



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio de los mecanismos neurobiológicos involucrados en la separación y compleción de memorias en la corteza perirrinal y el hipocampo

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de CIENCIAS BIOLÓGICAS

Magdalena Miranda

Director de tesis: *Pedro Bekinschtein*

Consejero de estudios: *Eleonora Katz*

Lugar de trabajo: *Laboratorio de Memoria y Cognición Molecular, Instituto de Neurociencia Cognitiva y Translacional, CONICET-INECO-Universidad Favaloro.*

Buenos Aires, 2019

Indice

Resumen.....	3
Agradecimientos.....	7
Publicaciones.....	9
Abreviaturas.....	10
Introducción.....	13
Historia de las representaciones cognitivas.....	13
El lóbulo temporal medial y la memoria.....	15
Hipocampo.....	17
Corteza perirrinal.....	19
Las distintas memorias.....	22
La memoria como proceso.....	23
Detección de novedad: ¡Qué hay de nuevo, viejo!.....	26
Separación de patrones y compleción de patrones.....	27
La memoria como sustrato.....	36
Proteínas relacionadas con plasticidad en el cerebro.....	40
RNMDAs, detectores de coincidencias.....	41
BDNF, el persistente.....	43
Arc, el sináptico.....	46
Objetivos.....	52
Materiales y métodos.....	54

<u>Capítulo 1. Mecanismos moleculares en la corteza perirrinal y giro dentado</u>	
<u>selectivamente necesarios para la diferenciación en la memoria de trazas de</u>	
<u>objetos y espaciales</u>	67
<i>PARTE 1. Mecanismos moleculares en la corteza perirrinal selectivamente</i>	
<i>necesarios para la discriminación de memorias similares, pero independientes</i>	
<i>de su persistencia</i>	67
Resultados.....	68
<i>PARTE 2. Comparación entre los mecanismos moleculares implicados en la</i>	
<i>discriminación de memorias similares espaciales y no espaciales en el GD y la</i>	
<i>Prh</i>	87
Resultados.....	88
<u>Capítulo 2. Rol del giro dentado en la diferenciación de memorias de objetos</u>	
<u>similares</u>	94
Resultados.....	94
<u>Capítulo 3. El rol de los rNMDAs y BDNF en el balance entre separación de patrones</u>	
<u>y compleción de patrones a nivel conductual</u>	112
Resultados.....	112
Discusión.....	134
Conclusiones finales.....	170
Referencias.....	172

Estudio de los mecanismos neurobiológicos involucrados en la separación y compleción de memorias en la corteza perirrinal y el hipocampo

La memoria no sólo implica recordar a lo largo del tiempo sino también mantener los recuerdos diferenciados y no confundirlos. Se cree que la capacidad de separar experiencias similares en recuerdos distintos se basa en la separación de patrones, un proceso computacional mediante el cual se amplifican pequeñas diferencias en la entrada de información. Sin embargo, dado que nuestro entorno cambia constantemente, también es crucial para la memoria episódica recordar nuestras experiencias anteriores a pesar de los cambios ambientales. Los modelos computacionales sugieren la existencia de un proceso complementario de compleción de patrones mediante el cual redes neuronales podrían recuperar memorias completas a partir de señales parciales o degradadas. Se cree que la región CA3 del hipocampo podría mediar este mecanismo mediante la mejora plástica de las conexiones colaterales recurrentes de las neuronas CA3 que estaban activas durante el aprendizaje. Por otro lado, la separación de patrones se ha investigado en el giro dentado del hipocampo (GD), pero se sabe muy poco sobre este proceso en otras regiones del cerebro como la corteza perirrinal (Prh). En primer lugar, investigamos el papel de proteínas relacionadas con la plasticidad en la Prh y GD para la separación de patrones de las memorias de reconocimiento de objetos no espaciales. Encontramos que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es necesario para el almacenamiento en forma diferenciada de representaciones de objetos similares, pero no cuando estas representaciones son distintas. Además, el mecanismo está mediado por la proteína asociada al citoesqueleto regulada por la actividad (Arc). Finalmente, usando tanto una tarea dependiente del hipocampo como una dependiente de la Prh y manipulando la carga de similitud entre estímulos durante la codificación de la información, encontramos que los rNMDAs son efectores para las acciones plásticas del BDNF en la consolidación de memorias de objetos similares y deposiciones en el espacio en la Prh y DG respectivamente. Encontramos un rol de BDNF y Arc en la consolidación, en forma independiente del intervalo de retención de la memoria (la misma demanda de persistencia de memoria estaba presente en todas las condiciones). La interacción entre rNMDAs, BDNF y Arc parece ser necesaria para una discriminación exitosa en una forma independiente de la categoría del estímulo, argumentando a favor de mecanismos de plasticidad molecular conservados en todas las regiones a pesar de sus diferencias anatómicas. Proporcionamos evidencia novedosa con respecto a las proteínas

involucradas en la desambiguación de recuerdos de objetos fuera y dentro del GD y sugerimos que, a pesar de las diferencias anatómicas, mecanismos similares subyacen a la separación de patrones en el GD y la Prh que dependen exclusivamente de la similitud de los estímulos.

Luego, decidimos estudiar la compleja interacción entre la separación de patrones y la compleción de patrones mediante tareas de comportamiento adecuadas. Con este fin, manipulamos la cantidad de señales disponibles durante la recuperación (fase de prueba) en una tarea de reconocimiento espontáneo de objetos para investigar la función de los receptores NMDA en CA3 (rNMDAs). Mostramos que la intervención farmacológica de los receptores CA3 rNMDAs del hipocampo altera de manera bidireccional la recuperación de la memoria espacial solo cuando las señales se degradan. Manipulaciones similares en el giro dentado no tienen ningún efecto sobre la compleción de patrones, pero sí sobre la separación. Estos hallazgos sugieren que los rNMDAs en CA3 son necesarios para la recuperación de memorias espaciales cuando se reduce la cantidad de información ambiental, y que los cambios plásticos en el giro dentado y CA3 son importantes para definir si la separación o la compleción de patrones se producen cuando se exponen a un contexto modificado.

Palabras clave:

CORTEZA PERIRRINAL-GIRO DENTADO- RECONOCIMIENTO DE OBJETOS-
SEPARACIÓN DE PATRONES-COMPLECIÓN DE PATRONES-CONSOLIDACIÓN

Study of the neurobiological mechanisms involved in the separation and completion of memories in the hippocampus and perirhinal cortex

Successful memory involves not only remembering over time but also keeping memories distinct. The ability to separate similar experiences into distinct memories is thought to rely on pattern separation, a computational process by which small differences in inputs are amplified. However, because our environment is permanently evolving, it is also crucial for episodic memory to remember our previous experiences despite environmental changes. Computational models have suggested the existence of a complementary pattern completion process by which networks could retrieve entire memories from partial or degraded cues. The CA3 region of the hippocampus was proposed to mediate this computation by the plastic enhancement of the recurrent collateral connections of CA3 neurons that were active during learning. On the other hand, pattern separation has been investigated in the dentate gyrus of the hippocampus (DG), but little is known about this process in other brain regions like the perirhinal cortex (Prh). First, we investigated the role of plasticity related proteins in the Prh and DG for pattern separation of non-spatial object recognition memories. We found that perirhinal Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for separable storage of overlapping, but not distinct, object representations, which is identical to its role in the DG for spatial representations. Also, Activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc) is required for this disambiguation of object memories, as measured by infusion of antisense oligonucleotides. This is the first time Arc has been implicated in the discrimination of objects with overlapping features. Finally, using both a hippocampal-dependent and a PRH-dependent task and manipulating the load of similarity between stimuli during information encoding, we found that rNMDAs are effectors for the plastic actions of BDNF on consolidation of both overlapping object and spatial memories in the Prh and DG respectively. Although molecular mechanisms for object memory have been shown previously in Prh, these have been dependent on delay, suggesting a role specifically in memory duration. BDNF and Arc involvement were independent of delay — the same demand for memory persistence was present in all conditions — but only when discrimination of similar objects was required were these mechanisms recruited and necessary. We show that BDNF and Arc participate in the

