento en el número de puntas de las cortezas prelímbica e infralímbica respectivamente, mencionados anteriormente en la [Figura 26c](#).

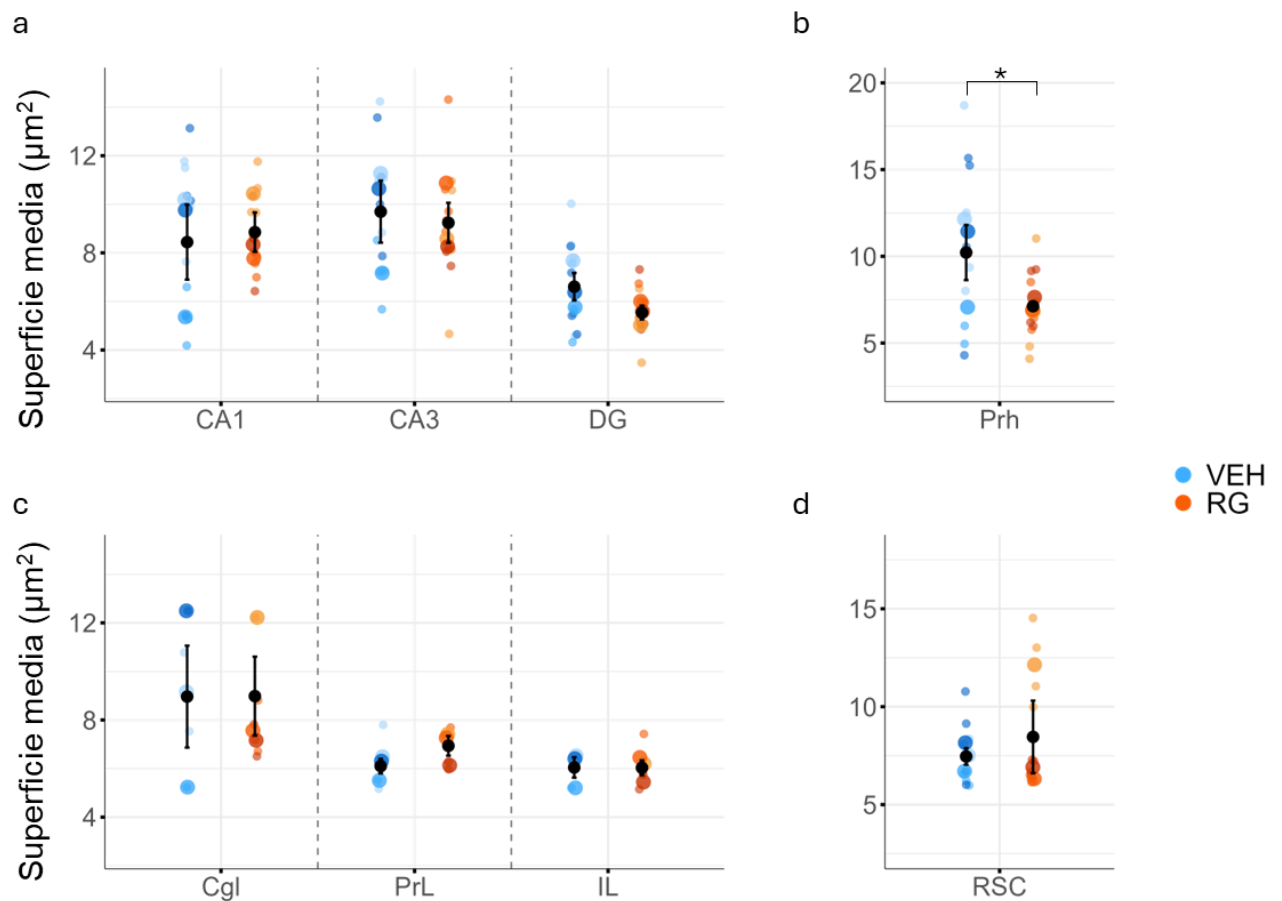


Figura 27. Tamaño de las puntas en unidades de superficie (µm²). (a) Hipocampo. (b) Corteza perirrinal. (c) Corteza prefrontal. (d) Corteza retrosplenial. Los círculos grandes de color representan la media de cada animal para cada región, los puntos pequeños representan cada observación

individual y llevan el mismo color que el animal al que pertenecen. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S21](#). * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

En cuanto a la intensidad de fluorescencia de las puntas, no se encontraron diferencias entre los tratamientos, solo hay un efecto significativo de la región ($F_{(1, 2)} = 5.4785_{(7, 114.8)}$, $p < .001$; [Figura 28](#)). Sin embargo, al analizar la distribución de intensidades hay un corrimiento hacia intensidades más altas, evidenciado por un ensanchamiento en la distribución como se observa para el giro dentado, o un aumento en un segundo pico como ocurre en la corteza prefrontal ([Figura 29](#)).

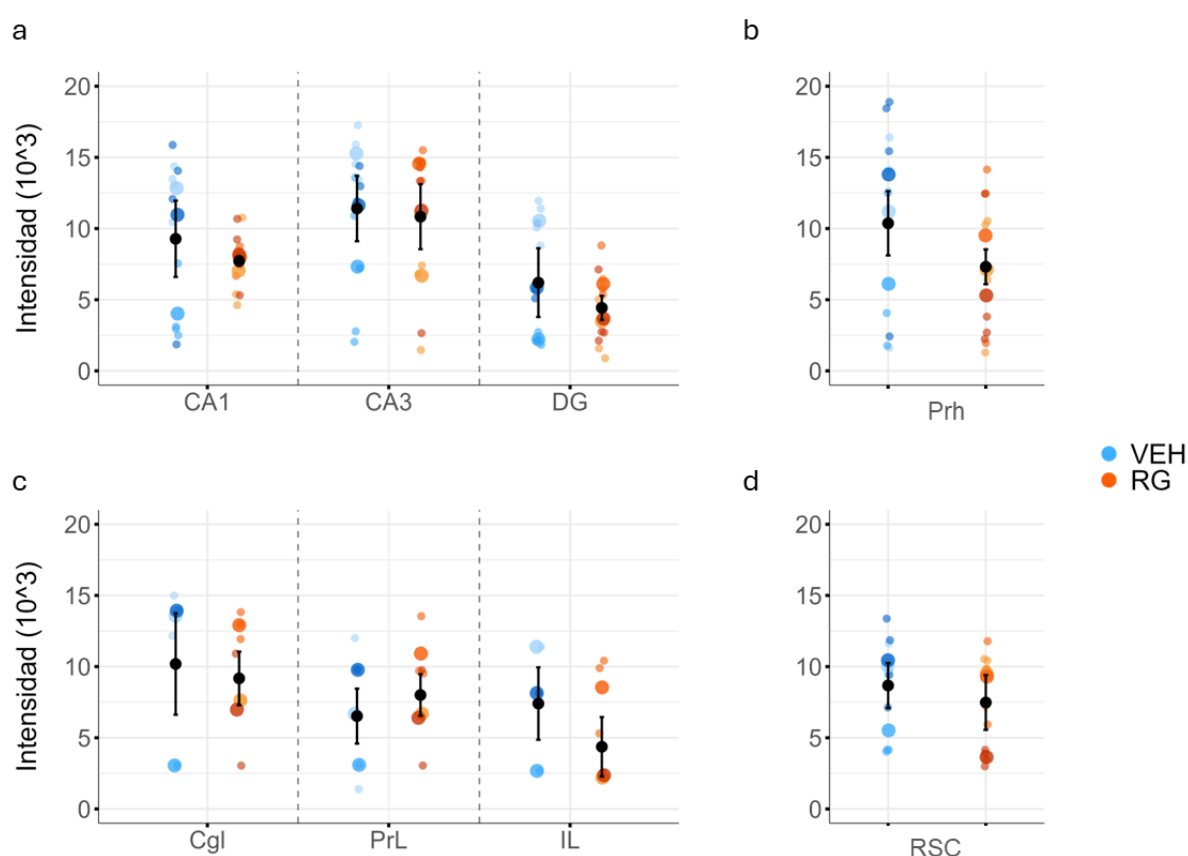


Figura 28. Intensidad de las puntas. (a) Hipocampo. (b) Corteza perirrinal. (c) Corteza prefrontal. (d) Corteza retrosplenial. Los círculos grandes de color representan la media de cada animal para cada región, los puntos pequeños representan cada observación individual y llevan el mismo color que el animal al que pertenecen. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S22](#).

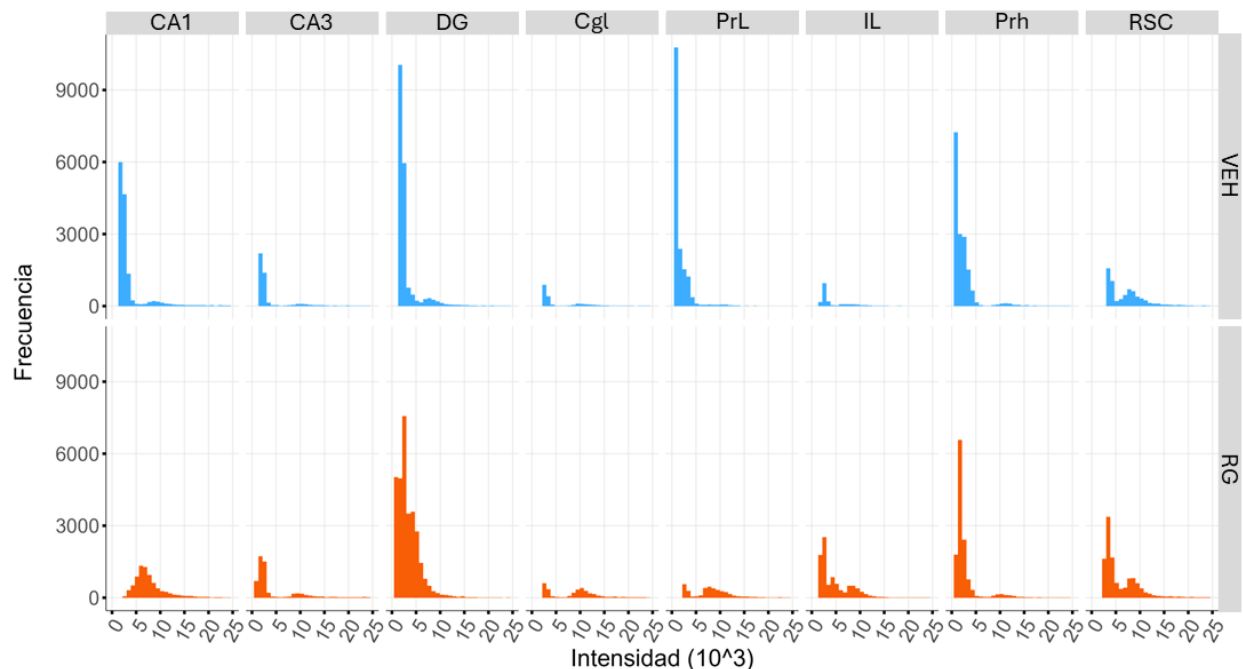


Figura 29. Distribución de intensidad de las puntas de p65 dentro del núcleo.

En resumen, en esta sección se estudió el efecto de la administración sistémica del inhibidor de HDAC3 RGFP966 luego de un entrenamiento débil en la tarea de NOR sobre la distribución de p65 en distintas regiones del cerebro.

Si bien no se encontraron diferencias en la intensidad de fluorescencia dentro del núcleo entre los tratamientos, se evaluó la posibilidad de que el efecto de la droga ocurra únicamente en una subpoblación de células que no es visible al analizar los promedios. Para ello se observó la distribución de los datos de intensidad, pero no se encontraron cambios en la distribución entre el grupo inyectado con la droga y el grupo control. Por el contrario, al evaluar la proporción de señal nuclear calculando un ratio de fluorescencia núcleo/total se encontró un aumento en la región CA1 del hipocampo. Esto puede deberse a un aumento en la translocación de NF- κ B al núcleo que podría constituir uno de los mecanismos mediante el cual la droga produce su efecto facilitador sobre la memoria.

Por último, considerando que la señal se encontró en forma de agregados, decidimos medir distintas variables como la cantidad, tamaño e intensidad de los mismos, para determinar si el tratamiento produce cambios en la distribución de NF- κ B dentro del núcleo. Se registró una disminución en el tamaño de las puntas en la corteza perirrinal acompañado por una disminución cualitativa de la intensidad media de las puntas en respuesta al tratamiento con RG. También se observaron modificaciones en el número de puntas por núcleo en las

regiones pre e infralímbicas de la corteza prefrontal. Estos cambios en la señal podrían estar relacionados con la regulación de la actividad del factor de transcripción dado que hay evidencias que muestran que éstos pueden formar condensados que están relacionados con su actividad (Stark & Dunlop 2005).

5. Resultados

Estudio farmacológico de la participación de NF- κ B en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objeto novedoso

5.1 Efecto de la inhibición de NF- κ B sobre la memoria de reconocimiento de objeto

Para estudiar el efecto de la inhibición de NF- κ B sobre la memoria, se realizó una primera aproximación utilizando el inhibidor Sulfasalazina, previamente utilizado de manera localizada, esta vez administrado de manera sistémica.

Para ello se utilizaron ratones macho adultos de la línea CF1, y se realizaron tres experimentos independientes probando distintas dosis, dado que se observó que la curva dosis-respuesta a la Sulfasalazina presenta forma de U. Los animales fueron sometidos a un entrenamiento fuerte de 15 minutos e inmediatamente después recibieron una inyección i.p. de Sulfasalazina (SSZ) o vehículo (VEH). La memoria fue evaluada 7 días después ([Figura 30a](#)). No se observó efecto sobre la memoria con ninguna de las tres dosis utilizadas ([Figura 30b, c y d](#)) y en todos los casos los animales presentaron niveles altos de retención.

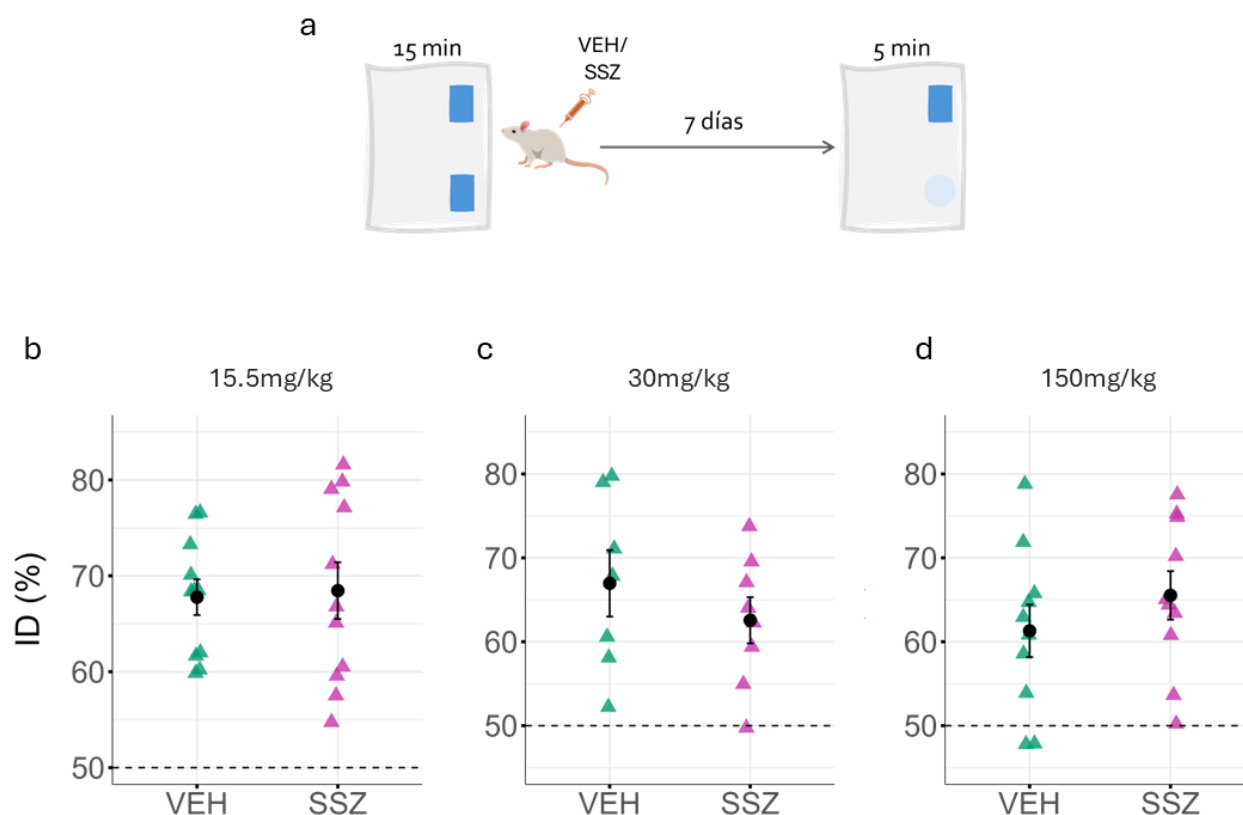


Figura 30. La administración sistémica de Sulfasalazina no tiene efecto sobre la memoria de NOR a los 7 días. (a) Diseño experimental. Los animales fueron entrenados durante 15 minutos, inmediatamente después recibieron una inyección i.p. de droga o vehículo y se evaluó la memoria una semana después. Índice de discriminación de los grupos VEH o SSZ para las dosis de **(b)** 15.5mg/kg

(n = 11), **(c)** 30mg/kg (n = 7-8) y **(d)** 150mg/kg (n = 10). Los triángulos representan cada observación individual. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. Las comparaciones se realizaron utilizando un GLMM seguido de ANOVA. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tablas S23](#), [S24](#) y [S25](#).

Dado que no se observó efecto de la Sulfasalazina decidimos probar otro inhibidor de NF-kB, el compuesto BAY 11-7082.

Los animales fueron entrenados durante 15 minutos en la tarea de NOR e inmediatamente después recibieron una inyección i.p. de droga o vehículo. La memoria fue evaluada a los 7 días ([Figura 31a](#) - TS1). Dado que no se observaron diferencias significativas en cuanto al índice de discriminación y ambos grupos presentan buena retención, reflejada en la mayor exploración del objeto novedoso respecto del familiar, se decidió testear a los mismos animales una segunda vez una semana después del primer testeo, es decir, dos semanas después del entrenamiento ([Figura 31a](#) - TS2) para evaluar la posibilidad de que la droga esté teniendo un efecto sobre la persistencia que se evidencie de manera más tardía. Teniendo esto en cuenta, se realizó un análisis de medidas repetidas con los factores Tratamiento (BAY o vehículo) y Sesión (Testeo 1 o 2). Se observó un efecto significativo de la sesión sobre el ID ($\chi^2(1) = 8.8915$, $p < .01$), pero no así del tratamiento o su interacción. Esto quiere decir que la memoria decae con el paso del tiempo y lo hace por igual tanto para los animales inyectados con vehículo como para los que recibieron la droga ([Figura 31b](#)).

Al analizar el tiempo de exploración para cada uno de los objetos se observa claramente que todos los animales pasaron más tiempo explorando el objeto novedoso por sobre el familiar, aunque la exploración decae entre el primer y segundo testeo ([Figura 31c](#)). El análisis estadístico muestra una interacción significativa entre la sesión y el tipo de objeto (familiar o novedoso) ($\chi^2(1) = 21.5785$, $p < .001$). Al realizar las comparaciones se encontró que, de manera global, los animales exploraron significativamente más tiempo el objeto novedoso que el familiar tanto en el testeo 1 ($p < .001$) como en el testeo 2 ($p < .001$), y que disminuyó significativamente la exploración del objeto novedoso en el segundo testeo respecto del primero ($p < .001$). Por otro lado, se encontró un efecto significativo del tratamiento ($\chi^2(1) = 4.5955$, $p = .03$), que al hacer las comparaciones entre droga y vehículo arroja un p-valor de 0.04. Esto indica que, la exploración global de todos los objetos en ambos testeos es significativamente menor en el grupo vehículo respecto del grupo inyectado con BAY. Este hecho se ve más claramente al analizar el tiempo total de exploración ([Figura 31d](#)), donde puede observarse que los animales del grupo inyectado con BAY exploraron más que los del grupo vehículo en el primer testeo. Al hacer el análisis no se encontró una interacción

significativa entre el tratamiento y la sesión, pero sí hay un efecto de los factores por separado (efectos principales: Tratamiento: $\chi^2(1) = 5.0605$, $p = .02$; Sesión: $\chi^2(1) = 53.0581$, $p < .001$). Esto, por un lado, corrobora que los animales del grupo inyectado con BAY exploraron más tiempo que los del grupo control ($p < .05$), mientras que muestra que el tiempo de exploración decae significativamente entre un testeo y el siguiente ($p < .001$).

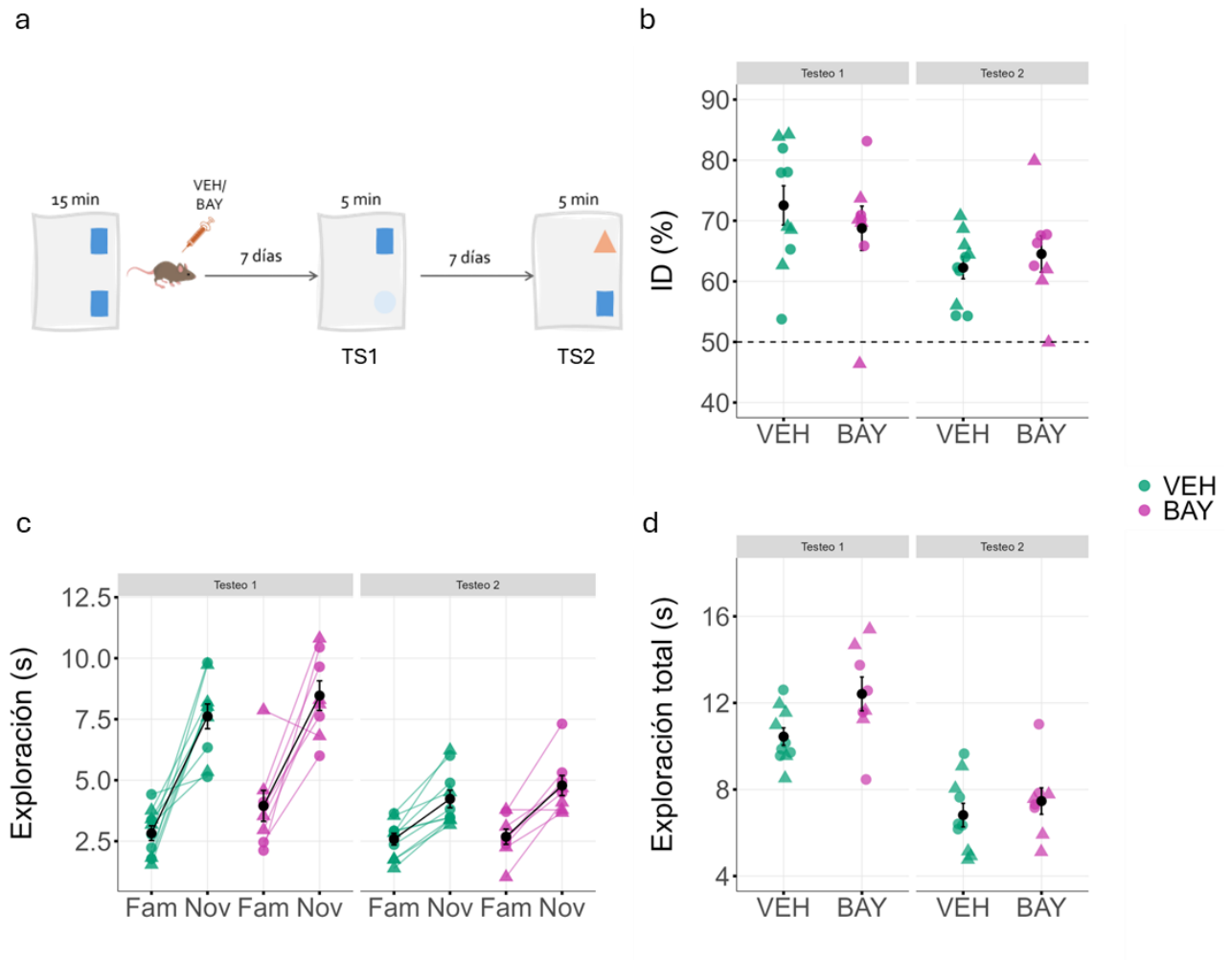


Figura 31. La administración sistémica del inhibidor de NF- κ B BAY 11-7082 no tiene efecto sobre la consolidación de la memoria de NOR evaluada una y dos semanas después del entrenamiento. (a) Diseño experimental. Los animales fueron entrenados durante 15 minutos, inmediatamente después recibieron una inyección i.p. de droga o vehículo y se evaluó la memoria una y dos semanas después. (b) Índice de discriminación. (c) Tiempo de exploración de cada objeto. (d) Tiempo total de exploración. Los triángulos corresponden a individuos macho y los círculos a individuos hembra. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S26](#).