same pathway during consolidation of overlapping object memories. The interaction between rNMDAs and BDNF seems to be necessary for a successful discrimination in a domain-independent fashion, arguing in favor of conserved molecular plasticity mechanisms across regions despite their anatomical differences. We provide novel evidence regarding the proteins involved in the disambiguation of object memories outside the DG and suggest that, despite the anatomical differences, similar mechanisms underlie pattern separation in the DG and Prh that are engaged depending exclusively on the similarity of the stimuli. Then, we decided to study the complex interplay between pattern separation and pattern completion processes by assessing the behavioral use of pattern separated or pattern completed representations. For this purpose, we manipulated the amount of cues available during retrieval (test phase) in a spontaneous object recognition task to investigate the function of CA3 NMDA-receptors (rNMDAs) for pattern completion in male rats. We show that pharmacological intervention of hippocampal CA3 rNMDAs receptors affects in a bidirectional manner retrieval of the spatial memory but only when cues are degraded, while similar manipulations in the dentate gyrus have no effect over behavioral pattern completion but they do over behavioral pattern separation. These findings suggest that rNMDAs in CA3 are necessary for the retrieval of spatial memories when the amount of environmental information is reduced, and that plastic changes in the dentate gyrus and CA3 are important to define if behavioral pattern separation or pattern completion occurs when exposed to a modified context.

Key words:

PERIRHINAL CORTEX-DENTATE GYRUS- OBJECT RECOGNITION-PATTERN SEPARATION –PATTERN COMPLETION-CONSOLIDATION

Agradecimientos

Aprovecho esta oportunidad para mostrar mi agradecimiento a todos los que contribuyeron en gran medida con lo que terminó siendo esta tesis:

A Pedro, gracias por recibirme para formar parte de tu laboratorio cuando todavía era solo una idea, por estar presente en cualquier discusión que se me planteará, por enseñarme a plantearme preguntas y generarme ideas propias, por darme la confianza para hacer sentir mi trabajo como algo realmente mío y para largarme sola en mis proyectos, y también la libertad para manejarlos. El doctorado fue un gran aprendizaje para mí y eso es en gran parte gracias a vos.

A Noe, siempre solucionadora y sagaz, tu ayuda siempre fue un salvavidas en medio del caos del doctorado, me siento muy afortunada de contar con tu apoyo, de haberte tenido cerca, y eso es porque valoro mucho tu opinión y tu persona

A Erni, por todas los almuerzos de domingo post-lab, por acompañarme con ese ruido lindo que sabes hacer, por ser mi compañero en todas, porque sigamos trabajando cada uno en su parte aparte de la ratonera, que igualmente siempre te siento al lado mío

A mi vieja, que me hace la pata en todas, y siempre sabe lo que me hace bien y me lo hace llegar cual delivery de cariño, tus fuerzas para que todo terminé bien también quedaron plasmadas acá

A Facu, mi as bajo la manga, siempre presente, sobre todo en esta tesis, que realmente la parimos juntos, inmensas gracias por ser desde consejero-güru espiritual hasta espía infiltrado con tal de que las cosas sucedan. Si hay alguien que puede lograr cosas con solo pensarlo y no es superhéroe sos vos

A mis compañeros de siempre, Fran y Dani, por la ayuda incondicional, por las charlas filosóficas que empiezan con un café y terminan quien sabe cómo, y sobre todo por estar por su amistad...y por hacerme sentir que mi trabajo era algo que se movía en conjunto hacia adelante, que éramos todos juntos llevando la carreta, y que aunque sea solo en estas cuatro paredes el mundo se parezca a un lugar donde me gustaría pasarla.

A los nuevitos, por hacerme compañía y darme charla cuando estaba solita...Se siente más grande y alegre todo ahora que ustedes llegaron...y Din gracias por dejarme ser tu guía, por escuchar mis consejos y confiar en mí palabra y criterios

A mi familia y amigos, por escuchar mis desplantes y dejarme compartir mis angustias y confiarme las tuyas, por hacerme sentir que no soy la única que a veces la pasa como el culo

A los bioteristas que ayudaron en los entretelones de todo esto, y a toda la gente que me fue dando una mano en el camino, que fueron varios y sumaron mucho (sea un consejo, una alícuota de anticuerpo o un mate en algún recreito)

Imagino que siempre se siente así, como que acá termina todo, que no termino de agarrar nada, y que como siempre todo lo que toco se me cae, pero también me parece que esto ya lo viví y no era más que la punta de la cola de algo más grande...

Los experimentos presentados en esta tesis han resultado en las siguientes publicaciones:

- ***Molecular Mechanisms in Perirhinal Cortex Selectively Necessary for Discrimination of Overlapping Memories, but Independent of Memory Persistence.*** Miranda M, Kent BA, Morici JF, Gallo F, Weisstaub NV, Saksida LM, Bussey TJ, Bekinschtein P. *eNeuro*. (2017)
(doi: 10.1523/ENEURO.0293-17.2017)
- ***NMDA receptors and BDNF are necessary for discrimination of overlapping spatial and non-spatial memories in perirhinal cortex and hippocampus.*** Miranda M, Kent BA, Morici JF, Gallo F, Weisstaub NV, Saksida LM, Bussey TJ, Bekinschtein P. *Neurobiology of Learning and Memory* (2018).
(doi: 10.1016/j.nlm.2018.08.019)

Abreviaturas

MR Medidas repetidas

GD Giro dentado

HP Hipocampo

Prh Corteza Perirrinal

LTP Potenciación de largo término, del inglés *Long Term Potentiation*

LTD Depresión de largo término, del inglés *Long Term Depression*

RO Reconocimiento de objetos

REO Reconocimiento espontáneo de objetos,

REP Reconocimiento espontáneo de posiciones

MCT Memoria de corto término

MLT Memoria de largo término

rNMDA Receptores de tipo NMDA

rmGlu Receptores metabotrópicos de glutamato

LTM Lóbulo temporal medial

NMDA N-metil- D-aspartato

AMPA Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

rAMPA Receptores tipo AMPA

EA Evocación asociativa

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

IEG Genes tempranos, del inglés *Immediate early genes*

PKA Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico

ERK Quinasas reguladas extracelularmente, del inglés *Extracellular regulated kinases*

MAPK Del inglés, Mitogen Activated Protein Kinases

Arc Proteína del citoesqueleto regulada por actividad, del inglés *Activity regulated cytoskeleton protein*

CREB Proteína de union a elementos de respuesta cAMP, del inglés *cAMP response element-binding protein*

PI3K Fosfatidil inositol 3 quinasa, del inglés *Phosphatidylinositol 3 kinase*

PLC γ Fosfolipasa gamma C, del inglés *Phospholipase C gamma*

CE Corteza entorrinal

VP Vía perforante

FM Fibras musgosas

KO Del inglés, *Knock out*

MWM Laberinto de agua de Morris, del inglés *Morris Water Maze*

DMS Emparejamiento a la muestra retrasado, del inglés, "*Delayed Matching to Sample*"

ARNm Ácido ribonucleico mensajero

ODN Oligonucleótido

VGCC Canales de calcio voltaje dependientes, del inglés *Voltage Gated Calcium Channels*

MAP2 Proteína asociada a microtúbulos, del inglés *Microtubule Associated Protein 2*

DO Densidad Óptica

MSO Del inglés, *Missense*

ASO Del inglés, *Antisense*

Veh Vehículo

BDNFr BDNF recombinante humano

Sub Subiculum

CEM Corteza entorrinal medial

CEL Corteza entorrinal lateral

D-Cic D-Cicloserina

ROC Del inglés, "Receiver Operator Curve"

TBS Del inglés, *theta burst stimulation*

mTOR Del inglés, *mammalian target of rapamycin*

Introducción

Historia de las representaciones cognitivas

Aristóteles consideraba que al nacimiento nuestra mente estaba vacía (*tabula rasa*) y la representación en nuestra mente se lograba a través de nuestra experiencia ¹, por lo cual el aprendizaje de hechos y experiencias era lo que nos llevaba al conocimiento. En sus trabajos, identificó al corazón como el lugar donde se alojaba el intelecto. Sin embargo, ahora sabemos que el sitio fuente del pensamiento, la memoria, la consciencia y gran parte de lo que nos distingue como seres humanos es el cerebro.

Un momento clave en la historia de la neurociencia fue cuando por primera vez se planteó la posibilidad de la localización anatómica de las funciones en el cerebro. El médico y neuroanatomista austríaco Franz Joseph Gall (1757-1828) propuso que el cerebro no es sólo un órgano, sino que consiste al menos en varios centros, cada uno de los cuales se relaciona con una función mental. Sugirió que el desarrollo de cada uno de estos centros, que podían aumentar su tamaño de acuerdo al uso, era capaz de modificar la forma del cráneo, generando un patrón de proyecciones. A partir del tamaño y posición de estos relieves craneales creía posible estimar la personalidad del individuo. Las ideas de Gall fueron muy controversiales porque implicaban una concepción materialista de la mente, al afirmar que determinadas partes del cerebro rigen funciones tan específicamente humanas como la esperanza, la generosidad o la autoestima. Cuando Paul Broca en 1861 por primera vez asoció la alteración del lenguaje de un paciente con su lesión en el giro frontal del cerebro, se generó un auge de la idea de localización estricta de las funciones cerebrales. Luego, en 1874 Karl Wernicke postuló que sólo las funciones mentales más elementales, como las actividades motoras o perceptivas sencillas, tienen una localización en una única región cerebral. Las conexiones entre las diversas áreas hacen posible las funciones intelectuales complejas. Al colocar el principio de la función localizada en un marco conectivista, Wernicke indicaba implícitamente que diferentes aspectos de una misma función son procesados en diferentes lugares del cerebro. Esta noción, que se conoce hoy como procesamiento distribuido, considera que el conocimiento no queda codificado en forma de símbolos fijos, que estarían alojados en determinados lugares del cerebro, sino en forma de elementos elaborados que se encuentran distribuidos en diferentes neuronas, todas ellas conectadas entre sí. Luria planteó la necesidad de cambiar el concepto localizacionista de función de la neurología clásica. De acuerdo a su

teoría, cada proceso cognitivo y comportamental resulta de la coordinación de un gran número de distintos componentes, cada uno de ellos localizado en distintas regiones cerebrales, pero todos ellos trabajando en interacciones dinámicas. De estas ideas, surgió el término de sistemas funcionales para referirse a sistemas de estructuras que trabajan no por sí solas sino concertadamente con otras regiones cumpliendo funciones o procesos cognitivos, término que forma parte de la visión moderna del funcionamiento cerebral.

En gran parte como una respuesta al enfoque conductista que buscaba predecir el comportamiento humano en términos de estímulo-respuesta, y su idea del cerebro como una tabula rasa en la que no se mencionaban procesos o estados mentales ya que estos no eran observables y por lo tanto no podían estudiarse, en 1950 comenzó a darse el movimiento conocido como la revolución cognitiva. Este cambio de paradigma se basó en la idea de que el mundo mental podía estudiarse dentro del mundo físico en términos de estados y procesos mentales que intervienen entre los estímulos y la respuesta, y esta noción tomó la forma de metáfora computacional comparando estos procesos mentales con algoritmos. El cerebro de acuerdo a esta concepción evalúa su entorno a través de procesos sensoriales o perceptivos; simboliza los resultados de estas evaluaciones por valores almacenados en la memoria; manipula esos valores por medio de las operaciones mentales relevantes (percepción, pensamiento); y usa los resultados (percepciones, inferencias y deducciones) para controlar el comportamiento. Desde una perspectiva cognitivista, la psicología es el estudio de las representaciones mentales, cómo se generan y cómo estas afectan el comportamiento. Una representación mental es un sistema de símbolos isomorfo a algún aspecto del entorno, utilizado para tomar decisiones que generan un comportamiento que anticipa eventos y relaciones en ese entorno. De esta forma, las representaciones son usadas para sustituir eventos externos o internos (almacenar información o anticipar acciones futuras, por ejemplo). Un sistema representacional tiene los siguientes componentes: símbolos, que se refieren a aspectos del entorno; operaciones de procesamiento de símbolos, que representan información requerida por el comportamiento sobre el entorno; procesos de detección y medición, que relacionan las variables simbólicas con los aspectos del mundo al que se refieren; y procesos de decisión, que traducen las variables de decisión en acciones observables. El concepto de representación mental interna es fundamental para la psicología cognitiva, ya que este permite explicar el comportamiento y los estados mentales en función de

entidades o procesos que median entre el estímulo y la respuesta. Estas representaciones actúan relacionando causalmente el estímulo con su respuesta, y su poder explicativo de los procesos cognitivos subyacentes depende de la interpretación de significado que se les da.

El modelo conceptual que apoya estos modelos conexionistas comenzó a emerger en la teoría neuronal de Hebb ² que propone que el cerebro funciona por la unión de neuronas relacionadas a través de redes neuronales ampliamente distribuidas en el cerebro. El cerebro comenzó a verse como un circuito formado por neuronas conectadas entre sí, lo que les permite transmitir y almacenar la información. Comenzaron a obtenerse evidencias de que circuitos de neuronas en el cerebro sí representan, en el sentido de que cambian sus estados en formas no aleatorias sino relacionadas a los cambios en la información que reciben.

El lóbulo temporal medial y la memoria

El aprendizaje puede ser definido como el proceso por el cual la conducta varía a lo largo del tiempo adaptándose a los cambios que se producen en el entorno. El hecho de que la conducta sea modificable es posible gracias a una serie de procesos complejos: las características del ambiente son detectadas por nuestros receptores sensoriales, que convierten estos estímulos físicos en patrones de actividad neuronal, que luego son procesados a través de circuitos neuronales distribuidos para luego integrarlos en una representación holística, que determina la realidad que percibimos, la compara con conocimientos anteriores y genera una respuesta a estos estímulos. Este proceso de adquisición de nuevos conocimientos o conductas implica un cambio en la memoria.

En el siglo XIX, Lashley se dedicó al estudio de la localización de la memoria (o “engrama”) y su fracaso para encontrarla lo llevó a la conclusión de que la función mnemónica se encuentra distribuida por toda la corteza y la contribución de cada una de las regiones a la memoria es equivalente ³. Esta visión dominó el campo por muchos años, hasta que en 1957 Brenda Milner reportó los profundos efectos mnemónicos en ausencia de fallas intelectuales o perceptuales del paciente H.M., cuyo lóbulo temporal medial fue removido casi por completo quirúrgicamente^{4,5}.

El lóbulo temporal medial (LTM) está formado por el hipocampo (regiones CA, giro dentado y subiculum) y las cortezas adyacentes, entorrinal, perirrinal y parahipocampal. La visión más común del sistema mnemónico del LTM indica que este grupo de

estructuras anatómicamente relacionadas trabaja interdependiente al servicio de la memoria declarativa (la memoria de los hechos y las experiencias personales) ⁶. Dentro de este grupo de estructuras, se suele colocar al hipocampo en la cima de la jerarquía ya que recibe información convergente de todas las demás áreas del LTM, lo que refuerza la idea de que el hipocampo es importante para toda clase de memoria declarativa ^{7,8}. Un enfoque contrastante enfatiza la presencia de sistemas mnemónicos funcionalmente disociables relacionados con divisiones dentro de las memorias declarativas. Las disociaciones funcionales dentro del LTM sugieren un arreglo según el cual el hipocampo (HP) tendría un rol específico en la memoria asociativa o relacional y de “recuerdo” (del inglés, *recollection*), mientras que la corteza perirrinal (Prh) sería crítica para el reconocimiento dependiente de familiaridad ^{9,10}. Este argumento se basa en un gran número de estudios de resonancia magnética funcional (RMf) en humanos en los que se ha visto asociado al hipocampo con aspectos espacio-temporales de la memoria episódica, y a la Prh con la memoria de familiaridad ¹¹⁻¹⁶. Otras teorías se basan en la idea de que según su naturaleza y complejidad, estímulos particulares pueden ser procesados por diferentes regiones del cerebro ¹⁷, y sostienen una disociación de la función entre Prh y HP en las memorias episódicas, de modo que cada estructura puede desempeñar una función cognitiva diferente relacionada con sus capacidades de representación. En apoyo de estas ideas, varios estudios encontraron que lesiones en la Prh afectan el rendimiento en la tarea de reconocimiento de objetos (RO) sin un deterioro importante de la memoria espacial, y por el contrario las lesiones del hipocampo afectan el rendimiento en tareas de memoria espacial como la tarea del laberinto acuático de Morris y sus efectos sobre tareas de RO son casi nulos ^{9,18-21}.