Si bien no se observó efecto de la droga cuando se la administró de manera sistémica, puede que esto esté relacionado con la capacidad que tiene de atravesar la barrera hematoencefálica. Por tal motivo, probamos la inyección localizada en el hipocampo. Para ello, se realizó un experimento en el cual los animales fueron sometidos a una cirugía estereotáxica para la implantación de cánulas en la región CA1 del hipocampo. Luego de una semana de recuperación, recibieron un entrenamiento de 15 minutos e inmediatamente después fueron inyectados de manera bilateral con droga o vehículo. La memoria se evaluó una semana después del entrenamiento ([Figura 32a](#)). Al evaluar el índice de discriminación se encontró una disminución significativa en el grupo inyectado con BAY respecto del grupo control ($ID_{VEH} = 73.4 \pm 3.17\%$; $ID_{BAY} = 65.1 \pm 2.4\%$; $\chi^2(1) = 5.4637$, $p < .05$; [Figura 32b](#)). Por otro lado, al analizar el tiempo de exploración de cada objeto, no se observó interacción entre el tratamiento y el tipo de objeto, pero los efectos principales sí son significativos (Tratamiento: $\chi^2(1) = 9.8999$, $p < .001$; Tipo de objeto: $\chi^2(1) = 46.3924$, $p < .001$), indicando que, a pesar del déficit observado a nivel del ID, los animales presentan memoria independientemente del tratamiento dado que exploran más el objeto novedoso que el familiar (VEH: $t_{familiar} = 1.84 \pm 0.24s$, $t_{novedoso} = 5.34 \pm 0.72s$; BAY: $t_{familiar} = 3.23 \pm 0.36s$, $t_{novedoso} = 5.94 \pm 0.5s$; [Figura 32c](#)). En cuanto al tiempo total de exploración, hay un aumento no significativo en el grupo BAY respecto del grupo control ($\chi^2(1) = 3.5506$, $p = .06$; [Figura 32d](#)). Al evaluar las preferencias de posición y objeto durante el testeó, se observa que los animales del grupo vehículo exploran más el LEGO que el vaso, independientemente de si éste es familiar o novedoso ([Figura S12](#)). Esto puede deberse a que algunos animales fueron eliminados del experimento debido al posicionamiento de las cánulas, generando un desbalance en el diseño. Por último, se evaluó el comportamiento durante el entrenamiento, en el cual no se observaron preferencias, pero sí se encontraron diferencias en el tiempo total de exploración entre los grupos ([Figura S13](#)). Estos resultados muestran que, si bien ambos grupos muestran memoria, determinada por la mayor exploración del objeto novedoso, la inhibición de NF-kB parece afectar el nivel de retención, expresado como una mayor exploración del objeto familiar y, por consiguiente, un menor ID.

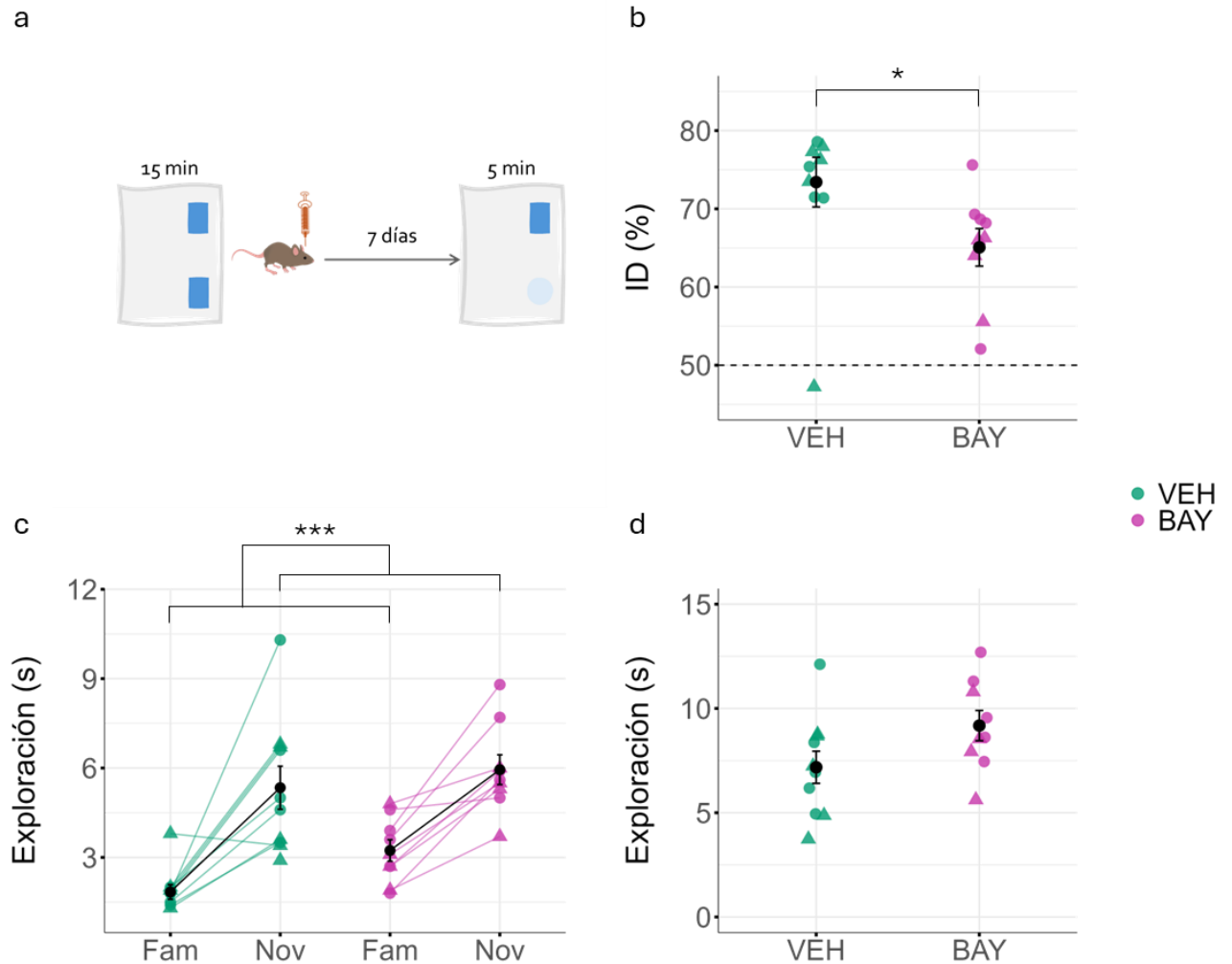


Figura 32. La inyección intrahipocampal de BAY 11-7082 inmediatamente después del entrenamiento produce un déficit en la memoria de reconocimiento de objeto. (a) Diseño experimental. Los animales recibieron un entrenamiento fuerte de 15 minutos e inmediatamente después recibieron una inyección localizada de BAY 11-7082 o vehículo. **(b)** Disminución del índice de discriminación. **(c)** Tiempo de exploración de los objetos familiar y novedoso. En ambos grupos hay una mayor exploración del objeto novedoso respecto del familiar. El grupo inyectado con BAY explora el objeto familiar más tiempo que el grupo VEH, lo cual da cuenta de la diferencia en el índice de discriminación. **(d)** No se observan diferencias en el tiempo total de exploración entre los grupos. Círculos: hembras. Triángulos: machos. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S27](#). * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Dado el déficit observado en respuesta a la inhibición de NF- κ B inmediatamente después del entrenamiento, nos interesó determinar si la inhibición en otros tiempos tiene el mismo efecto. Para ello se realizaron dos experimentos independientes, en uno se inyectó el inhibidor 3 horas después del entrenamiento y en el otro, 6 horas después.

La inyección a las 3 horas no genera diferencias en el índice de discriminación ($ID_{VEH} = 61.4 \pm 8.24\%$; $ID_{BAY} = 70.6 \pm 5.34\%$; $\chi^2(1) = 1.6011$, $p = .21$) indicando que en este caso la inhibición de NF- κ B no produce un déficit ([Figura 33b](#)). Al evaluar los tiempos de exploración solo se observa un efecto significativo del tipo de objeto ($\chi^2(1) = 14.2618$, $p < .001$), no hay efecto del tratamiento ni de su interacción. La comparación del tiempo de exploración familiar contra novedoso indica que todos los animales exploraron significativamente más tiempo el objeto novedoso (VEH: $t_{familiar} = 4.39 \pm 1.06s$, $t_{novedoso} = 6.72 \pm 1.08s$; BAY: $t_{familiar} = 3.2 \pm 0.76s$, $t_{novedoso} = 8.94 \pm 1.18s$; $p < .01$), mostrando que hay retención en ambos grupos ([Figura 33c](#)). Por otro lado, no se observaron diferencias en el tiempo de exploración total ([Figura 33d](#)), ni preferencia por alguna posición u objeto durante el testeo ([Figura S14](#)), ni tampoco durante el entrenamiento ([Figura S15](#)).

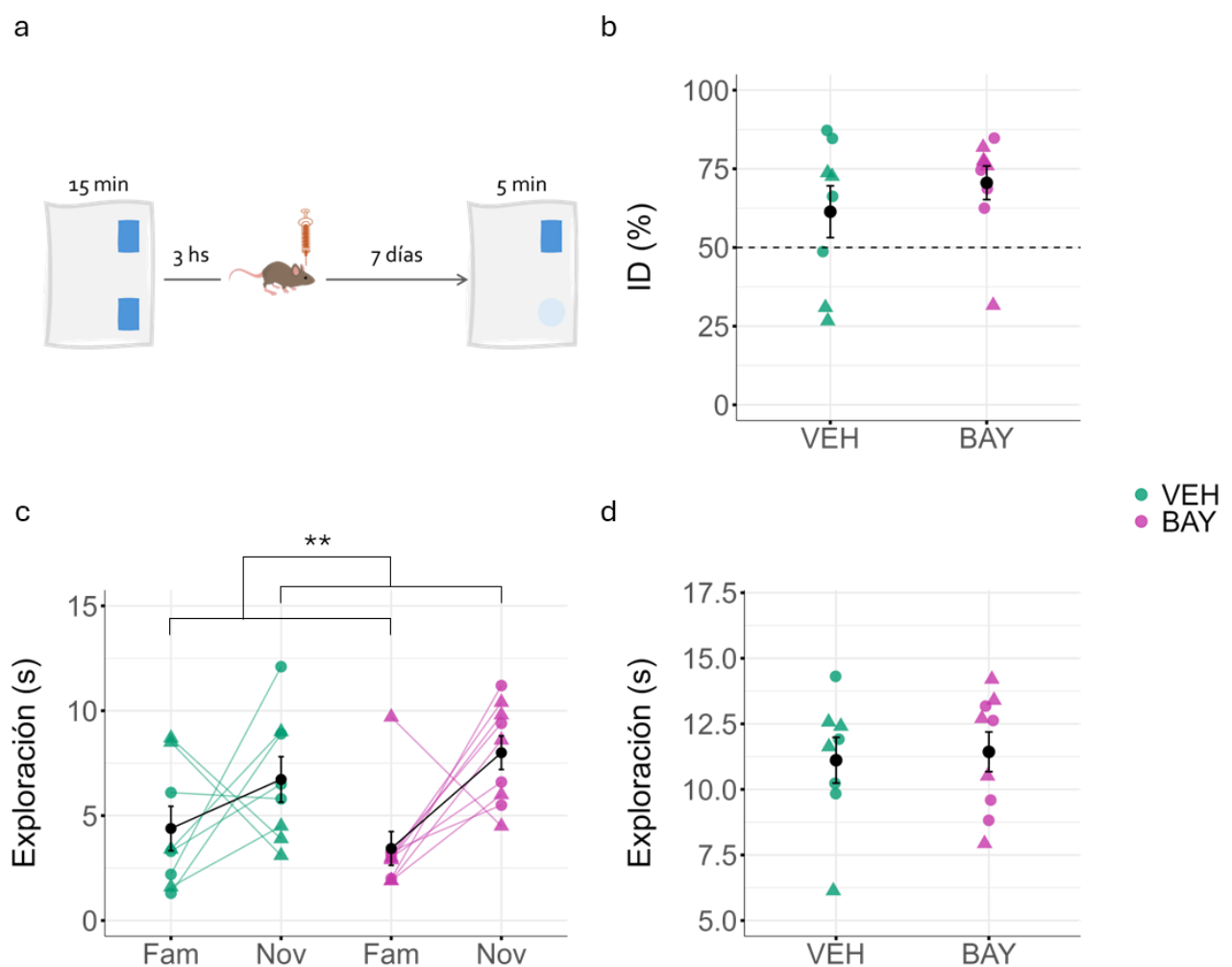


Figura 33. La inyección intrahipocampal de BAY 11-7082 3 horas después del entrenamiento no produce un déficit en la memoria de reconocimiento de objeto. (a) Diseño experimental. Los

animales recibieron un entrenamiento fuerte de 15 minutos y 3 horas después recibieron una inyección localizada de BAY 11-7082 o vehículo. **(b)** Índice de discriminación. **(c)** Tiempo de exploración de los objetos familiar y novedoso. En ambos grupos hay una mayor exploración del objeto novedoso respecto del familiar. **(d)** No se observan diferencias en el tiempo total de exploración entre los grupos. Círculos: hembras. Triángulos: machos. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S30](#). * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Finalmente, la inyección 6 horas después del entrenamiento sí produce un déficit en la memoria, evidenciado tanto por una disminución significativa en el ID ($ID_{VEH} = 80.9 \pm 2.54\%$; $ID_{BAY} = 68.7 \pm 5.82\%$; $\chi^2(1) = 5.2645$, $p < .05$; [Figura 34b](#)), como por los tiempos de exploración similares entre el objeto familiar y el novedoso en el grupo inyectado con BAY (VEH: $t_{familiar} = 2.22 \pm 0.33s$, $t_{novedoso} = 9.43 \pm 0.64s$; BAY: $t_{familiar} = 3.27 \pm 0.96s$, $t_{novedoso} = 7.08 \pm 0.99s$; interacción Tratamiento x Tipo de objeto: $\chi^2(1) = 4.7689$, $p < .05$; Fam - Nov_(VEH) $p < .001$; Fam - Nov_(BAY) $p = .06$; [Figura 34c](#)). No se observaron diferencias en el tiempo total de exploración ([Figura 34d](#)), ni preferencias por posición u objeto durante el testeo ([Figura S16](#)), ni tampoco durante el entrenamiento ([Figura S17](#)).

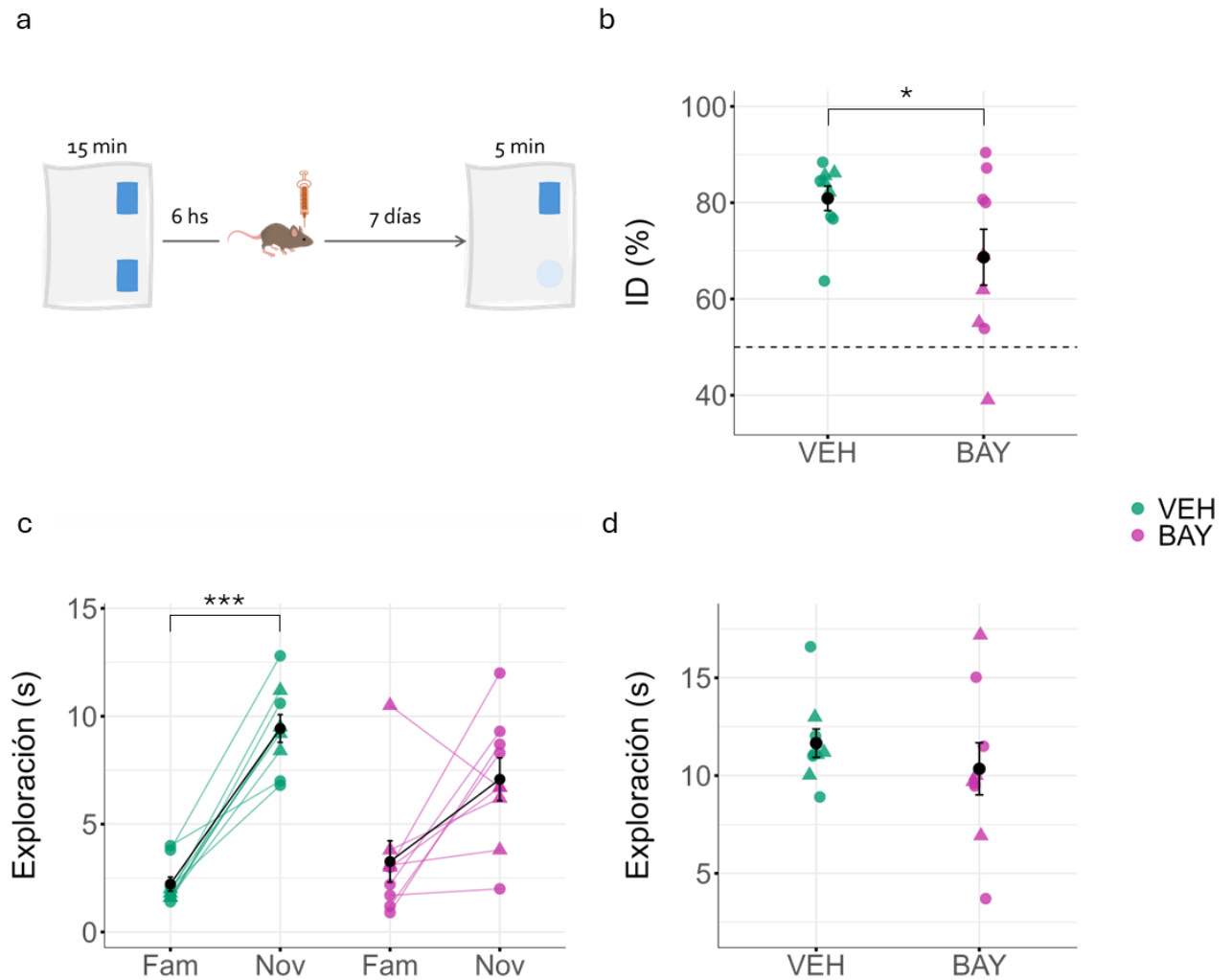


Figura 34. La inyección intrahipocampal de BAY 11-7082 6 horas después del entrenamiento produce un déficit en la memoria de reconocimiento de objeto. (a) Diseño experimental. Los animales recibieron un entrenamiento fuerte de 15 minutos e inmediatamente después recibieron una inyección localizada de BAY 11-7082 o vehículo. **(b)** Disminución del índice de discriminación. **(c)** Tiempo de exploración de los objetos familiar y novedoso. En ambos grupos hay una mayor exploración del objeto novedoso respecto del familiar. El grupo inyectado con BAY explora el objeto familiar más tiempo que el grupo VEH, lo cual da cuenta de la diferencia en el índice de discriminación. **(d)** No se observan diferencias en el tiempo total de exploración entre los grupos. Círculos: hembras. Triángulos: machos. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S33](#). * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

En resumen, la inhibición de NF- κ B localizada en el hipocampo produce un déficit en la memoria de reconocimiento de objeto siguiendo un patrón temporal similar al observado en los experimentos de facilitación con RGFP966 ([Figura 15](#)). El inhibidor tiene efecto sobre la memoria cuando es inyectado inmediatamente o 6 horas después del entrenamiento, pero no

a las 3 horas ([Figura 35](#)), constituyendo una evidencia más en favor de la hipótesis de que hay dos momentos críticos de actividad transcripcional necesarios para la consolidación de una memoria de 7 días, uno cercano al momento del aprendizaje, y otro alrededor de 6 horas después.

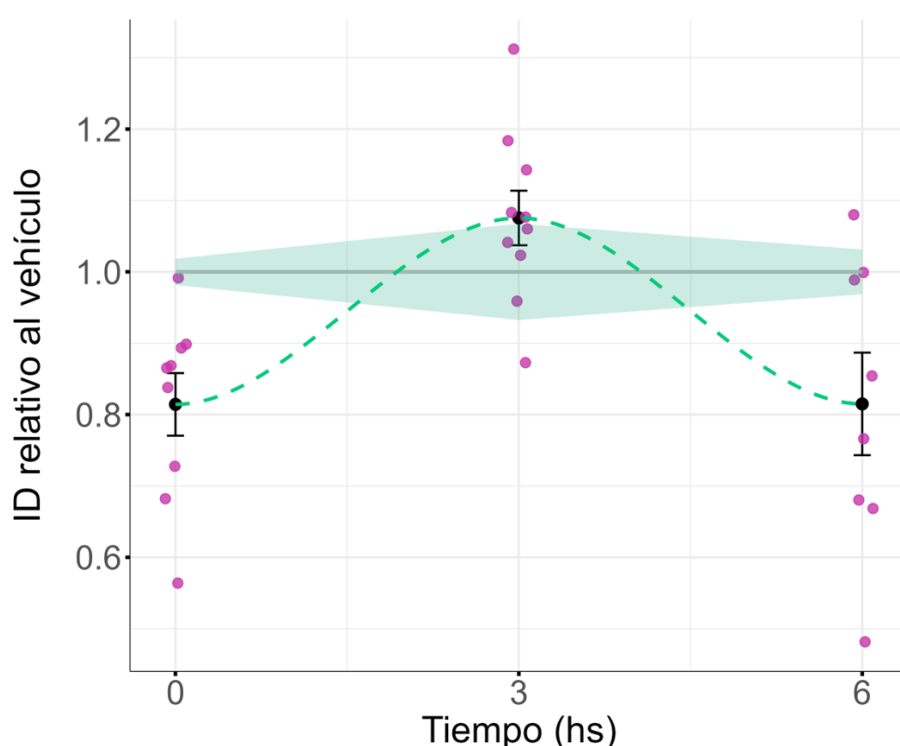


Figura 35. La inhibición de NF- κ B en el hipocampo inmediatamente o 6 horas después del entrenamiento produce un déficit en la memoria de reconocimiento de objeto. Índice de discriminación del grupo inyectado con el inhibidor BAY 11-7082 relativo a su grupo control inyectado con vehículo. El ID es significativamente menor cuando el inhibidor es administrado inmediatamente o 6 horas después del entrenamiento de 15 minutos. La inyección de BAY 11-7082 3 horas después del entrenamiento no tiene efecto sobre la memoria. La línea gris corresponde a la media del grupo VEH de cada experimento y la zona sombreada en color al error estándar. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar de cada grupo. En color se muestran los datos de cada individuo.

5.2 Análisis inmunohistoquímico del efecto de la inyección localizada de BAY 11-7082

Para estudiar el mecanismo de acción del BAY 11-7082 se realizó un experimento similar a los de conducta en el cual animales canulados en la región CA1 fueron entrenados 15 minutos e inmediatamente después recibieron una inyección bilateral de BAY o vehículo. 45 minutos

después de la inyección se realizó una perfusión intracardíaca para fijar el tejido con el fin de analizar la marca de NF- κ B en secciones coronales del cerebro mediante la técnica de inmunohistoquímica ([Figura 36a](#)).

Se realizó la inmunomarcación contra la subunidad p65 de NF- κ B y se analizó la señal en tres subregiones del hipocampo: CA1, CA3 y giro dentado (DG). Considerando que el inhibidor BAY 11-7082 impide la fosforilación de la proteína inhibidora I κ B y, por lo tanto, su posterior degradación, planteamos la hipótesis de que la inhibición de NF- κ B con esta droga provoca una disminución en la señal nuclear debido al impedimento para translocarse al núcleo ([Figura 2](#)). Para evaluar esto, se comparó la intensidad de fluorescencia nuclear entre los grupos BAY y control inyectado con vehículo. Los resultados del ANOVA muestran un efecto de la Región ($\chi^2(2) = 7.0724$, $p < .05$), pero no del Tratamiento y tampoco de su interacción, indicando que hay distinta intensidad de fluorescencia entre distintas regiones del hipocampo, pero no hay cambios inducidos por el tratamiento ([Figura 36b](#)). Por otro lado, se midió la proporción de p65 nuclear mediante el cálculo de un ratio de intensidad en núcleo sobre la intensidad total. En este caso tampoco se encontró un efecto del tratamiento con BAY 11-7082, pero sí se observó un claro efecto de la región ($\chi^2(2) = 347.6793$, $p < .001$) que refleja una mayor proporción de señal nuclear en el giro dentado respecto de CA1 y CA3 ([Figura 36c](#)).