Mientras que el rol de la Prh en el reconocimiento dependiente de familiaridad es mayormente aceptado, existe cierta controversia respecto a la participación del hipocampo en el reconocimiento por familiaridad ^{22,23}. Si bien la idea de sistemas mnemónicos disociables a nivel del LTM contrasta con la forma altamente interconectada e interdependiente del circuito del LTM, esta teoría también contempla la interacción entre distintas regiones del LTM en servicio de memorias complejas que requieren integrar distintos tipos de información ²⁴. Existen modelos que compiten con los mencionados que difieren principalmente en las características representacionales de las estructuras del LTM ²⁵⁻²⁹.

Hipocampo

Otros casos desde H.M. han confirmado la importancia del HP para la formación de memorias con un componente temporal o espacial, tanto en humanos ³⁰⁻³² como en diferentes modelos animales ³³⁻³⁶. A partir del estudio mediante lesiones controladas, la inactivación farmacológica y el uso de knock outs restringidos al HP se pudo demostrar el rol del HP en el aprendizaje de memorias espaciales ³⁷⁻⁴⁰. Estudios de imágenes en animales así como RMf en humanos apoyan el rol de la actividad hipocampal en las memorias de tipo episódicas ⁴¹⁻⁴⁷. El HP está involucrado en el aprendizaje asociativo únicamente cuando el estímulo debe asociarse con una posición, pero no si la ubicación espacial no es un componente de la tarea, indicando el requerimiento de un componente espacio-temporal en la tarea para su reclutamiento ⁴⁸⁻⁵⁰.

Los registros electrofisiológicos en el HP de roedores en movimiento de O'Keefe y Dostrovsky revelaron que muchas neuronas hipocampales (células de lugar o "*place cells*") muestran una preferencia de disparo en posiciones particulares del ambiente (campos espaciales o "*place fields*"), sugiriendo que circuitos de estas neuronas podrían codificar y almacenar representaciones espaciales de forma tal que el HP actuaría como sustrato neuronal de un "mapa cognitivo" que representa una dada situación ⁵¹. Los campos espaciales de estas neuronas pueden cambiar en respuesta a cambios en las entradas sensoriales que recibe un animal, y a este fenómeno se lo conoce como "remapeo" ⁵². Por otro lado, el descubrimiento en 1973 de que las conexiones sinápticas en el HP podían sufrir una potenciación que duraba horas, días e incluso semanas en el animal vivo ^{53,54} llevo a que el HP sea uno de los principales (si no el principal) sistema experimental en estudios de plasticidad sináptica asociada al almacenamiento de información en el cerebro.

Como se mencionó previamente, el HP se encuentra en la cima de la jerarquía de áreas cerebrales (Fig.A1). Información altamente procesada llega al complejo hipocampal a través de la vía perforante (VP) desde la corteza entorrinal (CE): los aferentes entorrinales de la capa II terminan en sinapsis excitatorias en células granulares del giro dentado (GD) y piramidales de CA3, mientras que la capa III termina en sinapsis en CA1 y subiculum ^{55,56}. La corteza entorrinal recibe aferentes de la corteza perirrinal y postrrinal, así como la corteza prefrontal y otras cortezas asociativas; y a su vez tiene proyecciones de salida recíprocas a todas estas estructuras ^{57,58}. De esta forma, el hipocampo recibe y envía información a toda la neocorteza a través de una jerarquía de cortezas recíprocamente

interconectadas ⁵⁹. Además, el hipocampo también recibe aferentes subcorticales de la amígdala, tálamo, septum medial, núcleo de raphe y locus coeruleus. El circuito interno hipocampal incluye proyecciones de las células granulares del GD a la región de CA3 (“fibras musgosas” o FM), la región de CA3 proyecta a su vez a las neuronas de CA1 a través de los colaterales de Schaffer, pero también envía proyecciones al GD. Y finalmente, la región de CA1 proyecta nuevamente a la capa III de la corteza entorrinal, a la corteza perirrinal y al subiculum ^{58,60}.

Descripciones tempranas del circuito hipocampal sugerían un procesamiento serial de la información a través de las subregiones hipocampales a través del loop trisináptico GD-CA3-CA1 ⁶¹. Los primeros estudios de lesiones en el GD, CA3 y CA1 apoyaron esta explicación ya que todos resultaron en déficits similares a los observados con una lesión hipocampal completa, ya sea en el Laberinto de agua de Morris (MWM, del inglés “*Morris Water Maze*”) o al evaluar la memoria de trabajo en el contexto radial de 8 brazos ⁶²⁻⁶⁷. Sin embargo, estudios anatómicos más recientes han demostrado que las conexiones anatómicas hipocampales no son seriales sino que existen proyecciones de la CE a todas las subregiones del HP ^{56,68}. Más aún, estudios comportamentales han demostrado que las distintas subregiones del hipocampo permiten funciones de procesamiento específicas, y estas funciones pueden ser dissociables usando medidas electrofisiológicas y comportamentales ⁶⁹⁻⁷³.

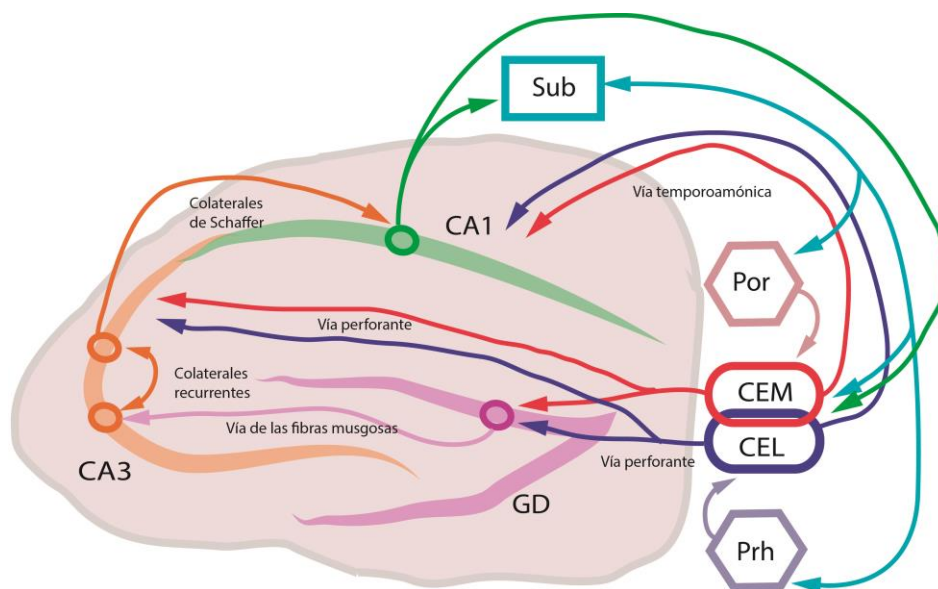


Figura A1. Diagrama esquemático representando el hipocampo y las distintas vías anatómicas presentes en la rata. En el diagrama se observan las distintas subregiones

hipocampales y puede verse la vía trisináptica clásica, que consiste en la proyección desde la corteza entorrinal (CEL: corteza entorrinal lateral; CEM: corteza entorrinal medial) hasta el GD, desde el GD hasta la región de CA3 del hipocampo y desde la CA3 hasta la región de CA1. La CE también tiene proyecciones monosinápticas directas a CA3, CA1 y al subículo (Sub). La proyección CA1 a Sub y a CEL / CEM y las proyecciones de Sub a CEL / CEM completan el circuito. Las vías de la CE al GD, CA3, CA1 y Sub se conocen como vía perforante, la vía del GD a CA3 como la vía de las fibras musgosas, y las proyecciones de CA3 a CA1 como las colaterales de Schaffer. Además de proyectar hacia CA1, las células piramidales de CA3 proyectan a otras células piramidales en CA3, lo que se conoce como colaterales recurrentes.

Corteza perirrinial

La corteza perirrinial es una corteza de asociación que ocupa una posición central en el sistema límbico, recibiendo información de diversas modalidades sensoriales de la corteza cerebral y de la amígdala, y llevando información al hipocampo ^{68,74,75} (Fig. A2). Existen un gran número de trabajos que indican que la Prh es importante para la discriminación de familiaridad. Lesiones en la Prh perjudican la discriminación visual, así como la memoria de RO, tanto en ratas como en monos (^{18,76-81}, pero véase ⁸²). También se ha informado un deterioro similar en humanos con lesiones en la perirrinial ¹¹. Tanto la inactivación temporal ⁸³ como las infusiones locales de antagonistas glutamatérgicos en Prh ^{84,85} afectan en forma similar la memoria de reconocimiento. Además, varios estudios de genes tempranos han demostrado que la Prh se activa después de una tarea RO ⁸⁶⁻⁸⁸ y la RMf en humanos también ha implicado a la Prh en la memoria de reconocimiento ^{12,13,89}. Además, se sabe que la Prh está involucrada en la memoria asociativa dentro y a través de las modalidades sensoriales ⁹⁰⁻⁹³. Al recibir información de diversas modalidades sensoriales, la Prh se encuentra en una posición ideal para la asociación de las características individuales que representan a un estímulo como un todo.

Además de su papel en el procesamiento de la historia de un estímulo, las neuronas de la Prh presentan características que les permitirían procesar información sobre la identidad de los objetos. Las neuronas de la Prh muestran selectividad para imágenes y objetos visuales particulares ⁹⁴⁻⁹⁶. Existe evidencia convincente de que la Prh está críticamente involucrada no solo en reconocer la familiaridad de un estímulo, sino también en las funciones perceptivas involucradas en la representación del estímulo como conjunciones complejas de características que lo definen ⁹⁷⁻¹⁰⁰.

Suponiendo que la Prh es el sitio de almacenamiento para las memorias de objeto, y suponiendo que el almacenamiento implica cambios sinápticos a largo plazo, debería ser posible encontrar estos cambios relacionados con el aprendizaje a nivel sináptico, por ejemplo, evaluando mecanismos de plasticidad sináptica. En este sentido, una observación interesante que respalda el papel de esta estructura en la memoria de reconocimiento de objetos es que las neuronas de la Prh en monos y ratas muestran reducciones en las tasas de activación a medida que los objetos nuevos se vuelven familiares (¹⁰¹⁻¹⁰³ pero véase ^{103,104}). Este cambio es específico de un estímulo particular, puede durar más de 24hs, y se desarrolla con un solo ensayo, por lo que podría ser la base del almacenamiento de memorias de objetos a largo plazo. Además, muchos estudios farmacológicos apoyan el rol de la Prh en la consolidación de memorias de reconocimiento de objetos ^{83,105,106}. Varias de las intervenciones que interrumpen la memoria de reconocimiento, como la infusión de escopolamina, lorazepam, verapamil o inhibidores de pCREB, también alteran el patrón de activación del marcador de actividad c-Fos en la Prh (novedoso > familiar) (^{107,108} pero véase Miller y Desimone ¹⁰⁹).

Existe evidencia que sugiere que la Prh está involucrada en la discriminación de estímulos complejos con componentes superpuestos y en el reconocimiento de objetos que presentan características ambiguas ^{93,97,99,100,110-113}. La hipótesis de la representación jerárquica postula que las representaciones de objetos se almacenan en el sistema de procesamiento ventral visual de una manera jerárquicamente organizada. Dentro de esta jerarquía, la Prh tendría un rol crucial al encontrarse en la parte superior de esta jerarquía debido a su rol en el procesamiento de conjunciones complejas de características de objetos ^{17,114-117}. Por lo tanto, la Prh, en lugar de almacenar características simples de los objetos, almacenaría representaciones conjuntas de las características encontradas en el objeto que definen objetos únicos. La visión de la integración mnemónica configural asume que los componentes del estímulo compuesto (ej. objeto) no se asocian entre sí sino con una memoria configural única que es compartida e independiente y que codifica para la co-ocurrencia de esas características ¹¹⁸⁻¹²², a diferencia de las visiones elementales ^{2,123}. Esta visión ha sido evaluada utilizando tareas que requieren que el animal desarrolle representaciones conjuntas de estímulos compuestos para su desempeño correcto ^{124,125}. Las representaciones conjuntas en estos casos facilitarían la resolución de ambigüedad en los estímulos tanto a nivel mnemónico como perceptual ya que permiten reducir la interferencia que se genera entre representaciones en capas

anteriores de procesamiento visual (que procesan características más simples) ^{99,100}. De acuerdo a esta teoría, la Prh es particularmente importante para el desempeño en tareas que no pueden resolverse en base a características únicas ya que estas son poco informativas respecto a la familiaridad del estímulo ¹²⁶. Esta ambigüedad puede resolverse mediante representaciones conjuntas o configurales de los objetos, que son aquellas que unen múltiples elementos en una representación novedosa y unitaria. Al unir información de distintas áreas corticales de procesamiento, estas representaciones conjuntas reclutan una mayor conectividad, y por lo tanto pueden evidenciar cambios en forma más selectiva. Se ha planteado que redes neuronales dentro de la Prh podrían debilitar sinapsis que previamente se excitaban frente a la primera presentación de un estímulo, de modo tal de detectar lo que no se comparte a través de los estímulos (detector de novedad), mientras que otro grupo de neuronas podría aumentar la fuerza de sus sinapsis cuando se vuelve a encontrar frente a una característica, haciendo a la red sensible a las características o conjuntos de características comunes a través de los estímulos (detector de características), lo que reflejaría la identidad de los objetos ¹⁰³. Más aún, trabajos recientes sugieren que las funciones de reconocimiento de objetos y la de identificación frente a características ambiguas del mismo son llevadas a cabo por mecanismos distintos mediados por poblaciones neuronales diferenciables dentro de la Prh ^{103,127,128}. Un desempeño exitoso en la tarea de reconocimiento de objetos requiere la capacidad de discriminar entre las identidades de dos objetos. En este sentido, Prh podría pensarse como una estructura que actúa como un "separador de patrones" que elimina la ambigüedad de la superposición de información en representaciones menos confundibles. En este sentido, tanto la separación de patrones como las representaciones conjuntas se ven beneficiadas por la presencia de representaciones dispersas ^{73,129}. En estos casos, el refinamiento del ensamble neuronal podría ser esencial para la detección de un objeto novedoso ante la presencia de información ambigua, al permitir la discriminación entre información compartida y no compartida.