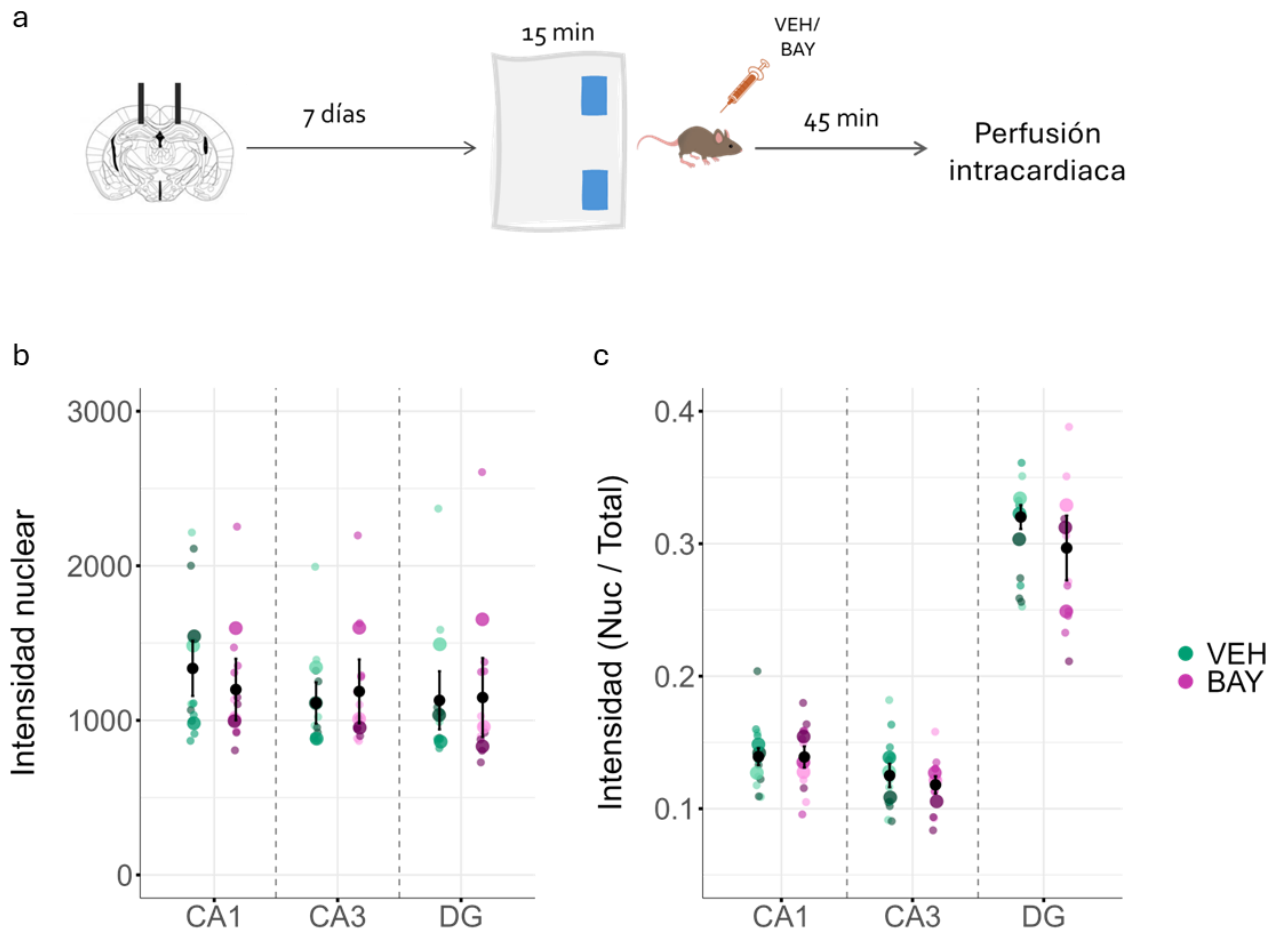


Figura 36. La inhibición localizada de NF-κB en el hipocampo no produce una disminución en la señal nuclear, ni en el ratio núcleo / total. (a) Diseño experimental. Una semana después de la cirugía de implantación de cánulas, los animales fueron entrenados durante 15 minutos en la tarea de NOR, inmediatamente después recibieron una inyección de BAY 11-7082 o DMSO y a los 45 minutos fueron perfundidos ($n = 3$). **(b)** Intensidad media nuclear. **(c)** Proporción de intensidad nuclear. Los círculos grandes de color representan la media de cada animal para cada región, los puntos pequeños representan cada observación individual y llevan el mismo color que el animal al que pertenecen. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la [Tabla S36](#).

Por último, se contabilizaron las células con marca para p65 por unidad de volumen (mm^3). El análisis reveló una interacción significativa entre el tratamiento y la región ($F_{(1, 2)} = 6.7827_2$, 44.56), $p < .01$) y las posteriores comparaciones mostraron una disminución significativa en el número de células con marca positiva para p65 en la región CA1 ([Figura 37](#)). Dado que esa es específicamente la región en donde se realizó la inyección, este resultado podría dar cuenta del efecto observado a nivel comportamental. Sorprendentemente, se observó un aumento significativo en el número de células marcadas en la región CA3, tal vez debido a

un efecto indirecto de la droga sobre esta región. Por último, en el giro dentado no se registraron diferencias entre el grupo inyectado con BAY y el control inyectado con vehículo.

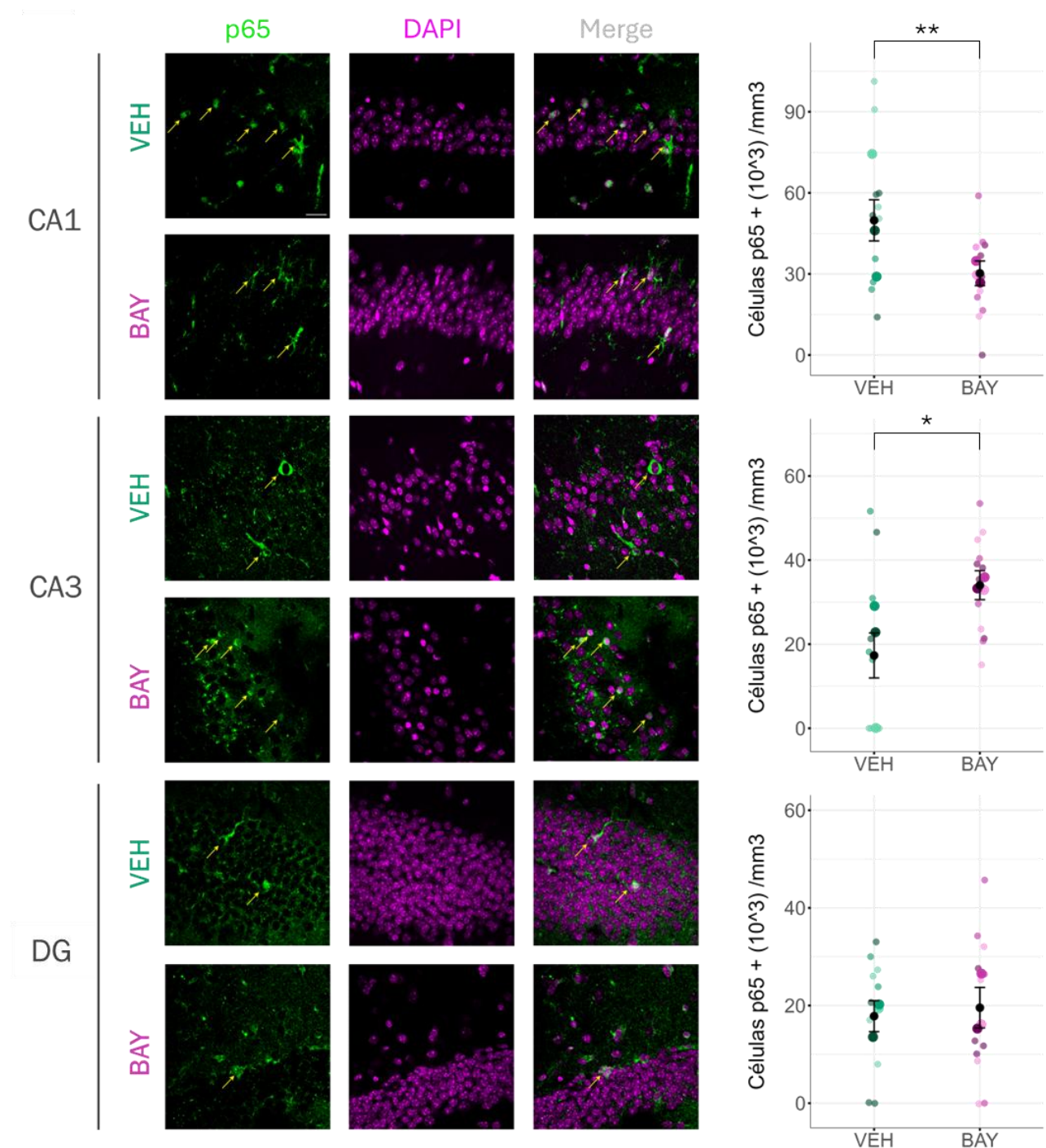


Figura 37. La inyección localizada de BAY 11-7082 produce una disminución en el número de células positivas para NF-κB en la región CA1 del hipocampo. A la izquierda: imágenes representativas de cada región para el grupo droga y vehículo. A la derecha: cuantificación del número de células por unidad de volumen. Los puntos grandes de color representan la media de cada animal, los puntos pequeños de color corresponden a cada observación individual (4 por animal). En negro se muestra la media global del grupo $\pm$ error estándar. Los resultados del análisis estadístico se

encuentran en la [Tabla S37](#). * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$. Las imágenes pueden encontrarse en este [link](#).

6. Discusión

6.1 Estudio de los cambios moleculares producidos durante la ventana de consolidación

Considerando estudios previos que apoyan que el factor de transcripción NF-kB muestra dos picos de activación en el ganglio supraesofágico del cangrejo *Neohelice granulata* durante la consolidación de una memoria de largo término (Freudenthal & Romano 2000), y otros trabajos que apoyan la teoría de un patrón de expresión génica bifásico durante la consolidación en roedores (Grecksch & Matthies 1980; Igaz et al., 2002), en la primera parte de este trabajo nos propusimos estudiar la dinámica temporal de NF-kB en el hipocampo durante la consolidación de una memoria de reconocimiento de objeto en ratones. Teniendo en cuenta que luego de un estímulo que activa la vía de NF-kB éste se transloca al núcleo (Moynagh 2005), decidimos medir los niveles de la subunidad p65 en el núcleo en distintos puntos temporales luego del entrenamiento. En base a los antecedentes mencionados, se esperaba que hubiera un aumento de NF-kB en el núcleo a los 45 minutos y luego nuevamente a las 6 horas, mientras que no se esperaban ver cambios en el punto intermedio de 3 horas ni en el de 9 horas.

Al comparar los niveles de p65 nuclear entre el grupo entrenado respecto del control habituado no se observaron diferencias. Esto sugiere que la presencia de objetos no disparó ninguna respuesta diferencial en el hipocampo. Considerando que el hipocampo es una estructura que está relacionada con la codificación de memorias espaciales y que se han asociado otras regiones cerebrales con la codificación de la información de los objetos, como por ejemplo la corteza perirrinal, una posible explicación es que no se hayan detectado cambios porque éstos no están ocurriendo en esta región. En este escenario, si el hipocampo está involucrado exclusivamente en la codificación del componente espacial de la memoria de reconocimiento de objeto, entonces es lógico que no haya diferencias entre los grupos, dado que tanto animales entrenados como habituados fueron expuestos al mismo contexto. Para determinar si este es el caso, sería interesante realizar experimentos similares, pero investigando otras áreas involucradas específicamente en el almacenamiento de la información de los objetos, principalmente la corteza perirrinal. Una manera de determinar si la exposición al contexto está disparando cambios en los niveles de NF-kB en el hipocampo sería comparando los grupos contra un grupo naïve. Por otro lado, en la Figura 10b también se observa que los niveles de p65 nuclear parecen variar a lo largo del tiempo. Sin embargo, como son experimentos independientes no se pueden realizar dichas comparaciones dado que esas diferencias pueden estar relacionadas con variaciones metodológicas entre uno y otro experimento, por ejemplo, en cuanto a la incubación con anticuerpos o el revelado.

Por otro lado, se esperaba encontrar un aumento en los niveles de expresión de BDNF luego del entrenamiento, dado que hay antecedentes que muestran un aumento en la expresión de su mensajero durante la consolidación de la memoria (Hall et al., 2000) y que su delección en el hipocampo impide la formación de una memoria de largo término en la tarea de NOR (Heldt et al., 2007). Considerando además que se trata de un gen tardío y que en cultivos primarios de neuronas corticales se observó un aumento en los niveles de BDNF 3 horas luego de un tratamiento con RGFP966 (Louis Sam Titus et al., 2019), se esperaba observar un aumento aproximadamente a ese tiempo. Sin embargo, eso no se observó y esto puede estar relacionado con el hecho de que la función de BDNF en el hipocampo ha sido asociada predominantemente a memorias espaciales, como en el laberinto de agua de Morris o el condicionamiento de miedo contextual (Mizuno et al., 2000; Tyler et al., 2002).

Como se mencionó anteriormente, en esta Tesis no se encontraron diferencias en los niveles de p65 dentro del núcleo a lo largo del tiempo. Sin embargo, en los antecedentes mencionados se observó un aumento en la actividad de unión al ADN, que puede no coincidir con un aumento en la cantidad de proteína en el núcleo. Teniendo esto en cuenta, decidimos evaluar la acetilación de p65, una modificación post-traducciona que está relacionada con un aumento en su actividad y que es regulada por HDAC3. Debido al impedimento técnico de trabajar con el anticuerpo que detecta la acetilación en la lisina 310 de p65 en extractos fraccionados, realizamos un nuevo experimento en el cual dos grupos de animales fueron entrenados 15 minutos o habituados a la arena experimental vacía durante la misma cantidad de tiempo, y luego fueron sacrificados a los 45 minutos, 3 horas o 6 horas para realizar extractos totales de hipocampo. No se observaron diferencias entre los grupos entrenado y habituado en cuanto a la acetilación de p65, pero sí hay un aumento cualitativo en la acetilación a las 3 y 6 horas respecto de los 45 minutos. Al evaluar la expresión de p65 se observa, también cualitativamente, que el grupo entrenado presenta una media mayor a la del grupo habituado para todos los tiempos. Considerando que el tamaño muestral de este experimento es muy reducido ($n = 3 - 4$ por grupo) habría que agregar más animales para determinar si las tendencias observadas son realmente significativas o si se deben a la variabilidad entre los animales. De confirmarse dicha tendencia, estos resultados sugerirían que el procesamiento de la información contextual desencadena un aumento de p65 y de su acetilación entre la 3 y las 6 hs de la exposición al contexto.

Por último, el análisis de Zif268 y BDNF, genes río abajo de la regulación de NF- κ B, no mostró diferencias significativas entre los grupos ni a lo largo del tiempo.

6.2 Participación de HDAC3 en la consolidación de la memoria

6.2.1 Efecto de la inhibición de HDAC sobre la memoria

Como se mencionó en la Introducción, el reclutamiento de mecanismos epigenéticos, particularmente la acetilación de histonas, se asocia con la formación de memorias más persistentes. Esto implica que, aunque la consolidación de una memoria de largo término necesita expresión génica y síntesis de proteínas, la acetilación de histonas no siempre está presente, sino únicamente en los casos en que la memoria es más duradera (Federman et al., 2013). En este contexto, consideramos adecuado evaluar la memoria a los 7 días ya que nuestro objetivo es estudiar la participación de HDAC3, una enzima que está implicada en la regulación epigenética de la expresión génica.

Los resultados obtenidos en este trabajo, en conjunto con los resultados previos de nuestro laboratorio, muestran que la inhibición sistémica de HDAC3 facilita la consolidación de una memoria de reconocimiento de objeto persistente de 7 días de duración. Ahora bien, este efecto sólo se observa si la inhibición ocurre inmediatamente o 6 horas después del entrenamiento, dado que la inhibición 3 o 9 horas después no tiene efecto. La inhibición de HDAC3 conlleva un aumento en la acetilación de proteínas blanco de HATs que promueven la actividad transcripcional. Entonces, estos resultados apoyan la hipótesis de que la actividad transcripcional en esos dos puntos temporales es importante para la formación de la memoria.

Bajo la hipótesis de que la primera fase de transcripción, que involucra genes tempranos, es responsable de la producción de los factores necesarios para la segunda fase en la cual se transcriben genes tardíos correspondientes a proteínas efectoras, nuestros resultados apuntan a que el entrenamiento débil de un minuto es suficiente para establecer una base sobre la cual se puede facilitar la memoria 6 horas después. También podría pensarse que la administración del inhibidor a las 6 horas promueve una primera ola transcripcional, generando un corrimiento de fase, aunque esta hipótesis resulta poco plausible dado que no se observa efecto de la droga cuando es inyectada 3 horas después del entrenamiento.

Para estudiar el efecto de la inhibición de HDAC3 en otros tipos de memoria realizamos otro experimento farmacológico utilizando la tarea de Condicionamiento de Miedo. Los animales recibieron un entrenamiento débil de 1 shock pareado con un tono e inmediatamente después recibieron una inyección sistémica de droga o vehículo. En esta tarea no se observó efecto de la droga para ninguna de las dos modalidades de testeo, contextual y de clave, en ninguno de los puntos temporales estudiados (24 horas, 1 y 2 semanas después del entrenamiento). Teniendo en cuenta el marcado efecto facilitador observado en la tarea de NOR, y considerando que en Kwapis et al., 2017 muestran que HDAC3 está involucrada en la

formación de memorias de miedo, estos hallazgos resultan llamativos. Sin embargo, hay que tener varios puntos en consideración. Por un lado, en el trabajo de Kwapis mencionado no utilizan un método de inhibición farmacológico, sino que logran la inhibición de HDAC3 mediante la sobreexpresión de una proteína mutante sin actividad catalítica. Más aún, esta sobreexpresión está dada por la inyección de un vector viral en regiones específicas del cerebro (particularmente, el hipocampo dorsal y los distintos subnúcleos de la amígdala). Estas diferencias metodológicas podrían dar cuenta de las diferencias en los resultados, principalmente por el hecho de que en los experimentos aquí presentados la inhibición es general, afectando distintas regiones cerebrales que pueden tener efectos contrapuestos sobre la formación de la memoria. Por ejemplo, trabajos en ratas han mostrado que la inactivación de la corteza infralímbica (IL) durante la consolidación de una memoria de miedo produce una generalización de la respuesta de freezing, es decir, los animales muestran mayores niveles de freezing en un contexto que no ha sido condicionado; así como también una mayor resistencia a la extinción (Bayer & Bertoglio 2020). En contraste, otro trabajo muestra que la activación optogénica de la IL disminuye la respuesta de freezing durante el testeo y facilita la extinción (Do-Monte et al., 2015). Teniendo en cuenta estas evidencias, es factible pensar que la inhibición generalizada de HDAC3 puede estar favoreciendo la actividad de alguna región cerebral que contrarresta la formación de la memoria de miedo y por ese motivo no se observa un efecto facilitador de la droga.

Otro factor a tener en cuenta en relación con la administración sistémica es el grado de penetración que tiene la droga en las distintas regiones del cerebro. Si bien está informado que el inhibidor RGFP966 traspasa la barrera hematoencefálica (Malvaez et al., 2013), no se sabe si la cantidad de droga que llega al cerebro lo hace en la misma cantidad y/o velocidad en distintas áreas. Un trabajo en humanos muestra que la barrera tiene una mayor permeabilidad en el hipocampo respecto de otras regiones (Ivanidze et al., 2019), con lo cual no se descarta que la ausencia de efecto en la memoria de condicionamiento de miedo se deba a que la droga no llegó adecuadamente a otras regiones importantes para la consolidación de este tipo de memoria, como por ejemplo la amígdala.

Por otro lado, considerando que la dosis utilizada fue elegida en base a su efecto sobre la memoria de reconocimiento de objeto (Malvaez et al., 2013), tal vez no sea la adecuada para facilitar una memoria de miedo.

6.2.2 Nivel de acetilación de p65 y expresión de proteínas blanco de NF- κ B y HDAC3

Diversos estudios en cultivos celulares muestran que HDAC3 interactúa con el factor de transcripción NF- κ B y lo desacetila. Chen & Greene (2003) proponen que la desacetilación

de NF- κ B promueve la unión del dímero a la proteína inhibidora I κ B y este complejo es expulsado al citoplasma. Bajo este modelo, la actividad de HDAC3 está implicada en la regulación de la actividad del factor de transcripción, promoviendo la terminación de su actividad mediante la expulsión del núcleo. Esto nos llevó a plantear la hipótesis de que el rol negativo de HDAC3 sobre la memoria no se debe únicamente a la desacetilación de histonas, sino también a la desacetilación del factor de transcripción NF- κ B.

Para investigar esta posibilidad realizamos dos experimentos independientes. En el primero, animales naïve recibieron una inyección i.p. de RGFP966 y 45 minutos después se realizaron extractos de hipocampo para evaluar los niveles de distintas proteínas mediante la técnica de western blot. Al contrario de lo esperado, no se observaron cambios en el nivel de acetilación de la subunidad p65 de NF- κ B en respuesta a la droga. Tampoco se registraron cambios en los niveles de expresión de p65 que podrían estar alterando el balance de acetilación.

Por otro lado, resultó interesante evaluar los niveles de dos proteínas de genes relacionados con la memoria cuya expresión es regulada tanto por HDAC3 como por NF- κ B: Zif268 y BDNF. Zif268 es un gen temprano que ha sido estudiado en trabajos previos de nuestro laboratorio en los cuales se mostró que aumenta su expresión en respuesta a un entrenamiento fuerte en la tarea de NOR (Zalcman et al., 2015). Al contrario de lo esperado, se encontró que en el grupo inyectado con RGFP966 hay una disminución en los niveles de Zif268. Particularmente, se observa que los niveles de proteína en el grupo vehículo son mayores en machos que en hembras, y consecuentemente la disminución significativa en el grupo inyectado con RGFP966 se produce solo en machos, mientras que en hembras parece mantenerse similar en ambos tratamientos. Este resultado apunta a que hay un dimorfismo sexual en el comportamiento de Zif268, aunque se necesitan más experimentos para confirmar esta tendencia.

En cuanto a los niveles de BDNF no se encontraron diferencias entre el grupo inyectado con la droga y el grupo control inyectado con vehículo. Estos resultados concuerdan con los de experimentos en cultivos primarios neuronales que mostraron que el tratamiento con RGFP966 produce un aumento en los niveles de expresión recién a las 3 horas (Louis Sam Titus et al., 2019).

Ahora bien, en este experimento se utilizaron animales naïve y es posible que sea necesario un estímulo que desencadene la activación de estas vías. Con lo cual, se realizó un segundo experimento en el que los animales recibieron un entrenamiento débil de 3 minutos, inmediatamente después fueron inyectados i.p. con droga o vehículo y a los 45 minutos fueron

sacrificados para la realización de los extractos de hipocampo. Los resultados fueron muy similares a los obtenidos en el experimento con animales naive.

En primer lugar, no se encontraron diferencias en los niveles de acetilación de p65, aunque en este caso, a diferencia de los animales naive, hay mucha más variabilidad entre los sexos (indicado por un alto CCI), con lo cual no se descarta un efecto diferencial entre machos y hembras. La diferencia principal parece encontrarse en el grupo vehículo donde los machos muestran valores más bajos a los de las hembras. En general, respecto de la acetilación de p65 es importante destacar que la lisina 310 no es la única que se acetila, hay al menos otras dos que también sufren esta modificación y que resulta en cambios importantes en su actividad. Dada la limitada oferta actual de anticuerpos contra acetilaciones específicas de p65, una posible manera de determinar si el tratamiento produce aumentos en la acetilación de otros residuos sería mediante una inmunoprecipitación de p65 y posterior evaluación de los niveles de acetilación generales.

Por otro lado, no se encontraron diferencias en los niveles de expresión de p65 ni de BDNF. Dadas las limitaciones técnicas enfrentadas al trabajar con el anticuerpo específico contra la acetilación de p65 en la lisina 310, motivo por el cual hubo que utilizar extractos totales, se pierde la información relativa a la localización subcelular de los cambios que se quieren estudiar. Esto es particularmente importante para los casos de p65 y Zif268, dado que la respuesta a la droga podría involucrar cambios en la localización de estas proteínas, aumentando su abundancia en el núcleo.

Al igual que en el experimento con animales naive, se observa una disminución en los niveles de Zif268 solo en los animales macho. Estas diferencias observadas entre machos y hembras en el grupo inyectado con vehículo podrían deberse a un dimorfismo sexual basal. Algo similar fue reportado en ratas, donde se observó que machos naive presentan niveles mayores de Zif268 que las hembras en la corteza prefrontal medial (Stack et al., 2010).

6.2.3 Análisis inmunohistoquímico del efecto de la inhibición de HDAC3 sobre NF- κ B

En las secciones anteriores se mostraron experimentos moleculares realizados mediante la técnica de western blot para determinar qué cambios está produciendo la droga en el cerebro. Ahora bien, hay algunas limitaciones técnicas que pueden explicar por qué no se encontró un efecto del tratamiento. Por un lado, se tomaron muestras de una única región del cerebro, el hipocampo, con lo cual no se está evaluando la posibilidad de que haya cambios que están ocurriendo en otras regiones. Por otro lado, dado que se utilizaron extractos totales también se está perdiendo la posibilidad de evaluar los cambios en distintos compartimentos celulares.

Por último, al realizar un homogenato de toda una región, se están incluyendo tanto las células que están involucradas en la formación de la memoria, como también muchas otras que no, por lo tanto, puede suceder que los cambios producidos por el tratamiento se diluyan debido a la inclusión de una porción muy grande de tejido. Por estos motivos, decidimos realizar un experimento para evaluar el efecto de la administración sistémica de RGFP966 mediante la técnica de inmunohistoquímica. De esta manera se pueden estudiar distintas regiones cerebrales, así como distintas subpoblaciones celulares dentro de las mismas.

En este experimento se utilizaron dos grupos de animales que fueron entrenados en la tarea de NOR durante 3 minutos, inmediatamente después recibieron una inyección sistémica de droga o vehículo y a los 45 minutos fueron perfundidos. En primer lugar, se cuantificó la intensidad de fluorescencia en el núcleo. Una de nuestras hipótesis de trabajo es que, como HDAC3 desacetila a NF- κ B promoviendo su expulsión del núcleo, su inhibición favorece el estado acetilado y activo de NF- κ B, localizado principalmente en el núcleo. Teniendo esto en cuenta, se esperaba ver un aumento en la intensidad de señal nuclear en respuesta al tratamiento con RGFP966, pero los resultados no mostraron diferencias entre los grupos inyectados con droga o vehículo en ninguna de las regiones estudiadas. Sin embargo, en todos los casos se observa que el tratamiento con el inhibidor produce una mayor variabilidad en los datos. Esto nos llevó a pensar que tal vez hay cambios que ocurren solo en una subpoblación de células y que, al promediar los datos de toda la región, estas diferencias se diluyen. Para determinar si este era el caso decidimos estudiar la distribución de intensidades bajo la hipótesis de que, si hay un subgrupo de células que presentan un aumento marcado en la intensidad de fluorescencia entonces debería verse un pasaje de una distribución unimodal a una bimodal, en la que esta segunda moda corrida hacia valores de intensidades más altos corresponde a la subpoblación de interés. Un análisis cualitativo de estas distribuciones no mostró diferencias entre el grupo control y el inyectado con droga, con lo cual no se pudo determinar la causa de la mayor variabilidad. Considerando que puede haber variaciones en la expresión de p65 intrínsecas de cada animal, decidimos evaluar la proporción de señal nuclear calculando un cociente entre la intensidad nuclear y la intensidad total. En este caso, se observó un aumento en la proporción de señal nuclear en la región CA1 del hipocampo. Teniendo en cuenta que múltiples experimentos de nuestro laboratorio señalan que la vía de NF- κ B participa en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objeto en el hipocampo, incluidos los experimentos de la siguiente sección, consideramos que este podría ser uno de los mecanismos mediante el cual la droga produce el efecto facilitador observado en los experimentos del capítulo 4. Por otro lado, la región CA1 del hipocampo cumple un papel central en distintos tipos de memoria y es esperable encontrar

un aumento de la señal nuclear de NF- κ B en esa región después de un tratamiento que promueve la persistencia de la memoria.

Ahora bien, una de las características que se observaron en la marca de p65 es que forma agregados o puntas, mayormente distribuidos dentro del núcleo. Teniendo esto en cuenta, evaluamos la posibilidad de que haya una redistribución de la señal dentro del núcleo, producto de una reorganización del factor de transcripción, que no genere un cambio en la intensidad media nuclear, pero sí en las puntas. Para determinar si esto es así, decidimos estudiar el tamaño, cantidad e intensidad de dichas puntas en respuesta al tratamiento con RGFP966. Se encontraron cambios en el número de agregados por núcleo en la corteza prefrontal, particularmente una disminución en la corteza prefrontal y un aumento en la corteza infralímbica en los grupos inyectados con droga respecto del control. Por otro lado, se encontró que en la corteza peririnal hay una disminución significativa en la superficie media de estos agregados indicando que el tratamiento con RG produce una disminución en su tamaño. Esto último resulta de particular interés teniendo en cuenta que existe un mecanismo de regulación de la actividad transcripcional de NF- κ B que consiste en el secuestro nucleolar de la subunidad p65, acumulándose allí la proteína y disminuyendo así su actividad dentro del núcleo (Stark & Dunlop 2005). Considerando que en la corteza peririnal no hay cambios en la intensidad de fluorescencia pero que los agregados disminuyen de tamaño en respuesta al tratamiento con RG, podría pensarse en un mecanismo similar en el cual la inhibición de HDAC3 produce la exclusión de p65 de los nucleolos, favoreciendo su actividad. Para determinar la existencia de tal mecanismo es necesario realizar experimentos analizando de manera más detallada si las puntas de p65 colocalizan con los nucleolos.

Finalmente, se analizó la intensidad de fluorescencia de las puntas para determinar si hay variaciones que pudieran indicar un mayor estado de agregación de proteína, sin modificar el tamaño de estos agregados. Sin embargo, no se encontraron cambios en la intensidad entre los grupos inyectados con droga y vehículo. Al evaluar la distribución de los datos se encontró un corrimiento hacia intensidades mayores en el grupo inyectado con RGFP966, indicando la presencia de agregados más intensos.

En conjunto, estos resultados muestran que la inhibición de HDAC3 con RGFP966 produce un aumento en la proporción de p65 en el núcleo de células de la región CA1 del hipocampo. Considerando que, bajo nuestras hipótesis de trabajo la inhibición de HDAC3 impide la expulsión de NF- κ B hacia el citoplasma prolongando su actividad como factor de transcripción, este resultado puede explicar, en parte, el efecto facilitador de la droga sobre la consolidación de la memoria, posiblemente en adición al efecto que ésta tiene sobre la

acetilación de histonas. Una posibilidad interesante para explorar a futuro es que la inhibición de HDAC3 prolongue el tiempo de permanencia de NF- κ B en el núcleo, escenario en el cual podría evidenciarse una diferencia en la intensidad de fluorescencia nuclear en etapas posteriores a la estudiada en este trabajo. Por otro lado, el efecto observado sobre el número de puntas por núcleo en la corteza prefrontal son más difíciles de interpretar dado que sugieren efectos contrapuestos en las regiones prelímbica e infralímbica y, si bien está establecido que la mPFC participa en la consolidación de la memoria de reconocimiento, no está del todo claro el rol de cada una de estas subáreas.

6.3 Estudio farmacológico de la participación de NF-kB en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objeto novedoso

6.3.1 Efecto de la inhibición de NF-kB sobre la memoria de reconocimiento de objeto

En un primer conjunto de experimentos se probó el efecto de la administración sistémica de Sulfasalazina (SSZ) sobre la memoria. Resultados previos del laboratorio mostraron que la administración localizada de SSZ inmediatamente después del entrenamiento produce un déficit en la memoria de evitación inhibitoria (Freudenthal et al., 2005) y que su administración, tanto antes como después de un recordatorio, afecta la reconsolidación de memorias de miedo condicionado y de reconocimiento de objeto novedoso (de la Fuente et al., 2014; Ameneiro et al., 2022). En base a estos antecedentes, nos resultó interesante comenzar probando esta droga. Ninguna de las tres dosis administradas (15.5, 30 y 150 mg/kg) produjo efecto sobre la memoria a los 7 días. Teniendo en cuenta que la administración localizada sí tiene efecto, y considerando que un trabajo reciente muestra que la penetración de la SSZ en el cerebro es muy baja (Choi et al., 2021), es posible que la ausencia de efecto se deba a que la droga no atraviesa la barrera hematoencefálica. Si bien en ese mismo trabajo se encontró que algunos metabolitos derivados de la SSZ sí llegan al cerebro, en función de los resultados aquí presentados no parecen tener efecto sobre la memoria, cuando la administración se hace de manera aguda.

En el siguiente experimento se procedió a probar un inhibidor estructuralmente distinto de NF-kB, BAY 11-7082, que inhibe a IKK impidiendo de manera indirecta la translocación al núcleo. Trabajos previos en los que se utiliza la droga de manera sistémica mostraron un impacto a nivel del sistema nervioso y la conducta. Por ejemplo, una inyección de BAY produce una mejoría en la memoria de reconocimiento de objeto a las 24 horas en un modelo de lesión cerebral traumática (Irrera et al., 2017). Por otro lado, tratamientos más prolongados produjeron una mejoría en los niveles de locomoción en un modelo de lesión de la médula espinal en ratones C57 (Jiang et al., 2017), y en distintos tipos de memoria (espacial, de miedo y de trabajo) en un modelo de diabetes de tipo II en ratas (Datusalia & Sharma 2016). Teniendo esto en cuenta, decidimos probar el efecto de la inyección aguda sobre la memoria de NOR. Los animales recibieron un entrenamiento fuerte en la tarea de NOR e inmediatamente fueron inyectados con droga o vehículo. La memoria fue evaluada a la semana y no se encontraron diferencias entre los grupos en cuanto al índice de discriminación. En ambos grupos los animales presentaron preferencia por el objeto novedoso, indicando un buen nivel de retención independientemente del tratamiento. Dado

que era la primera vez que se utilizaba la droga de manera sistémica, decidimos hacer un segundo testeo una semana después del primero para descartar la posibilidad de que haya un efecto más tardío, por ejemplo, una diferencia en el nivel de decaimiento de la memoria con el paso del tiempo. Al evaluar la memoria dos semanas después del entrenamiento tampoco se observó un efecto de la droga. Hubo una disminución significativa tanto en el tiempo total de exploración como en el índice de discriminación producto, probablemente, del paso del tiempo.

Considerando que no está claro si la droga atraviesa la barrera hematoencefálica y que algunos de los trabajos citados utilizan tratamientos prolongados, es posible que la ausencia de efecto se deba a que una única inyección aguda y sistémica no sea suficiente para que la droga haga efecto en el cerebro. Por lo tanto, decidimos evaluar su efecto de manera localizada en el hipocampo. Trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron que la inhibición localizada de NF-kB en el hipocampo, tanto con sulfasalazina como por kB Decoy, produce un déficit en la memoria de reconocimiento de objeto en ratones. Tomando estos resultados como punto de partida, se realizó un primer experimento para determinar si este inhibidor tiene un efecto similar al observado con kB Decoy. Para ello, los animales fueron canulados en la región CA1 del hipocampo dorsal y, luego de recuperarse de la cirugía durante una semana, fueron entrenados en la tarea de NOR durante 15 minutos. Inmediatamente después recibieron inyecciones bilaterales de droga o vehículo y se evaluó la memoria a la semana. La inyección de BAY 11-7082 en el hipocampo produjo un déficit en la memoria de reconocimiento, de acuerdo a lo esperado según las evidencias previas de nuestro laboratorio.

Con este resultado nos preguntamos entonces si la actividad de NF-kB es necesaria también en un momento posterior, correspondiente a la segunda fase de actividad transcripcional observada en roedores, y al segundo pico de actividad de unión al DNA observado en cangrejos. Para estudiar esta posibilidad realizamos otros dos experimentos en los cuales la inyección localizada de BAY se realizó 3 o 6 horas después del entrenamiento. Los resultados muestran que la inyección a las 3 horas no tiene efecto sobre la memoria, pero a las 6 horas sí se observa nuevamente un déficit respecto del grupo control. Estos resultados concuerdan y suman evidencia en favor de la hipótesis de un patrón de actividad transcripcional bifásico durante la consolidación de la memoria.

6.3.2 Análisis inmunohistoquímico del efecto de la inyección localizada de BAY 11-7082

Para estudiar el posible mecanismo de acción de la droga se realizó un experimento en el cual animales canulados fueron entrenados 15 minutos en la tarea de NOR, inmediatamente

después recibieron una inyección bilateral de droga o vehículo y luego fueron perfundidos a los 45 minutos. Se estudió la distribución de p65 en las distintas subregiones del hipocampo.

Como se mencionó anteriormente, el inhibidor BAY 11-7082 impide la translocación de NF- κ B al núcleo, por lo tanto, se evaluó en primera instancia la intensidad nuclear para determinar si hay una disminución en los animales inyectados con la droga. Sin embargo, no se hallaron diferencias entre los grupos. También se evaluó la proporción de señal nuclear calculando un ratio entre intensidad nuclear e intensidad total, dado que podría haber variaciones en los niveles de expresión de p65 entre los animales, pero tampoco se observaron diferencias entre los grupos. En base a estos resultados no se puede concluir que la droga esté afectando la translocación de NF- κ B al núcleo bajo las condiciones experimentales utilizadas.

Por último, se analizó el número de células con marca de p65 por unidad de volumen y se encontró que los animales inyectados con BAY presentan una disminución respecto del grupo control en la región CA1, pudiendo ésta ser la causa del déficit observado en la memoria de reconocimiento. Por el contrario, en la región CA3 se observó un aumento en el número de células con marca para p65 y, si bien es un resultado inesperado, hipotetizamos que podría tratarse de un mecanismo compensatorio.

Finalmente, sería interesante estudiar en qué tipos celulares se está expresando NF- κ B y en cuáles se están observando los cambios. Esto podría ayudar a esclarecer el mecanismo de acción de la droga dado que probablemente no tenga el mismo efecto la inhibición de la actividad de NF- κ B en neuronas excitatorias que en neuronas inhibitorias o células gliales.

Conclusiones

Los resultados presentados en esta Tesis constituyen una evidencia en favor de la hipótesis de que hay dos puntos críticos de actividad transcripcional durante la consolidación de la memoria, en los cuales la interferencia farmacológica produce alteraciones en la persistencia.

Por un lado, se demostró que la inhibición de HDAC3 con RGFP966 tiene un efecto facilitador sobre la memoria de reconocimiento de objeto. Esta facilitación ocurre sólo cuando el inhibidor es administrado inmediatamente o 6 horas después del entrenamiento, mientras que la inyección 3 o 9 horas después no produce efecto. Sin embargo, este efecto no se observó en otro tipo de memoria como la de miedo condicionado.

A nivel molecular no se observó un efecto del inhibidor sobre los niveles de acetilación ni expresión de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B, así como tampoco de la proteína BDNF en el hipocampo. Sin embargo, se encontró un dimorfismo sexual en los niveles de Zif268, que se muestran elevados en animales macho control, y disminuyen en respuesta al tratamiento con RGFP966. El análisis de la distribución de p65 en secciones de cerebro mediante la técnica de inmunofluorescencia mostró un aumento significativo en la proporción de marca nuclear en la región CA1 del hipocampo en animales tratados con el inhibidor respecto del control, pudiendo tratarse de uno de los mecanismos mediante los cuales la inhibición de HDAC3 produce una facilitación en la consolidación de la memoria de NOR.

Por otro lado, la inhibición del factor de transcripción NF- κ B con BAY 11-7082 localizada en el hipocampo produjo un déficit en la memoria de reconocimiento de objeto en los mismos puntos críticos en los que se observó el efecto facilitador con RGFP966. Al analizar el efecto de la droga a nivel molecular, se encontró que produce una disminución en el número de células con marca positiva para p65 en la región CA1 del hipocampo.

Material suplementario

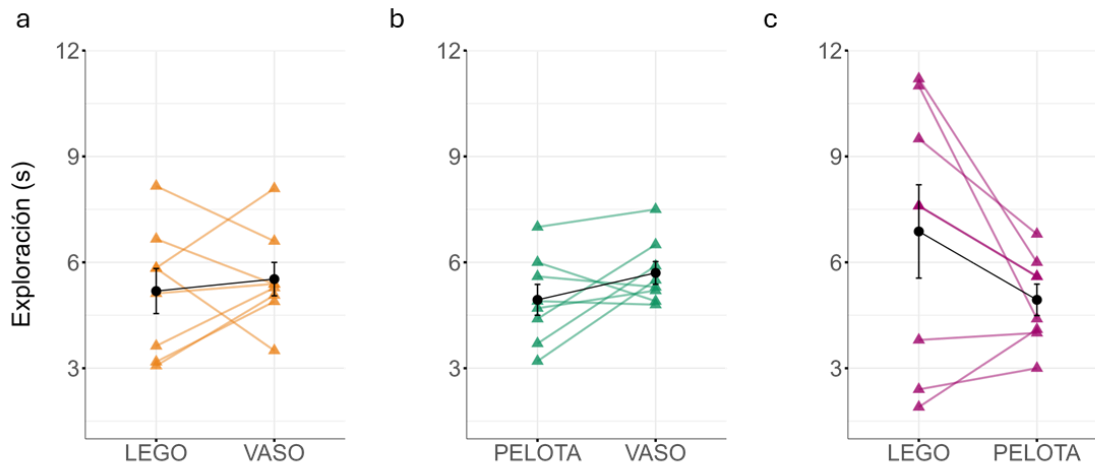


Figura S1. Tests de preferencia de los objetos utilizados en la tarea de NOR. Se evaluó la preferencia espontánea de los animales con tres pares de objetos: (a) LEGO vs vaso de precipitado; (b) pelota vs vaso y (c) LEGO vs pelota. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se muestra en la [Tabla S1](#).

a)

Objeto	n	media	ee
LEGO	8	5.19	0.638
VASO	8	5.52	0.473

Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor	CCI
Objeto	0.275 _(1, 7)	0.6162	0.339

b)

Objeto	n	media	ee
PELOTA	8	4.94	0.437
VASO	8	5.7	0.322

Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor	CCI
Objeto	2.7831 _(1, 7)	0.1392	0.293

c)

Objeto	n	media	ee
LEGO	8	6.88	1.32
PELOTA	8	4.94	0.445

Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor	CCI
Objeto	3.4406 _(1, 7)	0.106	0.439

Tabla S1. Estadística descriptiva y análisis estadístico (ANOVA) de los tests de preferencia mostrados en la [Figura S1](#) para tres pares de objetos: (a) LEGO vs vaso de precipitado; (b) pelota vs vaso y (c) LEGO vs pelota. A la izquierda se muestra la estadística descriptiva y a la derecha los resultados del ANOVA. Se utilizaron modelos lineales mixtos con cada ratón como variable aleatoria.

a) p65						
Tiempo	TR	n	media	ee	t _(GL)	p-valor
45 min	HAB	7	1	0.242	0.038889 ₍₁₂₎	0.9696
	TR	7	0.988	0.181		
3hs	HAB	8	1	0.104	0.58797 ₍₁₄₎	0.5659
	TR	8	0.88	0.175		
6hs	HAB	8	1	0.231	-0.60357 ₍₁₄₎	0.5558
	TR	8	1.25	0.345		
9hs	HAB	7	1	0.149	-0.72924 ₍₁₂₎	0.4798
	TR	7	1.11	0.0502		

b) BDNF						
Tiempo	TR	n	media	ee	t _(GL)	p-valor
45 min	HAB	6	1	0.222	-0.95005 ₍₁₁₎	0.3625
	TR	7	1.29	0.214		
3hs	HAB	7	1	0.23	-1.0422 ₍₁₂₎	0.3179
	TR	7	1.69	0.619		
6hs	HAB	8	1	0.243	0.59823 ₍₁₃₎	0.56
	TR	7	0.814	0.182		
9hs	HAB	6	1	0.354	-0.59634 ₍₁₁₎	0.563
	TR	7	1.27	0.297		

Tabla S2. Estadística descriptiva y análisis estadístico de los westerns blot mostrados en la [Figura 10](#). (a) Cuantificación de p65 nuclear. (b) Cuantificación de BDNF citosólica. A la izquierda se muestra la estadística descriptiva y a la derecha los resultados de las pruebas de t.

a		p65ac						
Tiempo	TR	n	media	ee	Factor	F _(GL1, GL2)	p-valor	
45 min	HAB	4	0.567	0.186	TR	0.0218 _(1, 18)	0.8842	
3hs	HAB	4	0.825	0.116	Tiempo	1.4161 _(2, 18)	0.2684	
6hs	HAB	4	0.728	0.116	TR x Tiempo	0.2255 _(2, 18)	0.8003	
45min	TR	4	0.529	0.172				
3hs	TR	4	0.714	0.0871				
6hs	TR	4	0.822	0.209				

b		p65						
Tiempo	TR	n	media	ee	Factor	F _(GL1, GL2)	p-valor	CCI
45 min	HAB	4	0.664	0.148	TR	2.1455 _(1, 17)	0.1612	
3hs	HAB	4	0.805	0.0888	Tiempo	0.1461 _(2, 17)	0.8651	0.128
6hs	HAB	4	0.744	0.136	TR x Tiempo	0.0089 _(2, 17)	0.9912	
45 min	TR	4	0.942	0.314				
3hs	TR	4	1.03	0.34				
6hs	TR	4	1.02	0.206				

c		BDNF						
Tiempo	TR	n	media	ee	Factor	F _(GL1, GL2)	p-valor	CCI
45 min	HAB	5	1.3	0.18	TR	0.0862 _(1, 23)	0.7717	
3hs	HAB	5	1.67	0.35	Tiempo	0.1433 _(2, 23)	0.8673	0.22
6hs	HAB	5	1.63	0.278	TR x Tiempo	1.2384 _(2, 23)	0.3085	
45 min	TR	5	1.68	0.296				
3hs	TR	5	1.43	0.172				
6hs	TR	5	1.31	0.235				

d		Zif268						
Tiempo	TR	n	media	ee	Factor	F _(GL1, GL2)	p-valor	
45 min	HAB	5	0.895	0.337	TR	0.0166 _(1, 24)	0.8985	
3hs	HAB	5	0.97	0.185	Tiempo	0.0944 _(2, 24)	0.9103	
6hs	HAB	5	0.769	0.179	TR x Tiempo	0.2169 _(2, 24)	0.8066	
45 min	TR	5	0.99	0.352				
3hs	TR	5	0.813	0.136				
6hs	TR	5	0.907	0.166				

Tabla S3. Estadística descriptiva y análisis estadístico de los westerns blot mostrados en la [Figura 11](#). (a) Niveles de p65 acetilado respecto de p65 total. (b) Niveles de p65 total, (c) Zif268 y (d) BDNF relativo a GAPDH. A la izquierda se muestra la estadística descriptiva y a la derecha los resultados del ANOVA de dos factores. Se utilizaron modelos lineales mixtos con el sexo como variable aleatoria. El CCI muestra la variabilidad entre sexos (solo en los casos que es distinta de cero).

a)							
Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	familiar	10	8.66	1.02	Tratamiento	0.1364 _(1, 18)	0.7162
VEH	novedoso	10	9.9	1.02	Tipo de objeto	1.0775 _(1, 18)	0.313
RG	familiar	10	8.47	1.07	Trat. x Tipo objeto	0.0353 _(1, 18)	0.8531
RG	novedoso	10	9.33	0.973			

b)							
Tratamiento	n	media	ee		Factor	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
VEH	10	0.536	0.04		Tratamiento	0.0256 ₍₁₎	0.8729
RG	10	0.53	0.034				

c)							
Tratamiento	n	media	ee		Factor	$t_{(GL)}$	p-valor
VEH	10	18.6	1.4		Tratamiento	0.36926 ₍₁₈₎	0.7163
RG	10	17.8	1.51				

Tabla S4. Estadística descriptiva y análisis estadístico del testeo de animales inyectados con RGFP966 3 horas después del entrenamiento en la tarea de NOR ([Figura 13](#)). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. (b) Índice de discriminación mostrado como proporción. GLM con distribución beta. (c) Tiempo de exploración total. Test de t.

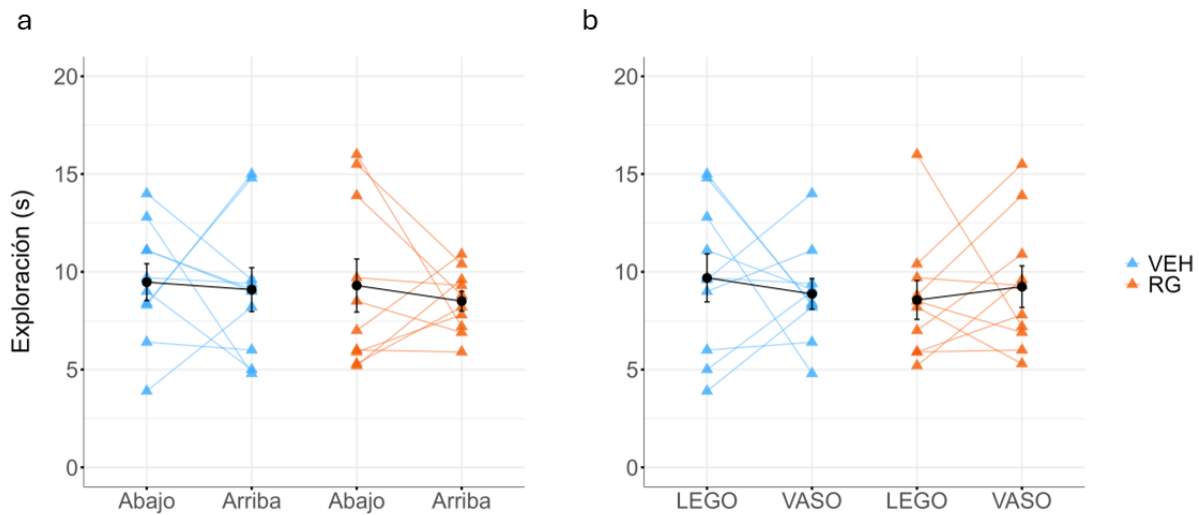


Figura S2. Análisis de la preferencia de posición y objeto durante el testeo de animales inyectados con RGFP966 3 horas después del entrenamiento en la tarea de NOR. (a) Preferencia de posición (arriba vs abajo). (b) Preferencia de objeto (LEGO vs Vaso). En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se muestra en la [Tabla S5](#).

a)							
Tratamiento	Posición	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	abajo	10	9.47	0.944	Tratamiento	0.136 _(1, 18)	0.7166
VEH	arriba	10	9.09	1.12	Posición	0.3278 _(1, 18)	0.574
RG	abajo	10	9.3	1.36	Trat. x Posición	0.0415 _(1, 18)	0.8408
RG	arriba	10	8.5	0.504			

b)							
Tratamiento	Objeto	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	LEGO	10	9.69	1.23	Tratamiento	0.1364 _(1, 18)	0.7162
VEH	VASO	10	8.87	0.784	Objeto	0.0046 _(1, 18)	0.9464
RG	LEGO	10	8.56	0.989	Trat. x Objeto	0.5332 _(1, 18)	0.4747
RG	VASO	10	9.24	1.06			

Tabla S5. Estadística descriptiva y análisis estadístico de las preferencias de posición y objeto mostrados en la [Figura S2](#). (a) Preferencia de posición y (b) de objeto. A la izquierda se muestra la estadística descriptiva y a la derecha los resultados del ANOVA de dos factores. Se utilizaron modelos lineales mixtos con cada ratón como variable aleatoria.