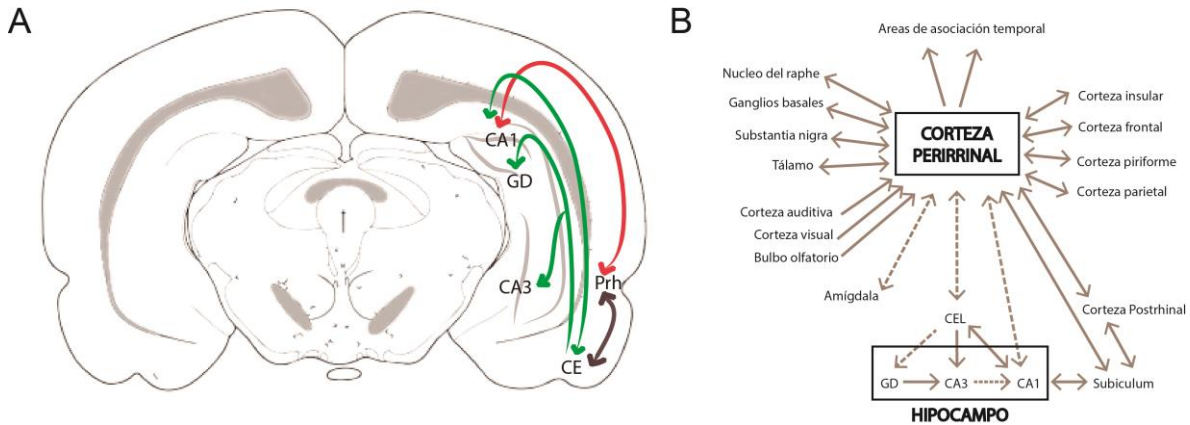


Figura A2. A. Diagrama esquemático donde se muestra un resumen de las principales conexiones directas (en rojo) e indirectas vía CE (en verde) de la Prh con el HP. **B.** Resumen esquemático de las principales proyecciones aferentes y eferentes de la Prh de la rata. Las flechas que apuntan hacia la corteza perirhinal indican proyecciones aferentes, mientras que las flechas que salen indican proyecciones eferentes, y las flechas dobles indican proyecciones aferentes y eferentes entre estructuras. Las flechas discontinuas corresponden a las proyecciones que pueden sostener la potenciación de largo término (LTP) de acuerdo a lo reportado previamente (ver ¹³⁰). En el caso de la proyección de CE lateral (CEL)-DG y la proyección CA3-CA1, es posible inducir LTP de tipo polisináptico a través de la estimulación de la Prh ¹³¹.

Las distintas memorias

La “memoria” refiere tanto a la capacidad de adquirir, almacenar y evocar información, así como al sustrato de almacenamiento de esa información en el cerebro y la información que este contiene.

La diferenciación de la memoria en categorías cumple la función de dividir al conjunto de las memorias en áreas más pequeñas en las que las teorías puedan ser generalizables. Una de las clasificaciones más utilizadas divide a las memorias en dos categorías basadas en la accesibilidad a la consciencia ^{132,133}. Se consideran memorias declarativas o explícitas a aquellas a las que podemos referirnos describiéndolas o por el acto de recordar la experiencia, mientras que el resto pertenece a la categoría de memorias implícitas o no declarativas. Este recuerdo consciente permite utilizar estas experiencias previas para nuestras acciones presentes o para pensar el futuro basándonos en experiencias previas y conocimiento. Las memorias declarativas suelen dividirse en memorias semánticas o episódicas ¹³³⁻¹³⁵. La memoria semántica refiere al registro

estructurado y general de los hechos, significados, conceptos y conocimiento del mundo externo. Por otra parte, la memoria episódica es la memoria de eventos autobiográficos específicos y únicos, que incluye al conjunto de objetos o personas asociados a la experiencia y el contexto tanto espacial como emocional. La memoria episódica nos permite revivir mentalmente experiencias pasadas con gran detalle, y se asume que esto se logra a través de la reinstalación de esas representaciones neuronales en el cerebro en forma de representaciones internas ^{134,136}. En un mundo cambiante, los eventos suelen darse sólo una vez, por lo cual la memoria episódica requiere de un aprendizaje rápido ¹³⁵. En roedores, es posible estudiar los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la formación de memorias de tipo episódicas usando métodos que no son posibles en la investigación en humanos, y este tipo de memorias pueden ser modeladas en roedores utilizando una variedad de paradigmas ¹³⁷, entre ellos el de RO. El reconocimiento deriva de dos componentes: la familiaridad y el recuerdo (*recollection*, del inglés), de acuerdo a la teoría del “modelo dual de procesamiento” ^{10,45,138}. El recuerdo activa memorias de detalles contextuales específicos de un evento o episodio particular. El contexto espacial suele ser una parte importante de una memoria episódica ¹³⁹, y puede ser en parte el motivo de que se asocien las memorias episódicas al funcionamiento del sistema hipocampal.

La memoria como proceso

En 1900, Müller y Pilzecker observaron que sus sujetos mientras recordaban una lista de asociaciones entre pares de sílabas presentaban una tendencia a recordar pares de la lista en forma repetida en los intervalos entre ensayos, lo que llamaron perseveración ¹⁴⁰. Ellos postularon a la perseveración como un proceso interno por el cual la actividad cerebral transiente funcionaría como una memoria de corto término que permitiría establecer y fortalecer la memoria asociativa, y sugirieron que podía ser necesaria para establecer las asociaciones entre sílabas, por lo que interferir con la perseveración debería interferir con el aprendizaje. Y efectivamente observaron que poner una lista entre una sesión y otra interfirió con el aprendizaje de la primer lista, pero sólo si la segunda lista se presentaba cerca en el tiempo de la primera. A partir de estos estudios concluyeron que el aprendizaje no es instantáneo, sino que toma tiempo que una memoria se fije (o consolide), de lo que se desprende que durante un período de tiempo luego del aprendizaje la memoria permanece vulnerable a la interrupción. Estos resultados luego fueron corroborados utilizando shocks electroconvulsivos en lugar de

listas ¹⁴¹. A partir de entonces se entendió que las memorias no se generan en su forma definitiva sino que se dan como parte de un proceso en el cual memorias originalmente vulnerables pueden fortalecerse y volverse resistentes y duraderas. El proceso de formación de una memoria estable luego del aprendizaje, durante el cual la memoria es susceptible a interferencias, se denominó “consolidación” ¹⁴². La “vida” de una memoria comenzó a ser dividida en al menos tres etapas: adquisición, consolidación y evocación ^{143,144} (Fig.A3).

En ese momento ya existía la idea de que la memoria podría depender de la producción de nuevas proteínas ¹⁴⁵. Se demostró que también la infusión intracerebral de inhibidores de la síntesis de proteínas era capaz de producir un déficit en la memoria, pero sólo eran efectivos durante un período de tiempo acotado luego de la adquisición de la tarea ¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Los inhibidores de la traducción eran inefectivos para causar amnesia a las 24 horas del entrenamiento, indicando que la consolidación se completa en unas pocas horas ¹⁵⁰⁻¹⁵⁹. Además, esta amnesia no se observaba cuando los animales eran evaluados al poco tiempo del entrenamiento ^{146,160-163}. Esto llevó a una división de la memoria en dos fases: una fase que dura entre minutos y horas luego de la adquisición (memoria de corto término, MCT) y es independiente de la síntesis de ARNm y de proteínas pero requiere modificaciones post-traduccionales de proteínas preexistentes, y una que dura al menos 24 horas (memoria de largo término, MLT) y depende de la transcripción y la traducción. Estas teorías iniciales luego dieron lugar a la teoría de la interferencia, que propone que las memorias adquiridas cercanas en el tiempo compiten por el espacio representacional, interfiriendo entre sí, y así generando una disminución en la fuerza de las memorias en un grado que es mayor cuanto más grande sea la similitud entre estas memorias ^{164,165}. En 1949, Hebb postuló la teoría de la doble traza de las memorias, en la que planteaba que existía una MCT o traza transiente en forma de circuito local de actividad reverberante (lo que recordaba a la idea de perseveración). Postulaba que esta reverberación permitiría un cambio estructural en la traza, y de esta forma se lograría que la memoria se almacene en forma más permanente como MLT ². Esto fue una semilla para la idea de que modificaciones estructurales subyacían a la memoria de largo plazo, y la idea de que el ensamble de neuronas involucrado en la traza permanente era el mismo que participaba de la transiente sólo que fortalecido por cambios estructurales producto de la reverberación. Un gran número de estudios a partir de entonces se han enfocado en los mecanismos por los cuales el LTM crea o codifica estas trazas de memorias de nuestras experiencias tal que luego puedan ser evocadas.