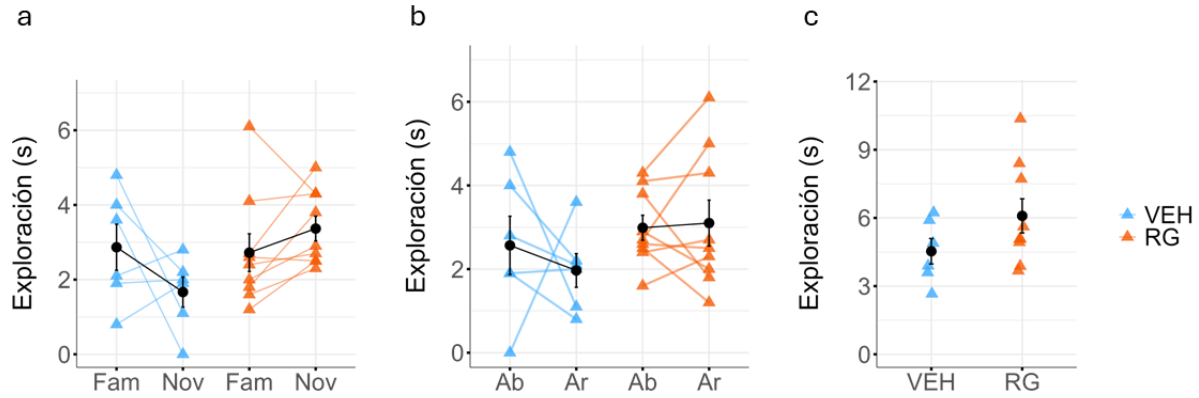


Figura S3. Análisis del entrenamiento de animales inyectados con RGFP966 3 horas después del entrenamiento en la tarea de NOR. (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. Se tomó como novedoso la posición en la que se colocó el objeto novedoso durante el testeo. (b) Preferencia de posición (Ab: abajo; Ar: arriba). (c) Tiempo total de exploración. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se muestra en la [Tabla S6](#).

a)

Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee
VEH	familiar	6	2.87	0.615
VEH	novedoso	6	1.67	0.401
RG	familiar	9	2.72	0.505
RG	novedoso	9	3.37	0.331

Factores	F _(GL1, GL2)	p-valor
Tratamiento	2.263 _(1, 13)	0.1564
Tipo de objeto	0.0487 _(1, 13)	0.82877
Trat. x Tipo objeto	4.5643 _(1, 13)	0.05223

b)

Tratamiento	Posicion	n	media	ee
VEH	abajo	6	2.57	0.697
VEH	arriba	6	1.97	0.402
RG	abajo	9	2.99	0.297
RG	arriba	9	3.1	0.549

Factores	F _(GL1, GL2)	p-valor
Tratamiento	2.263 _(1, 13)	0.1564
Posición	0.1302 _(1, 13)	0.724
Trat. x Posición	0.526 _(1, 13)	0.4811

c)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	6	4.53	0.56
RG	9	6.09	0.751

t _(GL)	p-valor
-1.5043 ₍₁₃₎	0.1564

Tabla S6. Estadística descriptiva y análisis estadístico de los resultados del entrenamiento mostrados en la [Figura S3](#). (a)Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos y (b) preferencia de posición. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. (c) Tiempo total de exploración. Test de t.

a)

Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee
VEH	familiar	10	6.55	0.899
VEH	novedoso	10	9.81	1.21
RG	familiar	9	6.66	0.776
RG	novedoso	9	9.09	0.836

Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
Tratamiento	0.1026 _(1, 17)	0.75269
Tipo de objeto	8.9323 _(1, 17)	0.008251 **
Trat. x Tipo de objeto	0.185 _(1, 17)	0.672548
Contrastes		p-valor
familiar vs novedoso		0.0087

b)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	10	0.592	0.0605
RG	9	0.581	0.0199

Factor	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	0.0656 ₍₁₎	0.7978

c)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	10	16.4	0.714
RG	9	15.7	1.47

Shapiro-Wilk	
W	p-valor
0.86601	0.01236 *

Tabla S7. Estadística descriptiva y análisis estadístico del testeo de animales inyectados con RGFP966 9 horas después del entrenamiento en la tarea de NOR ([Figura 14](#)). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. (b) Índice de discriminación mostrado como proporción. GLM con distribución beta. (c) Tiempo de exploración total. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk. *p < .05, ** p < .01, *** p < .001

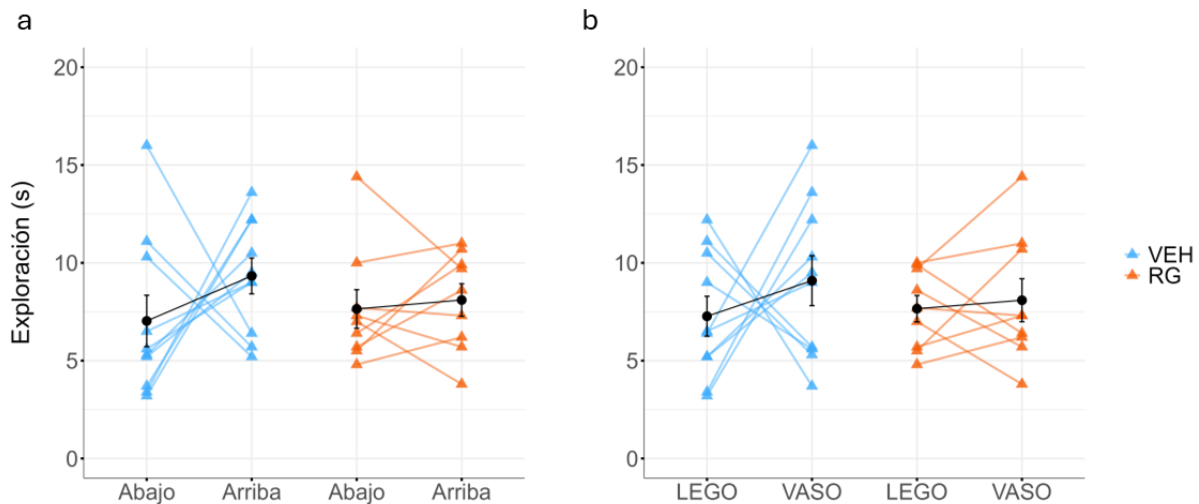


Figura S4. Análisis de la preferencia de posición y objeto durante el testeo de animales inyectados con RGFP966 9 horas después del entrenamiento en la tarea de NOR. (a) Preferencia de posición (arriba vs abajo). **(b)** Preferencia de objeto (LEGO vs Vaso). En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se muestra en la [Tabla S8](#).

a)							
Tratamiento	Posición	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	abajo	10	7.03	1.31	Tratamiento	0.0872 _(1, 17)	0.7713
VEH	arriba	10	9.33	0.914	Posición	1.8778 _(1, 17)	0.1884
RG	abajo	9	7.64	0.984	Trat. x Posición	0.7829 _(1, 17)	0.3886
RG	arriba	9	8.1	0.831			

b)							
Tratamiento	Objeto	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	LEGO	10	7.27	1.02	Tratamiento	0.0848 _(1, 17)	0.7744
VEH	VASO	10	9.09	1.28	Objeto	1.2142 _(1, 17)	0.2859
RG	LEGO	9	7.66	0.674	Trat. x Objeto	0.4302 _(1, 17)	0.5207
RG	VASO	9	8.09	1.1			

Tabla S8. Estadística descriptiva y análisis estadístico de las preferencias de posición y objeto mostrados en la [Figura S4](#). (a) Preferencia de posición y (b) de objeto. A la izquierda se muestra la estadística descriptiva y a la derecha los resultados del ANOVA de dos factores. Se utilizaron modelos lineales mixtos con cada ratón como variable aleatoria.

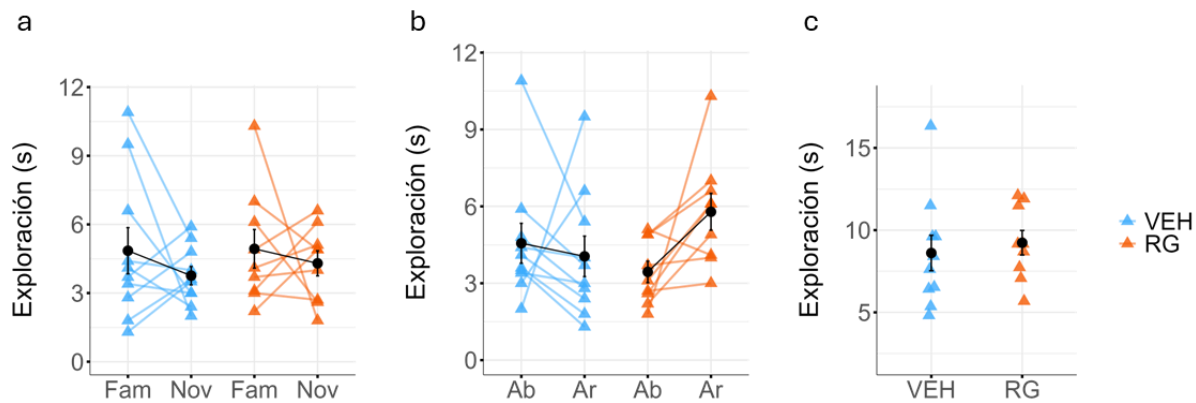


Figura S5. Análisis del entrenamiento de animales inyectados con RGFP966 9 horas después del entrenamiento en la tarea de NOR. (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. Se tomó como novedoso la posición en la que se colocó el objeto novedoso durante el testeó. (b) Preferencia de posición (Ab: abajo; Ar: arriba). (c) Tiempo total de exploración. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se muestra en la [Tabla S9](#).

a)							
Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	familiar	10	4.85	1.01	Tratamiento	0.1747 _(1, 18)	0.6812
VEH	novedoso	10	3.76	0.403	Tipo de objeto	1.3767 _(1, 18)	0.2568
RG	familiar	9	4.93	0.843	Trat. x Tipo objeto	0.0938 _(1, 18)	0.7632
RG	novedoso	9	4.3	0.549			

b)							
Tratamiento	Posicion	n	media	ee	Shapiro-Wilk		
VEH	abajo	10	4.56	0.779	W	p-valor	
VEH	arriba	10	4.05	0.79	0.88454	0.00096	
RG	abajo	9	3.44	0.42			
RG	arriba	9	5.79	0.72			

c)							
Tratamiento	n	media	ee		$t_{(GL)}$	p-valor	
VEH	10	8.61	1.08		-0.46483 ₍₁₈₎	0.648	
RG	9	9.23	0.747				

Tabla S9. Estadística descriptiva y análisis estadístico de los resultados del entrenamiento mostrados en la [Figura S5](#). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. (b) Preferencia de posición. (c) Tiempo total de exploración. Test de t.

a)

Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee
VEH	familiar	8	4.21	0.292
VEH	novedoso	8	7.06	0.54
RG	familiar	6	2.6	0.274
RG	novedoso	6	6.73	0.529

Factores	F _(GL1, GL2)	p-valor
Tratamiento	3.3545 _(1, 12)	0.09195
Tipo de objeto	114.2492 _(1, 12)	1.74E-07 ***
Trat. x Tipo de objeto	4.0059 _(1, 12)	0.06848

Contrastes	p-valor
VEH familiar vs VEH novedoso	0.0001
RG familiar vs RG novedoso	<.0001
VEH familiar vs RG familiar	0.0745

b)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	8	0.625	0.0146
RG	6	0.722	0.0214

Factor	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	17.294 ₍₁₎	3.20E-05 ***

c)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	8	11.3	0.748
RG	6	9.32	0.712

Factor	F _(GL1, GL2)	p-valor
Tratamiento	3.3276 _(1, 11.04)	0.09528

Tabla S10. Estadística descriptiva y análisis estadístico del testeo de animales C57 inyectados con RGFP966 inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de NOR ([Figura 16](#)). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. Contrastes post-hoc con método de Tukey. (b) Índice de discriminación mostrado como proporción. GLM con distribución beta. (c) Tiempo de exploración total. ANOVA de un factor. En todos los casos se incluyó al sexo como variable aleatoria. *p < .05, ** p < .01, *** p < .001

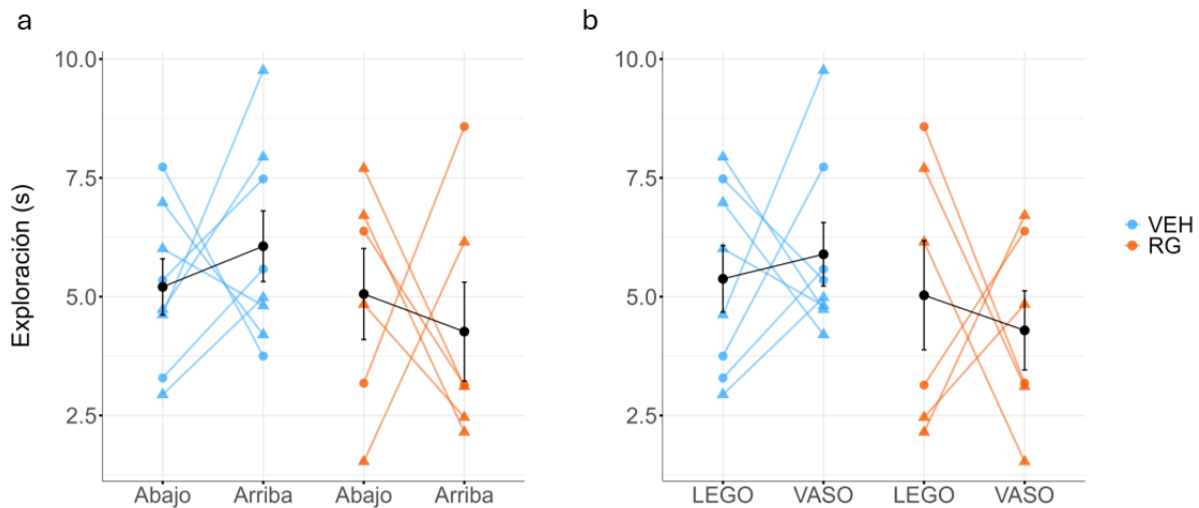


Figura S6. Análisis de la preferencia de posición y objeto durante el testeo de animales C57 inyectados con RGFP966 inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de NOR. (a) Preferencia de posición (arriba vs abajo). **(b)** Preferencia de objeto (LEGO vs Vaso). En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se muestra en la [Tabla S11](#).

a)							
Tratamiento	Posicion	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	abajo	8	5.21	0.591	Tratamiento	1.4111 _(1, 12)	0.2579
VEH	arriba	8	6.06	0.744	Posicion	0.0342 _(1, 12)	0.8564
RG	abajo	6	5.06	0.957	Trat. x Posicion	1.0108 _(1, 12)	0.3346
RG	arriba	6	4.26	1.04			
b)							
Tratamiento	Objeto	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	LEGO	8	5.38	0.7	Tratamiento	1.3846 _(1, 12)	0.2621
VEH	VASO	8	5.89	0.667	Objeto	0.0007 _(1, 12)	0.9796
RG	LEGO	6	5.03	1.15	Trat. x Objeto	0.5749 _(1, 12)	0.463
RG	VASO	6	4.29	0.832			

Tabla S11. Estadística descriptiva y análisis estadístico de las preferencias de posición y objeto mostrados en la [Figura S6](#). (a) Preferencia de posición y (b) de objeto. A la izquierda se muestra la estadística descriptiva y a la derecha los resultados del ANOVA de dos factores. Se utilizaron modelos lineales mixtos con cada ratón y el sexo como variables aleatorias.

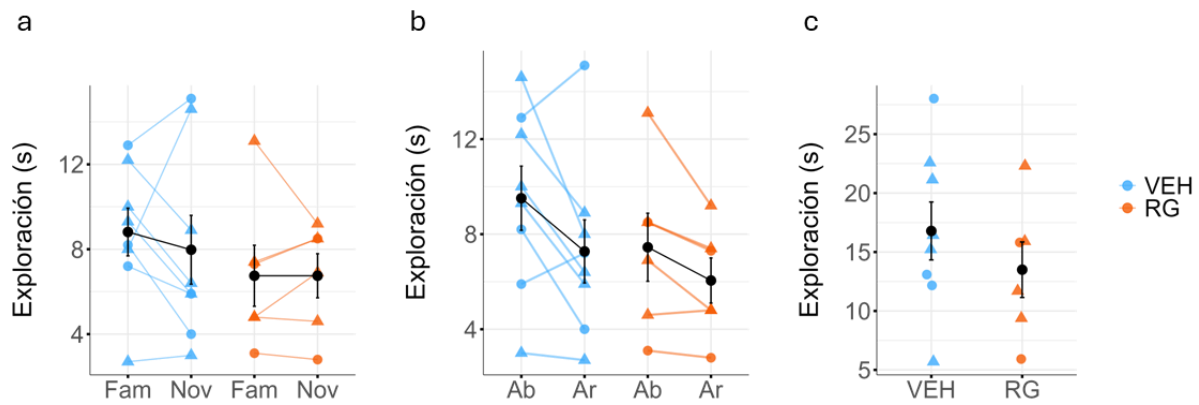


Figura S7. Análisis del entrenamiento de animales C57 inyectados con RGFP966 inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de NOR. (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. Se tomó como novedoso la posición en la que se colocó el objeto novedoso durante el testeo. (b) Preferencia de posición (Ab: abajo; Ar: arriba). (c) Tiempo total de exploración. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se muestra en la [Tabla S12](#).

a)							
Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	familiar	8	8.81	1.12	Tratamiento	0.8811 _(1, 12)	0.3664
VEH	novedoso	8	7.98	1.62	Tipo de objeto	0.3206 _(1, 12)	0.5817
RG	familiar	6	6.75	1.44	Trat. x Tipo objeto	0.2404 _(1, 12)	0.6327
RG	novedoso	6	6.75	1.04			

b)							
Tratamiento	Posicion	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	abajo	8	9.51	1.35	Tratamiento	0.8811 _(1, 12)	0.3664
VEH	arriba	8	7.28	1.33	Posicion	8.0315 _(1, 12)	0.01506
RG	abajo	6	7.45	1.43	Trat. x Posicion	0.3909 _(1, 12)	0.54352
RG	arriba	6	6.05	0.949			

					Contrastes		p-valor
					abajo vs arriba		0.0188

c)							
Tratamiento	n	media	ee		Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	8	16.8	2.46		Tratamiento	0.874 _(1, 11.04)	0.3698
RG	6	13.5	2.35				

Tabla S12. Estadística descriptiva y análisis estadístico de los resultados del entrenamiento mostrados en la [Figura S7](#). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos y (b) preferencia de posición. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. (c) Tiempo total de exploración. ANOVA de un factor. En todos los casos se incluyó al sexo como variable aleatoria.

a)				b)			
Grupo	n	media	ee	Grupo	n	media	ee
TRf VEH	10	2.5	1.67	TRf VEH	10	47.5	6.34
TRd VEH	10	0.417	0.417	TRd VEH	10	4.17	2.56
TRd RG	10	1.67	1.11	TRd RG	10	10	3.69

Tabla S13. Estadística descriptiva del entrenamiento del Condicionamiento de Miedo de la [Figura 17](#). (a) Baseline. Porcentaje de freezing durante los dos minutos previos a recibir el primer shock. (b) Porcentaje de freezing durante el último minuto de la sesión de entrenamiento, luego de haber recibido todos los shocks (1 o 3).

a)

TS	Grupo	n	media	ee	Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
1	TRf VEH	10	62	5.43	Grupo	34.427 ₍₂₎	3.35E-08 ***
	TRd VEH	9	27.2	5.1	Testeo	409.774 ₍₂₎	< 2.2e-16 ***
	TRd RG	10	18.2	3.6	Grupo x Testeo	4.258 ₍₄₎	0.006514 **
2	TRf VEH	10	35.8	6.53			
	TRd VEH	9	15.2	3.29			
	TRd RG	10	8.83	2.11			
3	TRf VEH	10	14	4.07			
	TRd VEH	9	7.04	2.18			
	TRd RG	10	2.83	1.11			

Contrastes

p-valor

TS1	TRf VEH vs TRd VEH	<.0001
	TRf VEH vs TRd RG	<.0001
	TRd VEH vs TRd RG	0.2952
TS2	TRf VEH vs TRd VEH	0.003
	TRf VEH vs TRd RG	<.0001
	TRd VEH vs TRd RG	0.2497
TS3	TRf VEH vs TRd VEH	0.1433
	TRf VEH vs TRd RG	0.0002
	TRd VEH vs TRd RG	0.0947

b)

Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Grupo	38.7457 ₍₂₎	3.86E-09 ***
Minuto	27.484 ₍₄₎	1.59E-05 ***
Grupo x Minuto	9.9644 ₍₈₎	0.2675

Factor

Contrastes

p-valor

Grupo	TRf VEH vs TRd VEH	<.0001
	TRf VEH vs TRd RG	<.0001
	TRd VEH vs TRd RG	0.3404
Minuto	1 vs 5	0.0411
	2 vs 4	0.0004
	2 vs 5	<.0001
	3 vs 5	0.0453

c)

Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Grupo	18.768 ₍₂₎	8.41E-05 ***
Minuto	21.99 ₍₄₎	0.000201 ***
Grupo x Minuto	20.844 ₍₈₎	0.007574 **

Factor

Contrastes

p-valor

Minuto 1	TRf VEH vs TRd VEH	0.0361
	TRf VEH vs TRd RG	0.0003
	TRd VEH vs TRd RG	0.2732
Minuto 2	TRf VEH vs TRd VEH	0.021
	TRf VEH vs TRd RG	0.0104
	TRd VEH vs TRd RG	0.9846
Minuto 3	TRf VEH vs TRd VEH	0.0496
	TRf VEH vs TRd RG	<.0001
	TRd VEH vs TRd RG	0.0795
Minuto 4	TRf VEH vs TRd VEH	0.977
	TRf VEH vs TRd RG	0.2697
	TRd VEH vs TRd RG	0.3893
Minuto 5	TRf VEH vs TRd VEH	0.002
	TRf VEH vs TRd RG	0.0001
	TRd VEH vs TRd RG	0.7255

Tabla S14. Estadística descriptiva y análisis estadístico de los testeos contextuales del Condicionamiento de Miedo mostrados en la [Figura 18](#). (a) Porcentaje de freezing total. ANOVA de dos factores y contrastes post-hoc entre grupos para cada testeo. (b) Análisis por minuto del testeo 1 (24hs). ANOVA de dos factores y contrastes post-hoc. En la comparación entre minutos se muestran solo las

comparaciones que dieron significativas. (c) Análisis por minuto del testeo 2 (7 días). ANOVA de dos factores y contrastes entre tratamientos para cada minuto del testeo. En los análisis por minuto se incluyó a cada ratón como variable aleatoria. Contrastes post-hoc realizados por método de Tukey. *p < .05, **p < .01, ***p < .001

a)

TS	Grupo	n	media	ee	Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor	
1	pre	TRf VEH	10	12.9	3.48	Grupo	8.2678 ₍₂₎	0.01602 *
	post		48.3	4.58	Testeo	76.2629 ₍₂₎	< 2e-16 ***	
	pre	TRd VEH	9	0.926	0.612	Grupo x Testeo	1.43684 ₍₄₎	0.83777
	post		31.9	4.32				
	pre	TRd RG	10	7.08	2.06			
	post		31.9	4.92				
					Contrastes	p-valor		
2	pre	TRf VEH	10	10.8	3.18	TS1	TRf VEH vs TRd VEH	0.1166
	post		34.8	7.4	TRf VEH vs TRd RG		0.0994	
	pre	TRd VEH	9	2.78	1.84		TRd VEH vs TRd RG	0.9999
	post		18.3	4.44	TS2	TRf VEH vs TRd VEH	0.0487	
	pre	TRd RG	10	3.75		1.58	TRf VEH vs TRd RG	0.036
	post		17.5	3.33		TRd VEH vs TRd RG	0.9997	
3	pre	TRf VEH	10	4.58	2.59	TS3	TRf VEH vs TRd VEH	0.0801
	post		19.6	5.92	TRf VEH vs TRd RG		0.4077	
	pre	TRd VEH	9	1.39	0.694		TRd VEH vs TRd RG	0.6791
	post		7.87	2.82				
	pre	TRd RG	10	2.5	0.921			
	post		9.58	3.01				

b)

Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor	Factor	Contrastes	p-valor
Grupo	8.3506 ₍₂₎	0.01537 *	Grupo	TRf VEH vs TRd VEH	0.034
Minuto	99.1659 ₍₃₎	< 2e-16 ***		TRf VEH vs TRd RG	0.0254
Grupo x Minuto	9.829 ₍₆₎	0.13204		TRd VEH vs TRd RG	0.9991
			Minuto	1 vs 2	<.0001
				1 vs 3	<.0001
				1 vs 4	<.0001
				2 vs 4	<.0001

c)

Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor	Factor	Contrastes	p-valor
Grupo	6.1698 ₍₂₎	0.04573 *	Grupo	TRf VEH vs TRd VEH	0.0316
Minuto	55.1575 ₍₃₎	6.36E-12 ***		TRf VEH vs TRd RG	0.0815
Grupo x Minuto	10.3311 ₍₆₎	0.11138		TRd VEH vs TRd RG	0.8843
			Minuto	1 vs 2	0.0003
				1 vs 3	<.0001
				1 vs 4	<.0001
				2 vs 4	0.001

Tabla S15. Estadística descriptiva y análisis estadístico de los testeos de clave del Condicionamiento de Miedo mostrados en la [Figura 19](#). (a) Porcentaje de freezing total antes y después del tono para los testeos 1 (48hs), 2 (8 días) y 3 (15 días). ANOVA de dos factores para evaluar el efecto del tratamiento (solo freezing post-sono). Comparaciones entre tratamientos para cada uno de los testeos. (b) Análisis por minuto del testeo 1. ANOVA de dos factores y contrastes post-hoc. (c) Análisis por minuto del testeo 2. ANOVA de dos factores y contrastes entre tratamientos para cada minuto del testeo. En los análisis

por minuto se incluyó a cada ratón como variable aleatoria y se muestran solo las comparaciones que dieron significativas. Contrastes post-hoc realizados por método de Tukey. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

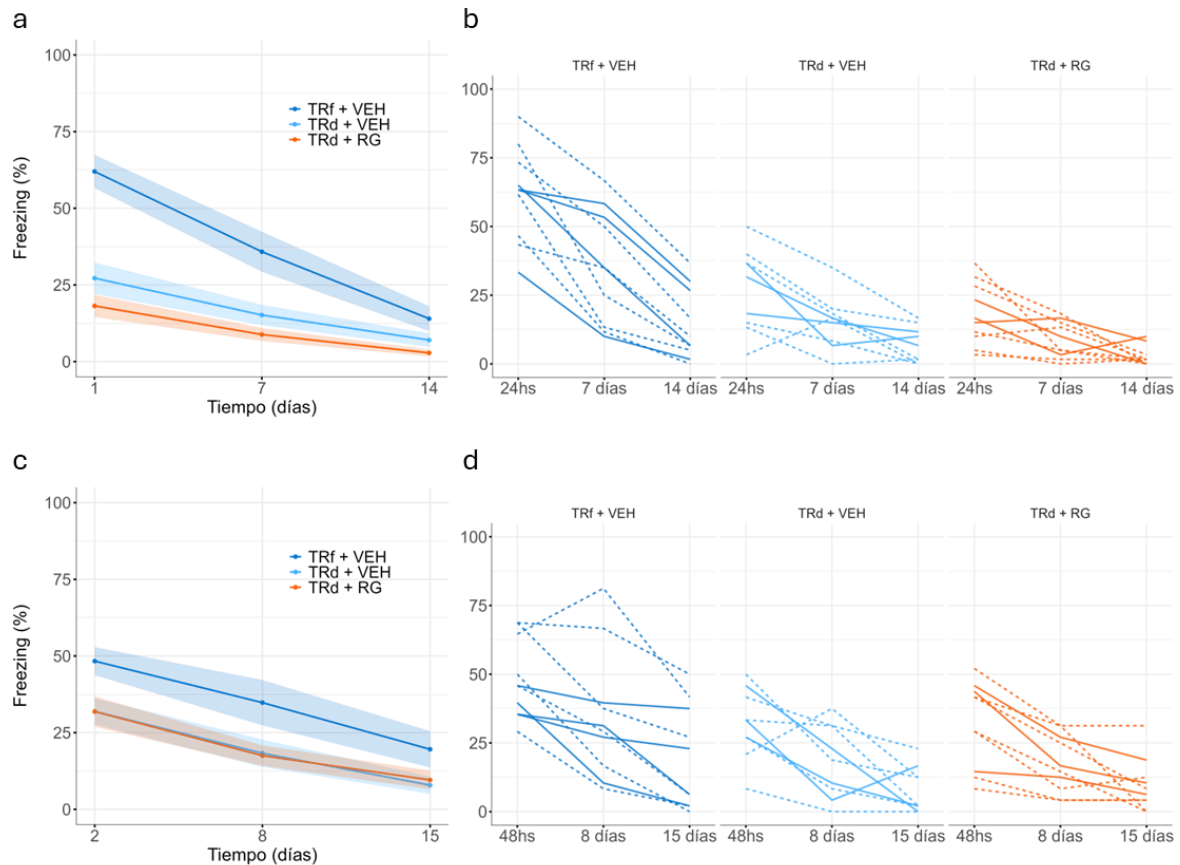


Figura S8. Evolución del comportamiento de freezing a lo largo de los testeos. Porcentaje de freezing al contexto (a) y al tono (c) a lo largo de los sucesivos testeos. Los puntos representan la media en cada testeo y el área sombreada el error estándar. (b y d) Desglose del comportamiento de freezing para cada animal a lo largo de los testeos. Las líneas continuas representan hembras y las líneas de puntos machos.

a)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	11	1	0.191
RG	12	0.953	0.179

Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor	CCI
Tratamiento	0.0274 _(1, 20.024)	0.8703	0.059

b)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	11	1	0.15
RG	12	1.27	0.267

Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor	CCI
Tratamiento	0.75794 _(1, 20)	0.3943	0.026

c)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	13	1	0.114
RG	14	1.07	0.132

Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor	CCI
Tratamiento	0.1289 _(1, 24.043)	0.7227	0.045

d)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	8	1	0.278
RG	5	0.221	0.097

Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor	CCI
Tratamiento	5.4673 _(1, 10.033)	0.04139	0.428 *

Tabla S16. Estadística descriptiva y análisis estadístico de los westerns blot de animales naive inyectados con RGFP966 mostrados en la [Figura 20](#). (a) Niveles de p65 acetilado respecto de p65 total. (b) Niveles de p65 total, (c) BDNF y (d) Zif268 relativo a GAPDH. A la izquierda se muestra la estadística descriptiva y a la derecha los resultados del ANOVA de dos factores. Se utilizaron modelos lineales mixtos con el sexo como variable aleatoria. El CCI muestra la variabilidad entre sexos. *p < .05, **p < .01, ***p < .001

a)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	8	1	0.237
RG	8	0.734	0.152

Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor	CCI
Tratamiento	1.4802 _(1, 13)	0.2454	0.533

b)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	8	1	0.112
RG	8	0.966	0.126

Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor	CCI
Tratamiento	0.0397 _(1, 13)	0.8452	-

c)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	8	1	0.0837
RG	8	0.936	0.139

Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor	CCI
Tratamiento	0.1627 _(1, 13)	0.6932	0.084

d)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	8	1	0.271
RG	8	0.479	0.127

Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor	CCI
Tratamiento	5.4564 _(1, 13)	0.03616	0.584 *

Tabla S17. Estadística descriptiva y análisis estadístico de los westerns blot de animales entrenados e inyectados con RGFP966 mostrados en la [Figura 21](#). (a) Niveles de p65 acetilado respecto de p65 total. (b) Niveles de p65 total, (c) BDNF y (d) Zif268 relativo a GAPDH. A la izquierda se muestra la estadística descriptiva y a la derecha los resultados del ANOVA de dos factores. Se utilizaron modelos lineales mixtos con el sexo como variable aleatoria. El CCI muestra la variabilidad entre sexos. *p < .05, **p < .01, ***p < .001

Tratamiento	Región	n	media	ee	Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
VEH	CA1	3	186	13.1	Región	161.7902 ₍₇₎	<2e-16 ***
VEH	CA3	3	159	18.2	Tratamiento	0.0517 ₍₁₎	0.8202
VEH	DG	3	130	8.73	Región x Trat.	9.0411 ₍₇₎	0.2497
VEH	Cgl	3	268	18.4			
VEH	PrL	3	223	22.3			
VEH	IL	3	188	14.8			
VEH	Prh	3	226	18.4			
VEH	RSC	3	316	24.2			
RG	CA1	3	214	34.5			
RG	CA3	3	212	39.5			
RG	DG	3	160	28.2			
RG	Cgl	3	318	50.8			
RG	PrL	3	243	38.8			
RG	IL	3	219	45.1			
RG	Prh	3	209	39.1			
RG	RSC	3	284	38.3			

Región	Contrastes	p-valor
CA1	VEH vs RG	0.7093
CA3	VEH vs RG	0.4926
DG	VEH vs RG	0.6937
Cgl	VEH vs RG	0.8399
PrL	VEH vs RG	0.857
IL	VEH vs RG	0.7967
Prh	VEH vs RG	0.8651
RSC	VEH vs RG	0.9365

Tabla S18. Estadística descriptiva y análisis estadístico de la intensidad nuclear de p65 en animales inyectados con RGFP966 o vehículo mostrado en la [Figura 23](#). ANOVA de dos factores con cada animal como variable aleatoria. Contrastes post-hoc por método de Tukey. *p < .05, **p < .01, ***p < .001

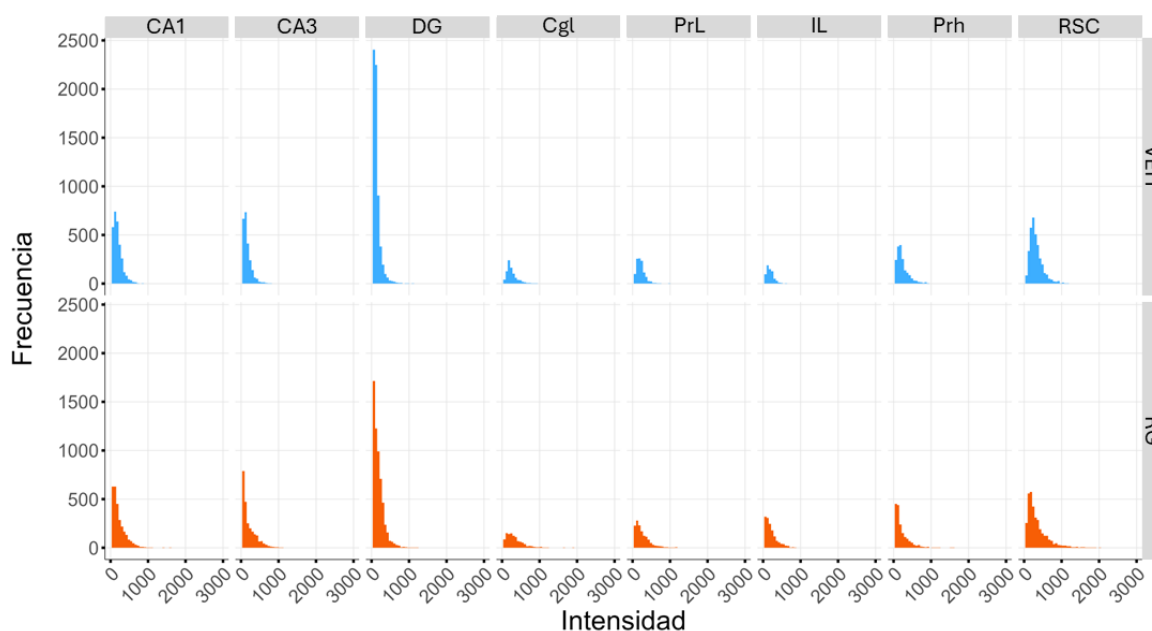


Figura S9. Histogramas de distribución de intensidades dentro del núcleo para cada región.

Tratamiento	Región	n	media	ee	Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
VEH	CA1	3	0.16	0.00835	Región	258.8861 ₍₇₎	<2e-16 ***
VEH	CA3	3	0.142	0.00534	Tratamiento	6.2862 ₍₁₎	0.01217 *
VEH	DG	3	0.235	0.0195	Región x Trat.	2.935 ₍₇₎	0.89095
VEH	Cgl	3	0.133	0.00664			
VEH	PrL	3	0.141	0.00588			
VEH	IL	3	0.141	0.00672			
VEH	Prh	3	0.11	0.00865			
VEH	RSC	3	0.135	0.0057			
RG	CA1	3	0.188	0.00796			
RG	CA3	3	0.155	0.00678			
RG	DG	3	0.253	0.011			
RG	Cgl	3	0.148	0.0125			
RG	PrL	3	0.15	0.0157			
RG	IL	3	0.157	0.017			
RG	Prh	3	0.114	0.0103			
RG	RSC	3	0.134	0.00457			

Región	Contrastes	p-valor
CA1	VEH vs RG	0.0257 *
CA3	VEH vs RG	0.2966
DG	VEH vs RG	0.1401
Cgl	VEH vs RG	0.4806
PrL	VEH vs RG	0.7717
IL	VEH vs RG	0.5664
Prh	VEH vs RG	0.7996
RSC	VEH vs RG	0.9757

Tabla S19. Estadística descriptiva y análisis estadístico del ratio de intensidad nuclear de p65 en animales inyectados con RGFP966 o vehículo mostrado en la [Figura 24](#). ANOVA de dos factores con cada animal como variable aleatoria. Contrastes post-hoc por método de Tukey. *p < .05, **p < .01, ***p < .001

a)

Tratamiento	Región	n	media	ee
VEH	CA1	3	4.33	1.86
VEH	CA3	3	1.59	0.903
VEH	DG	3	3.32	1.14
VEH	Cgl	3	2.25	1.25
VEH	PrL	3	10.9	7.92
VEH	IL	3	3.09	1.89
VEH	Prh	3	6.29	3.06
VEH	RSC	3	2.01	0.458
RG	CA1	3	2.59	0.579
RG	CA3	3	2.15	1.03
RG	DG	3	5.2	1.13
RG	Cgl	3	3.03	0.928
RG	PrL	3	2.67	0.687
RG	IL	3	6.34	1.09
RG	Prh	3	8.4	4.04
RG	RSC	3	3.33	0.614

b) Hipocampo

Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Región	1.5569 ₍₂₎	<2e-16 ***
Tratamiento	187.591 ₍₁₎	0.2121
Región x Trat.	215.5434 ₍₂₎	<2e-16 ***

Región	Contrastes	p-valor
CA1	VEH vs RG	0.8316
CA3	VEH vs RG	0.1127
DG	VEH vs RG	0.0767

d) Prh

Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	0.2502 ₍₁₎	0.6169

c) PFC

Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Región	0.0088 ₍₂₎	4.89E-16 ***
Tratamiento	70.507 ₍₁₎	0.9253
Región x Trat.	173.1276 ₍₂₎	< 2.2e-16 ***

Región	Contrastes	p-valor
Cgl	VEH vs RG	0.6036
PrL	VEH vs RG	0.0175 *
IL	VEH vs RG	0.01 *

e) RSC

Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	0.808 ₍₁₎	0.3687

Tabla S20. Estadística descriptiva y análisis estadístico del número de puntas por núcleo en animales inyectados con RGFP966 o vehículo mostrado en la [Figura 26](#). (a) Estadística descriptiva. ANOVA de dos factores y contrastes correspondientes al (b) hipocampo y (c) corteza prefrontal. ANOVA de un factor de (d) la corteza perirrinal y (e) la corteza retrosplenial. Se utilizó un GLMM con distribución binomial negativa con cada animal como variable aleatoria. Contrastes post-hoc por método de Tukey. *p < .05, **p < .01, ***p < .001

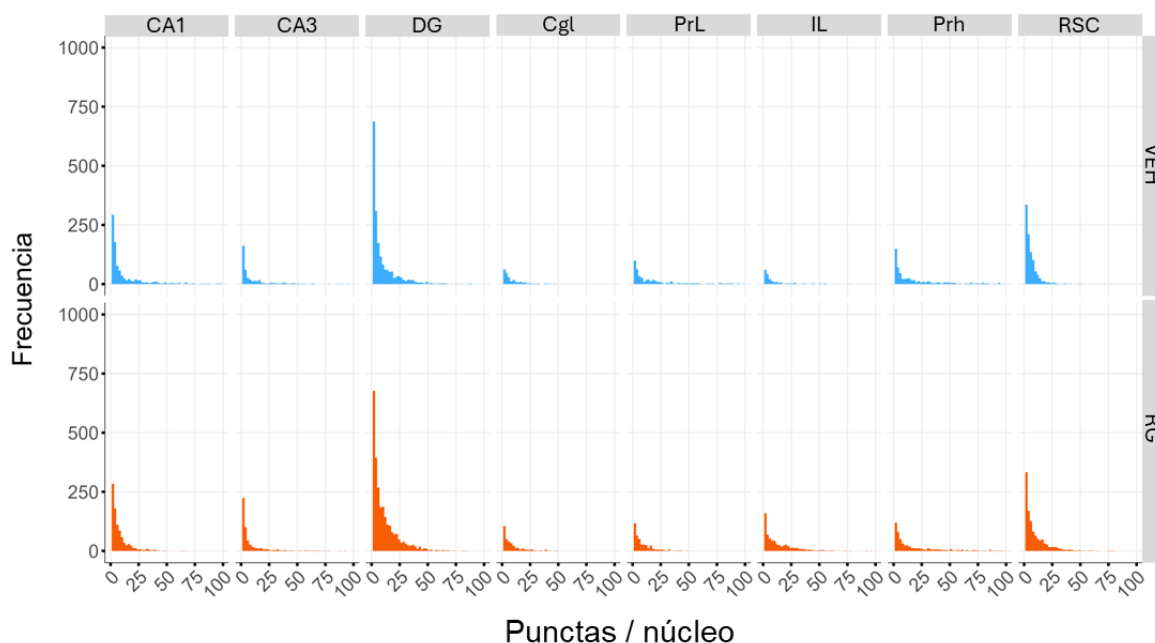


Figura S10. Histogramas de distribución de número de puntas por núcleo para cada región.

Tratamiento	Región	n	media	ee	Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
VEH	CA1	3	8.44	0.878	Región	42.1599 ₍₇₎	4.84E-07 ***
VEH	CA3	3	9.7	0.754	Tratamiento	0.5909 ₍₁₎	0.4421
VEH	DG	3	6.61	0.528	Región x Trat.	8.1923 ₍₇₎	0.3159
VEH	Cgl	3	9.01	1.62			
VEH	PrL	3	6.2	0.586			
VEH	IL	3	6.05	0.42			
VEH	Prh	3	10.5	1.41			
VEH	RSC	3	7.46	0.416			
RG	CA1	3	8.85	0.46			
RG	CA3	3	9.24	0.678			
RG	DG	3	5.54	0.297			
RG	Cgl	3	8.21	0.872			
RG	PrL	3	6.91	0.269			
RG	IL	3	6.08	0.31			
RG	Prh	3	7.15	0.639			
RG	RSC	3	8.46	0.849			

Región	Contrastes	p-valor
CA1	VEH vs RG	0.5537
CA3	VEH vs RG	0.2961
DG	VEH vs RG	0.2059
Cgl	VEH vs RG	0.7587
PrL	VEH vs RG	0.5495
IL	VEH vs RG	0.8513
Prh	VEH vs RG	0.0495 *
RSC	VEH vs RG	0.8871

Tabla S21. Estadística descriptiva y análisis estadístico del tamaño de las puntas de p65 (μm^2) en animales inyectados con RGFP966 o vehículo (Figura 27). ANOVA de dos factores con cada animal como variable aleatoria. Contrastes post-hoc por método de Tukey. *p < .05, **p < .01, ***p < .001

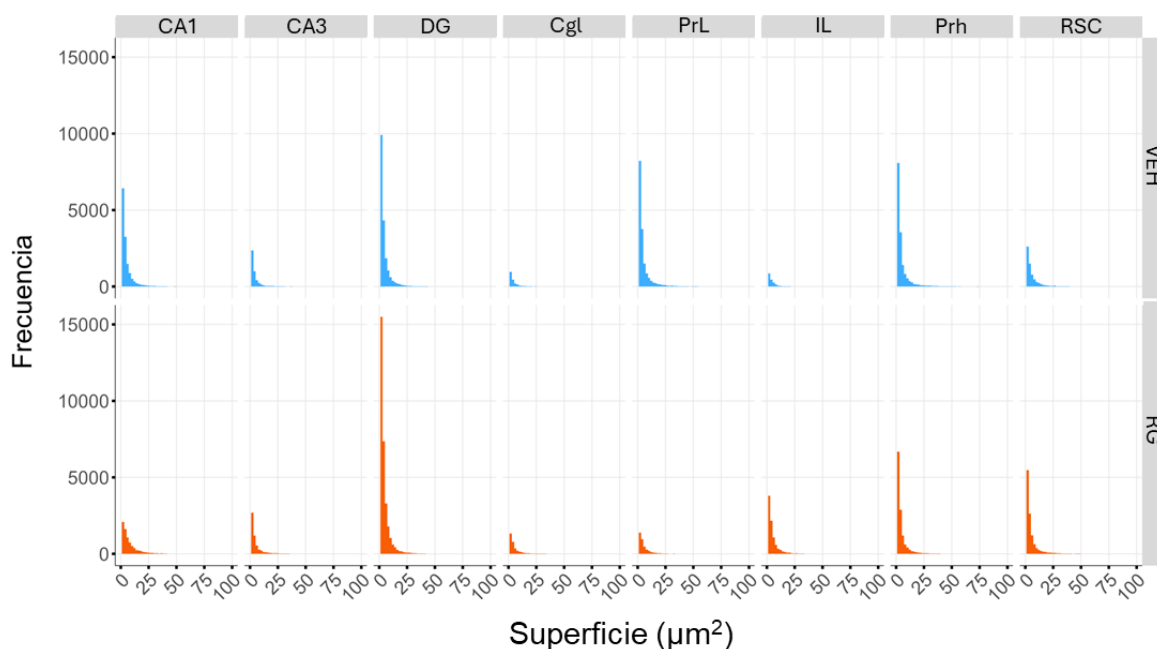


Figura S11. Histogramas de distribución de superficies de las puntas.

Tratamiento	Región	n	media	ee	Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
VEH	CA1	3	8.44	0.878	Región	42.1599 ₍₇₎	4.84E-07 ***
VEH	CA3	3	9.7	0.754	Tratamiento	0.5909 ₍₁₎	0.4421
VEH	DG	3	6.61	0.528	Región x Trat.	8.1923 ₍₇₎	0.3159
VEH	Cgl	3	9.01	1.62			
VEH	PrL	3	6.2	0.586			
VEH	IL	3	6.05	0.42			
VEH	Prh	3	10.5	1.41			
VEH	RSC	3	7.46	0.416			
RG	CA1	3	8.85	0.46			
RG	CA3	3	9.24	0.678			
RG	DG	3	5.54	0.297			
RG	Cgl	3	8.21	0.872			
RG	PrL	3	6.91	0.269			
RG	IL	3	6.08	0.31			
RG	Prh	3	7.15	0.639			
RG	RSC	3	8.46	0.849			

Región	Contrastes	p-valor
CA1	VEH vs RG	0.5537
CA3	VEH vs RG	0.2961
DG	VEH vs RG	0.2059
Cgl	VEH vs RG	0.7587
PrL	VEH vs RG	0.5495
IL	VEH vs RG	0.8513
Prh	VEH vs RG	0.0495 *
RSC	VEH vs RG	0.8871

Tabla S22. Estadística descriptiva y análisis estadístico de la intensidad de las puntas de p65 en animales inyectados con RGFP966 o vehículo (Figura 28). ANOVA de dos factores con cada animal como variable aleatoria. Contrastes post-hoc por método de Tukey. *p < .05, ** p < .01, *** p < .001

a)

Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee
VEH	familiar	11	2.6	0.244
VEH	novedoso	11	5.47	0.433
SSZ	familiar	11	2.41	0.306
SSZ	novedoso	11	5.32	0.497

Factores	F _(GL1, GL2)	p-valor
Tratamiento	0.1471 _(1, 20)	0.7054
Tipo de objeto	78.9725 _(1, 20)	2.22E-08 ***
Trat. x Tipo objeto	0.0031 _(1, 20)	0.956

Contrastes	p-valor
familiar vs novedoso	<.0001 ***

b)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	11	0.678	0.0186
RG	11	0.685	0.0296

Factor	χ ² _(GL)	p-valor
Tratamiento	0.1247 ₍₁₎	0.724

c)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	11	8.07	0.605
RG	11	7.73	0.622

Factor	t _(GL)	p-valor
Tratamiento	0.38355 ₍₂₀₎	0.7054

Tabla S23. Estadística descriptiva y análisis estadístico del testeo de animales inyectados con 15.5 mg/kg de SSZ inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de NOR ([Figura 30](#)). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. Contrastes post-hoc con método de Tukey. (b) Índice de discriminación mostrado como proporción. GLM con distribución beta. (c) Tiempo de exploración total. Test de t. *p < .05, ** p < .01, *** p < .001

a)

Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee
VEH	familiar	7	1.96	0.308
VEH	novedoso	7	4.1	0.542
SSZ	familiar	8	2.19	0.197
SSZ	novedoso	8	3.7	0.34

Factores	F _(GL1, GL2)	p-valor
Tratamiento	0.0431 _(1, 13)	0.8387
Tipo de objeto	33.9175 _(1, 13)	5.94E-05 ***
Trat. x Tipo objeto	1.0178 _(1, 13)	0.3314

Contrastes	p-valor
familiar vs novedoso	0.0001 ***

b)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	7	0.67	0.0396
RG	8	0.626	0.0275

Factor	χ ² _(GL)	p-valor
Tratamiento	1.1727 ₍₁₎	0.2789

c)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	7	6.06	0.698
RG	8	5.9	0.439

Factor	t _(GL)	p-valor
Tratamiento	0.20772 ₍₂₀₎	0.8387

Tabla S24. Estadística descriptiva y análisis estadístico del testeo de animales inyectados con 30 mg/kg de SSZ inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de NOR ([Figura 30](#)). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. Contrastes post-hoc con método de Tukey. (b) Índice de discriminación mostrado

como proporción. GLM con distribución beta. (c) Tiempo de exploración total. Test de t. *p < .05, ** p < .01, *** p < .001

a)

Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee
VEH	familiar	10	1.9	0.216
VEH	novedoso	10	3.05	0.319
SSZ	familiar	10	1.76	0.251
SSZ	novedoso	10	3.35	0.362

Factores	F _(GL1, GL2)	p-valor
Tratamiento	0.0573 _(1, 18)	0.8135
Tipo de objeto	28.1509 _(1, 18)	4.81E-05 ***
Trat. x Tipo objeto	0.7723 _(1, 18)	0.3911

Contrastes	p-valor
familiar vs novedoso	<.0001 ***

b)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	10	0.613	0.0312
RG	10	0.655	0.0289

Factor	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	1.0454 ₍₁₎	0.3066

c)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	10	4.95	0.429
RG	10	5.11	0.485

Factor	t _(GL)	p-valor
Tratamiento	0.23939 ₍₁₈₎	0.8135

Tabla S25. Estadística descriptiva y análisis estadístico del testeo de animales inyectados con 150 mg/kg de SSZ inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de NOR ([Figura 30](#)). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. Contrastes post-hoc con método de Tukey. (b) Índice de discriminación mostrado como proporción. GLM con distribución beta. (c) Tiempo de exploración total. Test de t. *p < .05, ** p < .01, *** p < .001

a)

Testeo	Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee
1	VEH	familiar	10	2.83	0.303
1	VEH	novedoso	10	7.62	0.506
1	BAY	familiar	8	3.95	0.634
1	BAY	novedoso	8	8.47	0.605
2	VEH	familiar	10	2.58	0.241
2	VEH	novedoso	10	4.23	0.359
2	BAY	familiar	8	2.68	0.313
2	BAY	novedoso	8	4.78	0.412

Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
Tratamiento	4.5955 _(1, 16)	0.04777 *
Tipo de objeto	115.1417 _(1, 48)	2.4E-14 ***
Testeo	48.1827 _(1, 48)	9.04E-09 ***
Trat. x Tipo objeto	0.0232 _(1, 48)	0.87968
Trat. x Testeo	1.17 _(1, 48)	0.2848
Tipo objeto x Testeo	21.5785 _(1, 48)	2.67E-05 ***
Trat. x Tipo objeto x Testeo	0.349 _(1, 48)	0.55746

Contrastes	p-valor
TS1 familiar vs TS1 novedoso	<.0001 ***
TS1 familiar vs TS2 familiar	0.3123
TS1 novedoso vs TS2 novedoso	<.0001 ***
TS2 familiar vs TS2 novedoso	0.0004 ***
VEH vs BAY	0.0478

b)

Testeo	Tratamiento	n	media	ee
1	VEH	10	0.725	0.0324
1	BAY	8	0.688	0.0366
2	VEH	10	0.623	0.0183
2	BAY	8	0.645	0.0299

Factor	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	0.0743 ₍₁₎	0.785236
Testeo	8.8915 ₍₁₎	0.002865 **
Trat. x Testeo	1.5385 ₍₁₎	0.214849

Contrastes	p-valor
TS1 vs TS2	0.0044 **

c)

Testeo	Tratamiento	n	media	ee
1	VEH	10	10.4	0.404
1	BAY	8	12.4	0.781
2	VEH	10	6.82	0.545
2	BAY	8	7.46	0.611

Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
Tratamiento	5.0605 _(1, 31)	0.03172 *
Testeo	53.0581 _(1, 31)	3.39E-08 ***
Trat. x Testeo	1.2884 _(1, 31)	0.26504

Contrastes	p-valor
TS1 vs TS2	<.0001 ***
VEH vs BAY	0.0317 *

Tabla S26. Estadística descriptiva y análisis estadístico del testeo de animales que recibieron una inyección i.p. de BAY 11-7082 inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de NOR ([Figura 31](#)). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. ANOVA de 3 factores con cada ratón como variable aleatoria. (b) Índice de discriminación mostrado como proporción. GLM con distribución beta. (c) Tiempo de exploración total. ANOVA de dos factores. Contrastes post-hoc por método de Tukey. *p < .05, ** p < .01, *** p < .001

a)

Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee
VEH	familiar	10	1.84	0.245
VEH	novedoso	10	5.34	0.722
BAY	familiar	9	3.23	0.36
BAY	novedoso	9	5.94	0.499

b)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	10	0.734	0.0317
BAY	9	0.651	0.024

c)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	10	7.18	0.77
BAY	9	9.18	0.724

Factores	F _(GL1, GL2)	p-valor
Tratamiento	9.8999 ₍₁₎	0.001653 **
Tipo de objeto	46.3924 ₍₁₎	9.68E-12 ***
Trat. x Tipo objeto	0.7365 ₍₁₎	0.390798

Contrastes	p-valor
familiar vs novedoso	<.0001 ***
VEH vs BAY	0.0787

Factor	χ ² _(GL)	p-valor
Tratamiento	5.4637 ₍₁₎	0.01941 *

Factor	F _(GL1, GL2)	p-valor
Tratamiento	3.5223 _(1, 16)	0.07884

Tabla S27. Estadística descriptiva y análisis estadístico del testeo de animales inyectados con BAY 11-7082 intrahipocampal inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de NOR ([Figura 32](#)). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. (b) Índice de discriminación mostrado como proporción. GLM con distribución beta. (c) Tiempo de exploración total. ANOVA de un factor. *p < .05, ** p < .01, *** p < .001

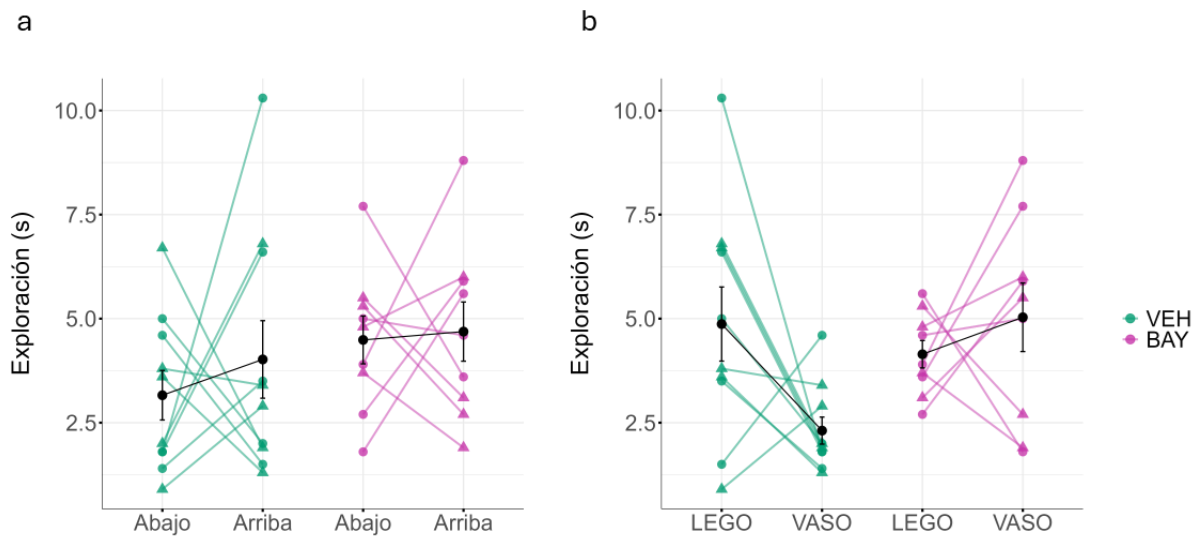


Figura S12. Análisis de la preferencia de posición y objeto durante el testeo de animales inyectados con BAY 11-7082 intrahipocampal inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de NOR. (a) Preferencia de posición (arriba vs abajo). (b) Preferencia de objeto (LEGO vs Vaso). En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se muestra en la [Tabla S28](#).

a)							
Tratamiento	Posición	n	media	ee	Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
VEH	abajo	10	3.16	0.595	Tratamiento	2.6972 ₍₁₎	0.1005
VEH	arriba	10	4.02	0.931	Posición	0.4417 ₍₁₎	0.5063
BAY	abajo	9	4.49	0.574	Trat. x Posición	0.2119 ₍₁₎	0.6453
BAY	arriba	9	4.69	0.711			
b)							
Tratamiento	Objeto	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	LEGO	10	4.87	0.89	Tratamiento	2.3026 _(1, 16)	0.14856
VEH	VASO	10	2.31	0.325	Objeto	2.0172 _(1, 17)	0.17361
BAY	LEGO	9	4.14	0.33	Trat. x Objeto	6.9714 _(1, 17)	0.01718
BAY	VASO	9	5.03	0.824			

Tabla S28. Estadística descriptiva y análisis estadístico de las preferencias de posición y objeto mostrados en la [Figura S12](#). (a) Preferencia de posición y (b) de objeto. A la izquierda se muestra la estadística descriptiva y a la derecha los resultados del ANOVA de dos factores. Se utilizaron modelos lineales mixtos con cada ratón y el sexo como variables aleatorias.

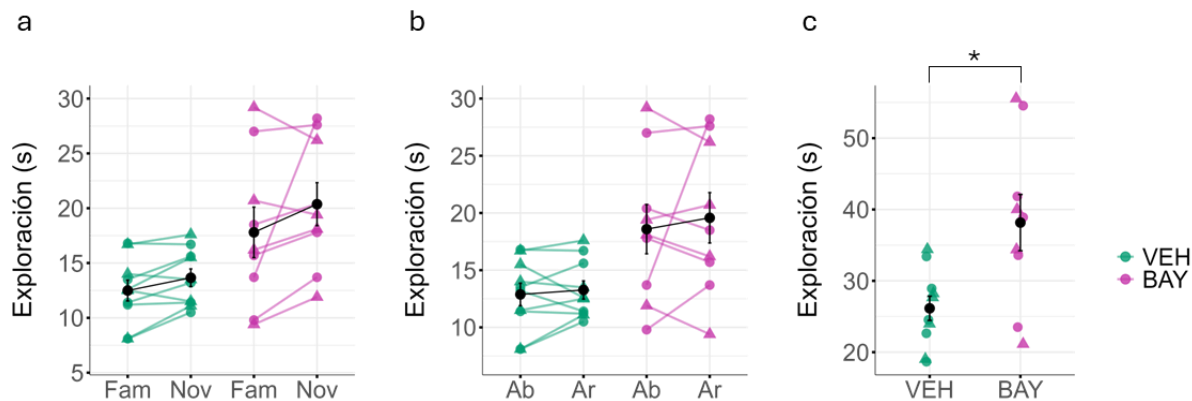


Figura S13. Análisis del entrenamiento de animales C57 inyectados con BAY 11-7082 intrahipocampal inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de NOR. (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. Se tomó como novedoso la posición en la que se colocó el objeto novedoso durante el testeo. (b) Preferencia de posición (Ab: abajo; Ar: arriba). (c) Tiempo total de exploración. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se muestra en la [Tabla S29](#).

a)

Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee
VEH	familiar	10	12.5	0.949
VEH	novedoso	10	13.7	0.806
BAY	familiar	9	17.8	2.3
BAY	novedoso	9	20.4	1.96

Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	10.6322 ₍₁₎	0.001111 **
Tipo de objeto	7.674 ₍₁₎	0.005602 **
Trat. x Tipo objeto	0.4553 ₍₁₎	0.499832

Contrastes	p-valor
familiar vs novedoso	0.0888
VEH vs BAY	0.0049 **

b)

Tratamiento	Posicion	n	media	ee
VEH	abajo	10	12.9	0.991
VEH	arriba	10	13.3	0.797
BAY	abajo	9	18.6	2.15
BAY	arriba	9	19.6	2.2

Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	10.7886 ₍₁₎	0.001021 **
Posición	0.5634 ₍₁₎	0.452912
Trat. x Posición	0.0619 ₍₁₎	0.803508

c)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	10	26.2	1.7
BAY	9	38.2	3.95

Factor	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	7.821 ₍₁₎	0.005164 **

Tabla S29. Estadística descriptiva y análisis estadístico de los resultados del entrenamiento mostrados en la [Figura S13](#). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos y (b) preferencia de posición. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. (c) Tiempo total de exploración. ANOVA de un factor. En todos los casos se incluyó al sexo como variable aleatoria. Contrastes post-hoc por método de Tukey. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

a)

Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee
VEH	familiar	8	4.39	1.06
VEH	novedoso	8	6.72	1.08
BAY	familiar	10	3.2	0.758
BAY	novedoso	10	8.94	1.18

Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
Tratamiento	0.0292 _(1, 14)	0.866816
Tipo de objeto	14.2618 _(1, 15)	0.001829 **
Trat. x Tipo objeto	1.4269 _(1, 15)	0.250821

Contrastes	p-valor
familiar vs novedoso	0.0021 **

b)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	8	0.614	0.0824
BAY	9	0.706	0.0534

Factor	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	0.7508 ₍₁₎	0.3862

c)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	8	11.1	0.872
BAY	9	11.4	0.757

Factor	$t_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	0.077 _(1, 14)	0.7855

Tabla S30. Estadística descriptiva y análisis estadístico del testeo de animales inyectados con BAY 11-7082 intrahipocampal 3 horas después del entrenamiento en la tarea de NOR ([Figura 33](#)). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. (b) Índice de discriminación mostrado como proporción. GLM con distribución beta. (c) Tiempo de exploración total. ANOVA de un factor. Contrastes post-hoc por método de Tukey. *p < .05, ** p < .01, *** p < .001

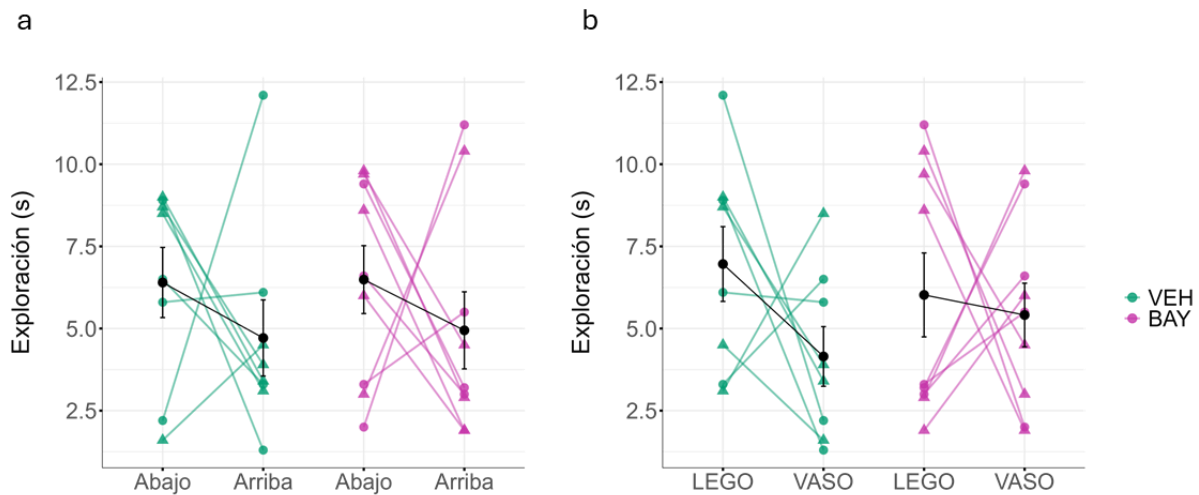


Figura S14. Análisis de la preferencia de posición y objeto durante el testeo de animales inyectados con BAY 11-7082 intrahipocampal 3 horas después del entrenamiento en la tarea de NOR. (a) Preferencia de posición (arriba vs abajo). (b) Preferencia de objeto (LEGO vs Vaso). En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se muestra en la [Tabla S31](#).

a)							
Tratamiento	Posición	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	abajo	8	6.4	1.07	Tratamiento	0.1725 _(1,15)	0.6838
VEH	arriba	8	4.71	1.16	Posición	3.8999 _(1,16)	0.0658
BAY	abajo	10	7.58	1.43	Trat. x Posición	0.2901 _(1,16)	0.5976
BAY	arriba	10	4.56	1.12			

b)							
Tratamiento	Objeto	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	LEGO	8	6.96	1.14	Tratamiento	0.1719 _(1,15)	0.68434
VEH	VASO	8	4.15	0.908	Objeto	3.9931 _(1,16)	0.06297
BAY	LEGO	10	7.16	1.61	Trat. x Objeto	0.0651 _(1,16)	0.80183
BAY	VASO	10	4.98	0.968			

Tabla S31. Estadística descriptiva y análisis estadístico de las preferencias de posición y objeto mostrados en la [Figura S14](#). (a) Preferencia de posición y (b) de objeto. A la izquierda se muestra la estadística descriptiva y a la derecha los resultados del ANOVA de dos factores. Se utilizaron modelos lineales mixtos con cada ratón y el sexo como variables aleatorias.

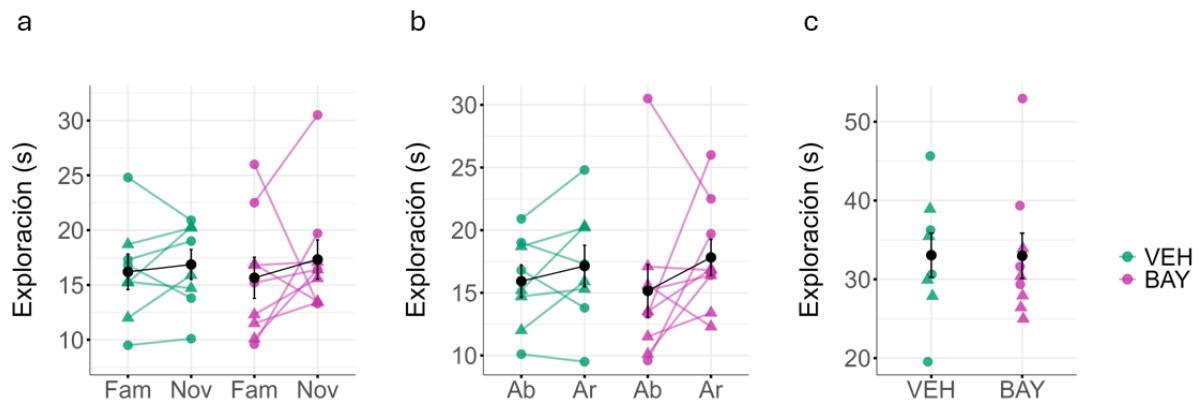


Figura S15. Análisis del entrenamiento de animales C57 inyectados con BAY 11-7082 intrahipocampal 3 horas después del entrenamiento en la tarea de NOR. (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. Se tomó como novedoso la posición en la que se colocó el objeto novedoso durante el testeo. **(b)** Preferencia de posición (Ab: abajo; Ar: arriba). **(c)** Tiempo total de exploración. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se muestra en la [Tabla S32](#).

a)							
Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	familiar	8	16.2	1.62	Tratamiento	$0_{(1, 14)}$	0.9956
VEH	novedoso	8	16.9	1.37	Tipo de objeto	$0.8314_{(1, 15)}$	0.3763
BAY	familiar	9	15.7	1.87	Trat. x Tipo objeto	$0.1465_{(1, 15)}$	0.7073
BAY	novedoso	9	17.3	1.79			
b)							
Tratamiento	Posicion	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	abajo	8	15.9	1.3	Tratamiento	$0_{(1, 14)}$	0.9956
VEH	arriba	8	17.1	1.65	Posición	$2.5687_{(1, 15)}$	0.1298
BAY	abajo	9	15.2	2.09	Trat. x Posición	$0.3444_{(1, 15)}$	0.566
BAY	arriba	9	17.8	1.44			
c)							
Tratamiento	n	media	ee		Factor	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	8	33.1	2.78		Tratamiento	$0_{(1, 14)}$	0.9956
BAY	9	33	2.88				

Tabla S32. Estadística descriptiva y análisis estadístico de los resultados del entrenamiento mostrados en la [Figura S15](#). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos y (b) preferencia de posición. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. (c) Tiempo total de exploración. ANOVA de un factor. En todos los casos se incluyó al sexo como variable aleatoria. Contrastes post-hoc por método de Tukey.

a)

Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee
VEH	familiar	9	2.22	0.325
VEH	novedoso	9	9.43	0.643
BAY	familiar	9	3.27	0.959
BAY	novedoso	9	7.08	0.992

Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	0.7092 ₍₁₎	0.39973
Tipo de objeto	102.9236 ₍₁₎	< 2e-16 ***
Trat. x Tipo objeto	4.7689 ₍₁₎	0.02898 *

Contrastes	p-valor
VEH familiar vs VEH novedoso	<.0001 ***
BAY familiar vs BAY novedoso	0.0604

b)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	9	0.809	0.0254
BAY	9	0.687	0.0582

Factor	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	5.2645 ₍₁₎	0.02177 *

c)

Tratamiento	n	media	ee
VEH	9	11.7	0.726
BAY	9	10.3	1.33

Factor	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Tratamiento	0.7466 ₍₁₎	0.3876

Tabla S33. Estadística descriptiva y análisis estadístico del testeo de animales inyectados con BAY 11-7082 intrahipocampal 6 horas después del entrenamiento en la tarea de NOR ([Figura 34](#)). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. (b) Índice de discriminación mostrado como proporción. GLM con distribución beta. (c) Tiempo de exploración total. ANOVA de un factor. Contrastes post-hoc por método de Tukey. *p < .05, ** p < .01, *** p < .001

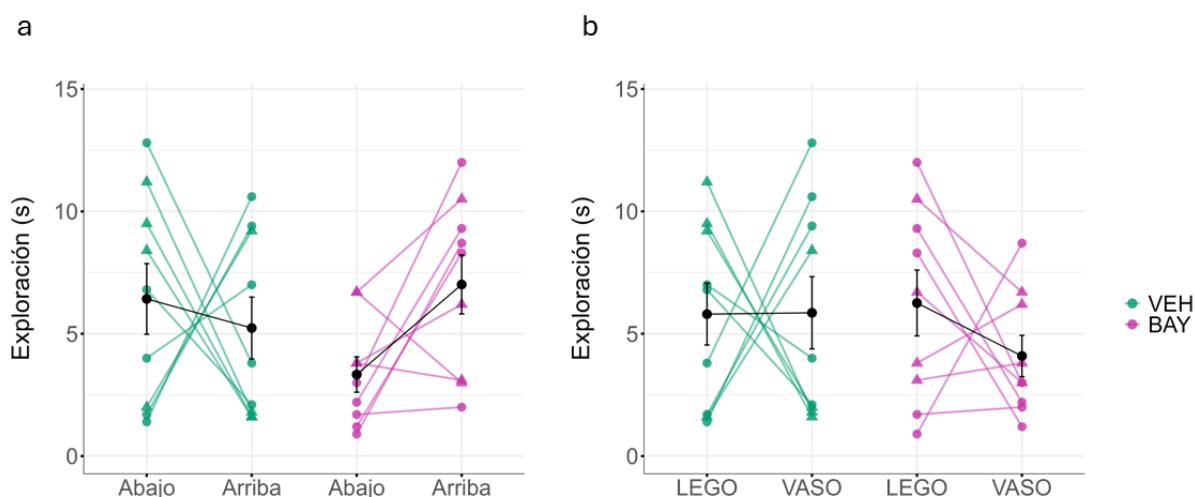


Figura S16. Análisis de la preferencia de posición y objeto durante el testeo de animales inyectados con BAY 11-7082 intrahipocampal 6 horas después del entrenamiento en la tarea de NOR. (a) Preferencia de posición (arriba vs abajo). (b) Preferencia de objeto (LEGO vs Vaso). En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se muestra en la [Tabla S34](#).

a)							
Tratamiento	Posición	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	abajo	9	6.42	1.44	Tratamiento	0.3044 _(1,15)	0.58929
VEH	arriba	9	5.23	1.26	Posición	1.0967 _(1,16)	0.31054
BAY	abajo	9	3.33	0.723	Trat. x Posición	4.1933 _(1,16)	0.05737
BAY	arriba	9	7.01	1.2			

b)							
Tratamiento	Objeto	n	media	ee	Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
VEH	LEGO	9	5.8	1.26	Tratamiento	0.2734 ₍₁₎	0.6011
VEH	VASO	9	5.86	1.48	Objeto	1.0793 ₍₁₎	0.2989
BAY	LEGO	9	6.26	1.34	Trat. x Objeto	0.7853 ₍₁₎	0.3755
BAY	VASO	9	4.09	0.844			

Tabla S34. Estadística descriptiva y análisis estadístico de las preferencias de posición y objeto mostrados en la [Figura S16](#). (a) Preferencia de posición y (b) de objeto. A la izquierda se muestra la estadística descriptiva y a la derecha los resultados del ANOVA de dos factores. Se utilizaron modelos lineales mixtos con cada ratón y el sexo como variables aleatorias.