En un panorama donde las memorias se pensaban como fijas luego de consolidadas, los estudios de Lewis and Maher ¹⁶⁶ fueron los primeros en sugerir que memorias ya consolidadas podían volver a ser lábiles y desestabilizarse, si bien dentro de una ventana temporal menor, cuando encontraron en sus estudios que la eficacia de los agentes amnésicos se renovaba luego de una reactivación ¹⁶⁷⁻¹⁷¹. Nader et al. ¹⁶⁹ encontró que la inhibición de la síntesis de proteínas luego de la evocación dentro del circuito involucrado en la formación de la memoria original afecta a la memoria, evidenciando un paralelismo con los mecanismos que forman parte de la consolidación de la memoria y en honor a esto denominó a esta nueva fase “reconsolidación”. Una pregunta central del campo es si la reconsolidación es una simple recapitulación de los procesos moleculares que subyacen a la consolidación de memorias. Si bien las vías neuroanatómicas y los mecanismos plásticos a nivel celular en muchos casos se superponen, existen mecanismos moleculares y circuitos diferenciables y únicos a la reconsolidación que permiten mantener una memoria ya existente luego de su evocación, lo que demuestra que la reconsolidación no es sólo la formación de una nueva traza mnemónica sino que implica reestabilizar sinapsis reactivadas ya existentes, y estos mecanismos pueden diferir de los precisos para el crecimiento sináptico que subyace a la consolidación ¹⁷²⁻¹⁷⁷.

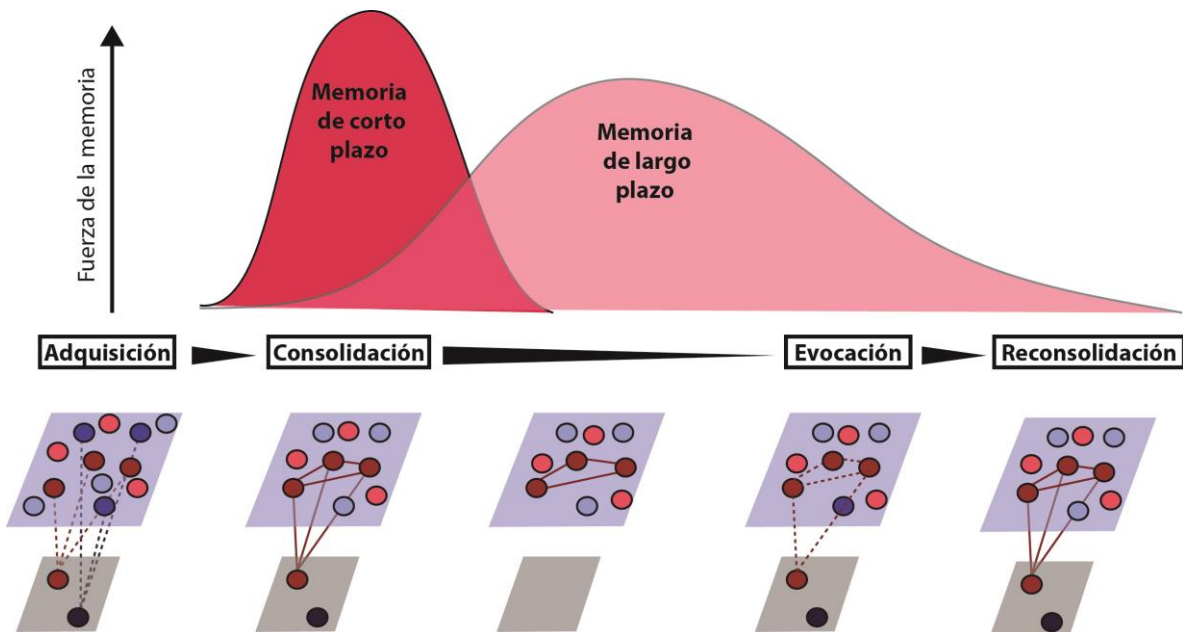


Figura A3. Fases de la memoria. (Panel superior). Diseccionamiento de las fases de la memoria. La formación de una nueva memoria involucra etapas de corto y largo plazo que no están asociadas secuencialmente sino que son independientes, se dan en paralelo y son diferenciables tanto mecánicamente como anatómica y temporalmente. **(Panel inferior)** Esquemas ilustrando

la conectividad sináptica en ensamblajes neuronales reclutados durante la formación de una nueva memoria, y cómo cambios en la fuerza de conexiones sinápticas actúan como posibles sustratos del almacenamiento en la memoria. Antes del evento, las neuronas presentan un patrón de conexiones dado, y un número dado de neuronas se va a activar frente a un evento. Dentro de estas neuronas activas durante la codificación de una memoria, algunas van a ser reclutadas para formar parte del engrama mnemónico (rojas), mientras que otras sólo para codificar información incidental (azul). Inmediatamente luego de la codificación, la consolidación de la memoria permite estabilizar las nuevas conexiones. La estabilización involucra un aumento en la fuerza sináptica en forma sinapsis-específica que es fundamental para que luego pueda darse una correcta evocación, y que puede ser alterado si se afecta la síntesis de proteínas necesarias para estos cambios plásticos. Luego de la evocación, las memorias pueden reactivarse y al desestabilizarse estas nuevamente se vuelven vulnerables, siendo necesario que pasen por una nueva etapa dependiente de síntesis de proteínas (reconsolidación) para re-estabilizarse.

Detección de novedad: ¡Qué hay de nuevo, viejo!

La interpretación del mundo exterior requiere que nosotros continuamente evaluemos si nuestras experiencias son novedosas o similares a otras previas. La detección de la novedad implica varios pasos, entre ellos la evaluación del estímulo, la generación de señales de desajuste o “*mismatch*”, y la integración de estímulos en representaciones preexistentes o la creación de nuevas representaciones para los estímulos novedosos^{178,179}. La novedad es un adjetivo que puede aplicarse a un estímulo cuando este carece de una representación pre-existente, en cuyo caso se habla de novedad absoluta, o puede aplicarse a una situación novedosa cuya novedad se desprende de la incongruencia entre los componentes de la asociación del estímulo con su contexto en el sentido amplio del término, en cuyo caso se habla de novedad contextual. La mayoría de los estudios de memoria de reconocimiento contemplan a la novedad como una “no familiaridad” y no como una función independiente que ofrece otra contribución diferente a las decisiones de reconocimiento, por lo cual no hay muchos estudios que exploren cómo esta detección de novedad podría contribuir a la memoria de reconocimiento. Más aún, los estudios de RMf y estudios de actividad neuronal en humanos y modelos animales son consistentes con la presencia de sustratos neuronales en parte diferenciados para cada una de estas funciones, desacreditando la idea de que estas dos funciones forman parte de un continuo en las mismas regiones cerebrales^{102,180-184}. El circuito neuronal asociado con la detección de novedad incluye al HP anterior y a la Prh^{180,185}. Algunos autores han asociado a la región de CA1 del HP con la función de comparación y detección de novedad o desajuste entre la información sensorial y las expectativas¹⁸⁶⁻¹⁸⁸, y también con un rol de comunicar las señales de novedad contextual (y no absoluta) al cerebro medio

¹⁸⁹. Esta región recibe entradas convergentes de CE y CA3, lo que permite que la información sobre la experiencia sensorial actual de CE se procese en referencia a las expectativas basadas en la memoria -derivadas del patrón de actividad de CA3- ¹⁹⁰. Cuando la información actual difiere de la memoria almacenada, los datos recientes de roedores indican que las señales del comparador CA1 activan la actualización de la memoria ^{190,191}.

De acuerdo con estudios recientes, la modulación dopaminérgica del HP asociada con la novedad está relacionada con la naturaleza sorpresiva de un estímulo dentro de determinado contexto (novedad contextual) ^{192,193}. De todas formas, la novedad absoluta también es capaz de activar el hipocampo, pero en este caso lo hace en forma directa sin necesidad de una modulación dopaminérgica, sino asociada a una modulación colinérgica ^{185,194}.

El rol dual del HP en la detección de novedad/codificación y en la evocación ha sido uno de los desafíos del campo en las últimas décadas, y se han generado teorías relacionadas con la especialización funcional de las distintas regiones hipocámpales ¹⁹⁵. Una de las posibles explicaciones a esta doble funcionalidad del hipocampo es que sea llevada a cabo por la modulación de distintos neurotransmisores, según la cual la detección de novedad podría generar una modalidad de codificación en el hipocampo vía dopamina o acetilcolina, mientras que en ausencia de estos neurotransmisores favorecería un modo de evocación en el hipocampo ¹⁸⁰.