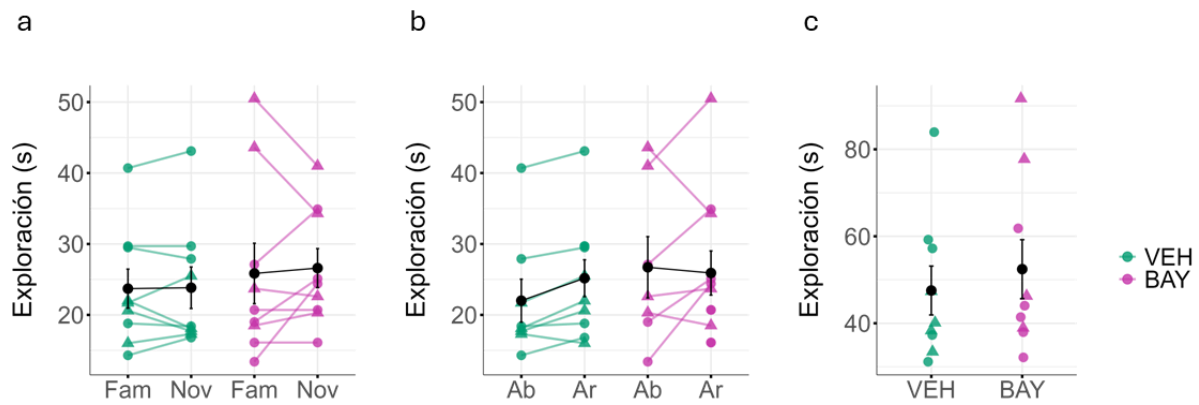


Figura S17. Análisis del entrenamiento de animales C57 inyectados con BAY 11-7082 intrahipocampal 6 horas después del entrenamiento en la tarea de NOR. (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos. Se tomó como novedoso la posición en la que se colocó el objeto novedoso durante el testeo. (b) Preferencia de posición (Ab: abajo; Ar: arriba). (c) Tiempo total de exploración. En negro se muestra la media $\pm$ error estándar. El análisis estadístico se muestra en la [Tabla S35](#).

a)							
Tratamiento	Tipo objeto	n	media	ee	Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
VEH	familiar	9	23.7	2.76	Tratamiento	0.3162 ₍₁₎	0.5739
VEH	novedoso	9	23.8	2.93	Tipo de objeto	0.0647 ₍₁₎	0.7992
BAY	familiar	9	25.8	4.26	Trat. x Tipo objeto	0.0611 ₍₁₎	0.8048
BAY	novedoso	9	26.6	2.75			

b)							
Tratamiento	Posición	n	media	ee	Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
VEH	abajo	8	22	3.03	Tratamiento	0.2672 _(1, 14)	0.61274
VEH	arriba	10	25.2	2.6	Posición	4.8211 _(1, 16)	0.04291 *
BAY	abajo	7	26.7	4.32	Trat. x Posición	0.2091 _(1, 16)	0.65353
BAY	arriba	11	25.9	3.11			

c)							
Tratamiento	n	media	ee		Factor	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
VEH	9	47.5	5.62		Tratamiento	0.3113 ₍₁₎	0.5769
BAY	9	52.4	6.77				

Tabla S35. Estadística descriptiva y análisis estadístico de los resultados del entrenamiento mostrados en la [Figura S17](#). (a) Tiempo de exploración de los objetos familiares y novedosos y (b) preferencia de posición. ANOVA de 2 factores con cada ratón como variable aleatoria. (c) Tiempo total de exploración. ANOVA de un factor. En todos los casos se incluyó al sexo como variable aleatoria. Contrastes post-hoc por método de Tukey. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

a)

Tratamiento	Región	n	media	ee
VEH	CA1	3	1336	142
VEH	CA3	3	1112	96.3
VEH	DG	3	1129	127
BAY	CA1	3	1200	112
BAY	CA3	3	1187	112
BAY	DG	3	1148	146

Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Región	0.0186 ₍₁₎	0.89163
Tratamiento	7.0724 ₍₂₎	0.02912 *
Región x Trat.	2.9213 ₍₂₎	0.23208

Factor	Contrastes	p-valor
CA1	VEH vs BAY	0.82
CA3	VEH vs BAY	0.9619
DG	VEH vs BAY	0.8477

b)

Tratamiento	Región	n	media	ee
VEH	CA1	3	0.139	0.0078
VEH	CA3	3	0.125	0.00837
VEH	DG	3	0.32	0.0173
BAY	CA1	3	0.139	0.00743
BAY	CA3	3	0.118	0.00596
BAY	DG	3	0.297	0.0185

Factores	$\chi^2_{(GL)}$	p-valor
Región	1.3949 ₍₁₎	0.2376
Tratamiento	347.6793 ₍₂₎	<2e-16 ***
Región x Trat.	0.6587 ₍₂₎	0.7194

Factor	Contrastes	p-valor
CA1	VEH vs BAY	0.9837
CA3	VEH vs BAY	0.6343
DG	VEH vs BAY	0.1765

Tabla S36. Estadística descriptiva y análisis estadístico de (a) intensidad de fluorescencia nuclear y (b) ratio de fluorescencia nuclear / total en distintas regiones del cerebro de animales inyectados con BAY 11-7082 en el hipocampo inmediatamente después del entrenamiento ([Figura 36](#)). La intensidad nuclear se analizó utilizando un modelo mixto y el ratio de intensidad utilizando un GLMM con distribución beta, seguidos de ANOVA de dos factores. En ambos casos se incluyó a cada animal variable aleatoria. Contrastes post-hoc por método de Tukey. *p < .05, ** p < .01, *** p < .001

Tratamiento	Región	n	media	ee
VEH	CA1	3	49.8	7.61
VEH	CA3	3	17.3	5.34
VEH	DG	3	17.8	3.18
BAY	CA1	3	30.2	4.58
BAY	CA3	3	34	3.44
BAY	DG	3	19.6	4.16

Factores	$F_{(GL1, GL2)}$	p-valor
Región	0.0088 _(1, 4)	0.92963
Tratamiento	9.6023 _(2, 44)	0.000341 ***
Región x Trat.	6.7827 _(2, 44)	0.002682 **

Factor	Contrastes	p-valor
CA1	VEH vs BAY	0.0095 **
CA3	VEH vs BAY	0.0244 *
DG	VEH vs BAY	0.8072

Tabla S37. Estadística descriptiva y análisis estadístico del número de células con marca positiva para p65 por mm³ ([Figura 37](#)). Se utilizó un modelo mixto con cada animal como variable aleatoria y ANOVA de dos factores. Contrastes post-hoc por método de Tukey. *p < .05, ** p < .01, *** p < .001

Referencias

- Alagband, Y., Kwapis, J. L., López, A. J., White, A. O., Aimuwu, O. V., Al-Kachak, A., Bodinayake, K. K., Oparaugo, N. C., Dang, R., Astarabadi, M., Matheos, D. P., & Wood, M. A. (2017). Distinct roles for the deacetylase domain of HDAC3 in the hippocampus and medial prefrontal cortex in the formation and extinction of memory. *Neurobiology of learning and memory*, 145, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.09.001>
- Alarcón, J. M., Malleret, G., Touzani, K., Vronskaya, S., Ishii, S., Kandel, E. R., & Barco, A. (2004). Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*, 42(6), 947–959. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.05.021>
- Alberini C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological reviews*, 89(1), 121–145. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2008>
- Ameneiro, L., Zalcman, G., Robles, A., & Romano, A. (2022). Characteristics of the Reminder that Triggers Object Recognition Memory Reconsolidation in Mice. *Neuroscience*, 497, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.03.014>
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive processing*, 13(2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 15(9), 618–624. <https://doi.org/10.1101/lm.1028008>
- Bayer, H., & Bertoglio, L. J. (2020). Infralimbic cortex controls fear memory generalization and susceptibility to extinction during consolidation. *Scientific reports*, 10(1), 15827. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72856-0>
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Goldin, A., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2711–2716. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711863105>
- Broide, R. S., Redwine, J. M., Aftahi, N., Young, W., Bloom, F. E., & Winrow, C. J. (2007). Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain. *Journal of molecular neuroscience: MN*, 31(1), 47–58. <https://doi.org/10.1007/BF02686117>

- Brown, M. W., & Aggleton, J. P. (2001). Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus?. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(1), 51–61. <https://doi.org/10.1038/35049064>
- Chen Lf, Fischle, W., Verdin, E., & Greene, W. C. (2001). Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5535), 1653–1657. <https://doi.org/10.1126/science.1062374>
- Chen, L. F., & Greene, W. C. (2003). Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 81(9), 549–557. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0469-0>
- Choi, J., Park, M. H., Shin, S. H., Byeon, J. J., Lee, B. I., Park, Y., & Shin, Y. G. (2021). Quantification and Metabolite Identification of Sulfasalazine in Mouse Brain and Plasma Using Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(4), 1179. <https://doi.org/10.3390/molecules26041179>
- Das, K. M., & Dubin, R. (1976). Clinical pharmacokinetics of sulphasalazine. *Clinical pharmacokinetics*, 1(6), 406–425. <https://doi.org/10.2165/00003088-197601060-00002>
- Datusalia, A. K., & Sharma, S. S. (2016). NF-κB Inhibition Resolves Cognitive Deficits in Experimental Type 2 Diabetes Mellitus through CREB and Glutamate/GABA Neurotransmitters Pathway. *Current neurovascular research*, 13(1), 22–32. <https://doi.org/10.2174/1567202612666151030104810>
- de la Fuente, V., Federman, N., Fustiñana, M. S., Zalcmán, G., & Romano, A. (2014). Calcineurin phosphatase as a negative regulator of fear memory in hippocampus: control on nuclear factor-κB signaling in consolidation and reconsolidation. *Hippocampus*, 24(12), 1549–1561. <https://doi.org/10.1002/hipo.22334>
- de la Fuente, V., Federman, N., Zalcmán, G., Salles, A., Freudenthal, R., & Romano, A. (2015). NF-κB transcription factor role in consolidation and reconsolidation of persistent memories. *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, 50. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00050>
- de Landeta, A. B., Pereyra, M., Medina, J. H., & Katche, C. (2020). Anterior retrosplenial cortex is required for long-term object recognition memory. *Scientific reports*, 10(1), 4002. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60937-z>
- de Landeta, A. B., Pereyra, M., Miranda, M., Bekinshtein, P., Medina, J. H., & Katche, C. (2021). Functional connectivity of anterior retrosplenial cortex in object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory*, 186, 107544. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107544>
- Do-Monte, F. H., Manzano-Nieves, G., Quiñones-Laracuente, K., Ramos-Medina, L., & Quirk, G. J. (2015). Revisiting the role of infralimbic cortex in fear extinction with optogenetics. *The Journal*

- of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 35(8), 3607–3615. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3137-14.2015>
- Dudai Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?. Annual review of psychology, 55, 51–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
- Federman, N., Fustiñana, M. S., & Romano, A. (2009). Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.), 16(10), 600–606. <https://doi.org/10.1101/lm.1537009>
- Federman, N., de la Fuente, V., Zalcmán, G., Corbi, N., Onori, A., Passananti, C., & Romano, A. (2013). Nuclear factor κ B-dependent histone acetylation is specifically involved in persistent forms of memory. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 33(17), 7603–7614. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4181-12.2013>
- Franklin, A. V., Rusche, J. R., & McMahon, L. L. (2014). Increased long-term potentiation at medial-perforant path-dentate granule cell synapses induced by selective inhibition of histone deacetylase 3 requires Fragile X mental retardation protein. Neurobiology of learning and memory, 114, 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.06.008>
- Freeman, F. M., Rose, S. P., & Scholey, A. B. (1995). Two-time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. Neurobiology of learning and memory, 63(3), 291–295. <https://doi.org/10.1006/nlme.1995.1034>
- Freudenthal, R., & Romano, A. (2000). Participation of Rel/NF-kappaB transcription factors in long-term memory in the crab Chasmagnathus. Brain research, 855(2), 274–281. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)02358-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02358-6)
- Freudenthal, R., Boccia, M. M., Acosta, G. B., Blake, M. G., Merlo, E., Baratti, C. M., & Romano, A. (2005). NF-kappaB transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. The European journal of neuroscience, 21(10), 2845–2852. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04126.x>
- Grecksch, G., & Matthies, H. (1980). Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. Pharmacology, biochemistry, and behavior, 12(5), 663–665. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90145-8](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90145-8)
- Hall, J., Thomas, K. L., & Everitt, B. J. (2000). Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. Nature neuroscience, 3(6), 533–535. <https://doi.org/10.1038/75698>
- Hartig F (2022). _DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models. R package version 0.4.6 <https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA>

- Haubrich, J., & Nader, K. (2018). Memory Reconsolidation. *Current topics in behavioral neurosciences*, 37, 151–176. https://doi.org/10.1007/7854_2016_463
- Heldt, S. A., Stanek, L., Chhatwal, J. P., & Ressler, K. J. (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular psychiatry*, 12(7), 656–670. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001957>
- Igaz, L. M., Vianna, M. R., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(15), 6781–6789. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06781.2002>
- Irrera, N., Pizzino, G., Calò, M., Pallio, G., Mannino, F., Famà, F., Arcoraci, V., Fodale, V., David, A., Francesca, C., Minutoli, L., Mazzon, E., Bramanti, P., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Lack of the Nlrp3 Inflammasome Improves Mice Recovery Following Traumatic Brain Injury. *Frontiers in pharmacology*, 8, 459. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00459>
- Ivanidze, J., Mackay, M., Hoang, A., Chi, J. M., Cheng, K., Aranow, C., Volpe, B., Diamond, B., & Sanelli, P. C. (2019). Dynamic Contrast-Enhanced MRI Reveals Unique Blood-Brain Barrier Permeability Characteristics in the Hippocampus in the Normal Brain. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 40(3), 408–411. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5962>
- Jiang, W., Li, M., He, F., Zhou, S., & Zhu, L. (2017). Targeting the NLRP3 inflammasome to attenuate spinal cord injury in mice. *Journal of neuroinflammation*, 14(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0980-9>
- Josselyn, S. A., Köhler, S., & Frankland, P. W. (2015). Finding the engram. *Nature reviews. Neuroscience*, 16(9), 521–534. <https://doi.org/10.1038/nrn4000>
- Kandel E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5544), 1030–1038. <https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Konopka, W., Kiryk, A., Novak, M., Herwerth, M., Parkitna, J. R., Wawrzyniak, M., Kowarsch, A., Michaluk, P., Dzwonek, J., Arnsperger, T., Wilczynski, G., Merckenschlager, M., Theis, F. J., Köhr, G., Kaczmarek, L., & Schütz, G. (2010). MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(44), 14835–14842. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3030-10.2010>
- Kornhuber, J., & Zoicas, I. (2020). Social Fear Memory Requires Two Stages of Protein Synthesis in Mice. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5537. <https://doi.org/10.3390/ijms21155537>

- Korzus, E., Rosenfeld, M. G., & Mayford, M. (2004). CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron*, 42(6), 961–972. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.002>
- Kwapis, J. L., Alaghband, Y., López, A. J., White, A. O., Campbell, R. R., Dang, R. T., Rhee, D., Tran, A. V., Carl, A. E., Matheos, D. P., & Wood, M. A. (2017). Context and Auditory Fear are Differentially Regulated by HDAC3 Activity in the Lateral and Basal Subnuclei of the Amygdala. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(6), 1284–1294. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.274>
- Kwapis, J. L., Alaghband, Y., López, A. J., Long, J. M., Li, X., Shu, G., Bodinayake, K. K., Matheos, D. P., Rapp, P. R., & Wood, M. A. (2019). HDAC3-Mediated Repression of the Nr4a Family Contributes to Age-Related Impairments in Long-Term Memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(25), 4999–5009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2799-18.2019>
- Lenth R (2024). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.10.4, <<https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>>.
- Levenson, J. M., O'Riordan, K. J., Brown, K. D., Trinh, M. A., Molfese, D. L., & Sweatt, J. D. (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of biological chemistry*, 279(39), 40545–40559. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402229200>
- Lima Giacobbo, B., Doorduyn, J., Klein, H. C., Dierckx, R. A. J. O., Bromberg, E., & de Vries, E. F. J. (2019). Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Molecular neurobiology*, 56(5), 3295–3312. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1283-6>
- Locatelli, F., Maldonado, H., & Romano, A. (2002). Two critical periods for cAMP-dependent protein kinase activity during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiology of learning and memory*, 77(2), 234–249. <https://doi.org/10.1006/nlme.2001.4007>
- Louis Sam Titus, A. S. C., Sharma, D., Kim, M. S., & D'Mello, S. R. (2019). The Bdnf and Npas4 genes are targets of HDAC3-mediated transcriptional repression. *BMC neuroscience*, 20(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0546-0>
- Maddox, S. A., Monsey, M. S., & Schafe, G. E. (2010). Early growth response gene 1 (Egr-1) is required for new and reactivated fear memories in the lateral amygdala. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 18(1), 24–38. <https://doi.org/10.1101/lm.1980211>
- Malvaez, M., McQuown, S. C., Rogge, G. A., Astarabadi, M., Jacques, V., Carreiro, S., Rusche, J. R., & Wood, M. A. (2013). HDAC3-selective inhibitor enhances extinction of cocaine-seeking behavior in a persistent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(7), 2647–2652. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213364110>

- McGaugh, J. L., & Alpern, H. P. (1966). Effects of Electroshock on Memory: Amnesia without Convulsions. *Science* (New York, N.Y.), 152(3722), 665–666. <https://doi.org/10.1126/science.152.3722.665>
- McGaugh J. L. (1973). Drug facilitation of learning and memory. *Annual review of pharmacology*, 13, 229–241. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.13.040173.001305>
- McGaugh J. L. (2000). Memory—a century of consolidation. *Science* (New York, N.Y.), 287(5451), 248–251. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
- McQuown, S. C., Barrett, R. M., Matheos, D. P., Post, R. J., Rogge, G. A., Alenghat, T., Mullican, S. E., Jones, S., Rusche, J. R., Lazar, M. A., & Wood, M. A. (2011). HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(2), 764–774. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5052-10.2011>
- Merlo, E., Freudenthal, R., & Romano, A. (2002). The I κ B kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience*, 112(1), 161–172. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00049-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00049-0)
- Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., & Nabeshima, T. (2000). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(18), 7116–7121. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-18-07116.2000>
- Moncada, D., & Viola, H. (2007). Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(28), 7476–7481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1083-07.2007>
- Morici, J. F., Bekinschtein, P., & Weisstaub, N. V. (2015). Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. *Behavioural brain research*, 292, 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.06.030>
- Moynagh P. N. (2005). The NF-kappaB pathway. *Journal of cell science*, 118(Pt 20), 4589–4592. <https://doi.org/10.1242/jcs.02579>
- Nair, A. B., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of basic and clinical pharmacy*, 7(2), 27–31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
- Pachitariu, M., & Stringer, C. (2022). Cellpose 2.0: how to train your own model. *Nature methods*, 19(12), 1634–1641. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01663-4>
- Paxinos, G. and Franklin, K.B.J. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd Edition, Academic Press, San Diego.

- Phan, M. L., Gergues, M. M., Mahidadia, S., Jimenez-Castillo, J., Vicario, D. S., & Bieszczad, K. M. (2017). HDAC3 Inhibitor RGFP966 Modulates Neuronal Memory for Vocal Communication Signals in a Songbird Model. *Frontiers in systems neuroscience*, 11, 65. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00065>
- Posit team (2025). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>.
- Quevedo, J., Vianna, M. R., Roesler, R., de-Paris, F., Izquierdo, I., & Rose, S. P. (1999). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.), 6(6), 600–607. <https://doi.org/10.1101/lm.6.6.600>
- R Core Team (2024). *_R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Richter, K., Wolf, G., & Engelmann, M. (2005). Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.), 12(4), 407–413. <https://doi.org/10.1101/lm.97505>
- Robles, A (2018). Papel de la acetilación de histonas en la memoria de reconocimiento de objeto y en el déficit mnésico en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer. Tesis de Grado. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Rogge, G. A., Singh, H., Dang, R., & Wood, M. A. (2013). HDAC3 is a negative regulator of cocaine-context-associated memory formation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(15), 6623–6632. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4472-12.2013>
- Šakić B. (2019). Cerebrospinal fluid collection in laboratory mice: Literature review and modified cisternal puncture method. *Journal of neuroscience methods*, 311, 402–407. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.09.025>
- Sartor, G. C., Malvezzi, A. M., Kumar, A., Andrade, N. S., Wiedner, H. J., Vilca, S. J., Janczura, K. J., Bagheri, A., Al-Ali, H., Powell, S. K., Brown, P. T., Volmar, C. H., Foster, T. C., Zeier, Z., & Wahlestedt, C. (2019). Enhancement of BDNF Expression and Memory by HDAC Inhibition Requires BET Bromodomain Reader Proteins. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(4), 612–626. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1604-18.2018>
- Stack, A., Carrier, N., Dietz, D., Hollis, F., Sorenson, J., & Kabbaj, M. (2010). Sex differences in social interaction in rats: role of the immediate-early gene zif268. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(2), 570–580. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.163>

- Stark, L. A., & Dunlop, M. G. (2005). Nucleolar sequestration of RelA (p65) regulates NF-kappaB-driven transcription and apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 25(14), 5985–6004. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.5985-6004.2005>
- Stefanko, D. P., Barrett, R. M., Ly, A. R., Reolon, G. K., & Wood, M. A. (2009). Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), 9447–9452. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903964106>
- Stirling, D. R., Swain-Bowden, M. J., Lucas, A. M., Carpenter, A. E., Cimini, B. A., & Goodman, A. (2021). CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability. *BMC bioinformatics*, 22(1), 433. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04344-9>
- Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M., & Pachitariu, M. (2021). Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nature methods*, 18(1), 100–106. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x>
- Stringer, C., & Pachitariu, M. (2025). Cellpose3: one-click image restoration for improved cellular segmentation. *Nature methods*, 22(3), 592–599. <https://doi.org/10.1038/s41592-025-02595-5>
- Tuscher, J. J., Taxier, L. R., Fortress, A. M., & Frick, K. M. (2018). Chemogenetic inactivation of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex, individually and concurrently, impairs object recognition and spatial memory consolidation in female mice. *Neurobiology of learning and memory*, 156, 103–116. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.11.002>
- Tyler, W. J., Alonso, M., Bramham, C. R., & Pozzo-Miller, L. D. (2002). From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 9(5), 224–237. <https://doi.org/10.1101/lm.51202>
- Veyrac, A., Besnard, A., Caboche, J., Davis, S., & Laroche, S. (2014). The transcription factor Zif268/Egr1, brain plasticity, and memory. *Progress in molecular biology and translational science*, 122, 89–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420170-5.00004-0>
- Vogel-Ciernia, A., Matheos, D. P., Barrett, R. M., Kramár, E. A., Azzawi, S., Chen, Y., Magnan, C. N., Zeller, M., Sylvain, A., Haettig, J., Jia, Y., Tran, A., Dang, R., Post, R. J., Chabrier, M., Babayan, A. H., Wu, J. I., Crabtree, G. R., Baldi, P., Baram, T. Z., ... Wood, M. A. (2013). The neuron-specific chromatin regulatory subunit BAF53b is necessary for synaptic plasticity and memory. *Nature neuroscience*, 16(5), 552–561. <https://doi.org/10.1038/nn.3359>
- Winters, B. D., & Bussey, T. J. (2005). Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(1), 52–61. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3827-04.2005>

- Winters, B. D., & Bussey, T. J. (2005). Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(17), 4243–4251. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0480-05.2005>
- Yeh, S. H., Lin, C. H., & Gean, P. W. (2004). Acetylation of nuclear factor-kappaB in rat amygdala improves long-term but not short-term retention of fear memory. *Molecular pharmacology*, 65(5), 1286–1292. <https://doi.org/10.1124/mol.65.5.1286>
- Zalcman, G., Federman, N., de la Fuente, V., & Romano, A. (2015). Nuclear factor kappa B-dependent Zif268 expression in hippocampus is required for recognition memory in mice. *Neurobiology of learning and memory*, 119, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.12.013>
- Zhang, Y., Xu, D., Qi, H., Yuan, Y., Liu, H., Yao, S., Yuan, S., & Zhang, J. (2018). Enriched environment promotes post-stroke neurogenesis through NF-κB-mediated secretion of IL-17A from astrocytes. *Brain research*, 1687, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.030>
- Zovkic, I. B., Guzman-Karlsson, M. C., & Sweatt, J. D. (2013). Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 20(2), 61–74. <https://doi.org/10.1101/lm.026575.112>