Separación de patrones y compleción de patrones

La memoria episódica por definición requiere aprender eventos individuales y diferenciarlos de otros eventos. Sin embargo, para poder evocar una memoria nuestro cerebro necesita integrar la información que recibe del ambiente. Esta integración es importante para codificar la estructura general del ambiente, y abstraerla de las especificidades de eventos individuales, lo que permite generalizar a situaciones novedosas. De esta forma, el proceso de almacenamiento de memorias independientes implica un balance entre separar episodios similares y evocar memorias previas basándose en claves ambientales muchas veces incompletas. Por ejemplo, podemos ver una palmera y recordar nuestras vacaciones en Cancún, pero también podemos distinguir la vez que vimos una palmera en el jardín de nuestro amigo de la vez que vimos una palmera en la playa durante las vacaciones. Si no fuésemos capaces de discriminar entre

memorias similares, codificar nueva información podría significar sobrescribir la información similar previamente almacenada, lo que llevaría a una interferencia catastrófica ^{196,197}. Pero, por otro lado, la incapacidad de evocar memorias en presencia de cambios en el ambiente nos impediría generalizar y realizar inferencias ¹⁹⁸. Las teorías computacionales postulan que existen dos procesos contrapuestos que permiten que el almacenamiento y evocación de memorias se lleven a cabo en forma coordinada, la separación de patrones y la compleción de patrones. De acuerdo con esos modelos computacionales, cuando los pesos relativos usados para codificar una asociación son perturbados por la codificación de otra información similar las representaciones, que se almacenan como patrones superpuestos ya que comparten muchos aspectos, interfieren entre sí. Impedir esta interferencia es esencial para poder generar representaciones diferenciables de los eventos. Pero por otro lado si la tasa de aprendizaje es baja, el hecho de que las representaciones se superpongan de hecho facilita el aprendizaje porque permite que los pesos se integren a lo largo de varias experiencias ^{199,200} de forma tal que los mismos pesos puedan ser reutilizados. Como un circuito solo puede ser optimizado para una de estas dos funciones, estudios computacionales sugieren la necesidad de dos sistemas independientes cada uno optimizado para una de estas funciones ¹²⁹.

A pesar de que las claves que tenemos a disposición para poder recuperar una memoria son en general incompletas, eventos completos pueden recordarse aún en presencia de cambios ambientales o claves incompletas. David Marr ²⁰¹ fue el primero en sugerir que los colaterales recurrentes permitirían a la región de CA3 actuar como un circuito autoasociativo capaz de realizar compleción de patrones, el proceso por el cual información incompleta o degradada que ingresa al circuito hipocamapal se completa en base a representaciones previamente almacenadas. Algunos modelos teóricos plantean que las memorias estarían representadas en estados de actividad estable o atractores en este circuito y que, cuando estos estados de actividad se encuentran lo suficientemente diferenciados entre sí, la presentación de un estímulo similar al aprendido lleva a la evocación del estado atractor más fuertemente asociado al mismo ²⁰²⁻²⁰⁴. Rolls and Treves ²⁰⁵, basándose en estos modelos computacionales, postularon que el circuito autoasociativo de CA3 permitiría la formación de memorias episódicas al asociar elementos de un evento (ej. objeto y contexto) en una representación. Luego esta información almacenada en el hipocampo tendría que ser evocada y afectar a otras

regiones del cerebro para ser utilizada. De acuerdo a esta teoría, el flujo de información a través del hipocampo durante la codificación de la información desencadenaría el fortalecimiento de las asociaciones entre neuronas coactivadas en CA3 a través de mecanismos de plasticidad sináptica en los colaterales recurrentes, gracias a su capacidad de experimentar LTP asociativo o rNMDA-dependiente ²⁰⁶⁻²⁰⁹. Durante la evocación, estas modificaciones permitirían que la subsecuente activación de solo una parte del ensamble (actuando como atractor) lleve a la activación del patrón original completo en CA3. De esta forma es posible que la evocación de toda la representación mnemónica de elementos que constituían la experiencia original (compleción) se dispare a partir de la activación de CA3 por la presencia de cualquiera de sus partes (versión degradada o incompleta del estímulo original) ^{210,211}. La región de CA3, por su extensa conectividad vía colaterales recurrentes, por sus conexiones con estructuras que procesan distintos tipos de información, y por presentar plasticidad sináptica asociativa sinapsis-específica es un sustrato ideal para esta función cognitiva ²¹². Las subpartes de una memoria episódica, que deben representarse por separado en CA3 para permitir la compleción, pueden combinarse en CA1 para producir una clave de recuperación eficiente para la evocación. De esta forma, las neuronas de CA1 se podrían asociar con las células corticales que se encuentran activadas por el evento, y esto permitiría que durante la evocación las claves presentes desencadenen la misma actividad cortical que fue generada por el evento original gracias a las proyecciones reversas previamente asociadas a la corteza. En apoyo a estas ideas, Gold and Kesner ²¹³ encontraron que cuando manipulaban el número de claves visuales en una tarea de DMS (del inglés “*delayed matching to sample*”), mientras que las lesiones en CA1 no tenían efecto en el desempeño, lesiones en CA3 generaban un déficit que era mayor cuantas menos claves se presentaban en la evaluación. Estudios en humanos encontraron que cuando la relación entre los elementos en una escena se afectaba, los sujetos normales pasaban más tiempo buscando un elemento que no estaba en una posición particular, mientras que en sujetos con daño hipocampal no se observó este aumento en el tiempo de observación de las posiciones donde antes había objetos ²¹⁴.

Por otra parte, este sistema atractor se vería favorecido por una capa previa en el procesamiento hipocampal que permita decorrelacionar los conjuntos de neuronas que representan a cada evento almacenado en CA3, ya que las correlaciones entre eventos disminuyen la capacidad de almacenamiento del circuito de CA3 ^{201,205,215}. Hay una serie

de características en la región del GD del HP que favorecen esta ortogonalización o efecto de separación de patrones: (1) el número de conexiones vía FM del GD recibidas por cada neurona de CA3 es muy pequeño, (2) el número de células granulares del GD es 5 veces mayor que el número de células de la CE que proyectan al GD generando una conectividad muy divergente ²¹⁶, (3) la actividad de las células granulares del GD es muy baja y dispersa ya que este se encuentra altamente inhibido y menos del 3% de las células granulares están activas ²¹⁷⁻²¹⁹, y (4) las sinapsis de las FM son grandes y ubicadas muy cerca del soma, lo que las hace muy poderosas activadoras de las células piramidales de CA3 (a diferencia de las proyecciones directas de CE a CA3). Todas estas características favorecen que la etapa de procesamiento vía GD tenga un efecto aleatorizante de las representaciones en CA3. Además, la vía de las FM se diferencia del resto de las proyecciones hipocampales en que contiene una menor densidad de receptores de tipo N-metil-D-aspartato (rNMDA) comparada con otras áreas del hipocampo, y de hecho el LTP y la depresión de largo término (LTD) en esta vía no es rNMDA-dependiente ^{220,221}. Esto puede ser una ventaja a nivel del procesamiento hipocampal ya que si las FM tuvieran aprendizaje asociativo los outputs de estímulos similares serían aún más parecidos que los inputs llevando a la formación de clusters de estímulos similares en lugar de su diferenciación ²²².

Los modelos computacionales originales definen el proceso de separación de patrones en términos de una transformación de representaciones de entrada en representaciones de salida que están menos correlacionadas entre sí ^{196,201,223}. Este proceso de ortogonalización favorecido por el GD permitiría el almacenamiento hipocampal de memorias en forma diferenciada a través de la generación de representaciones únicas y no confundibles de eventos similares, con un claro rol adaptativo ya que luego cada una de estas representaciones puede asociarse con resultados diferentes permitiendo una mayor versatilidad conductual ^{217,223-225}. Por lo tanto, la separación de patrones aumenta la probabilidad de una codificación precisa y una recuperación posterior efectiva ²⁰⁵.

De esta forma, la evocación rápida puede ser balanceada con la codificación de nueva información a nivel de la región de CA3 ²²³. Aunque la compleción de patrones es necesaria para evocar información de representaciones hipocampales conjuntas, entra en conflicto con el proceso de separación de patrones que es necesario para formar estas representaciones en primera instancia ⁷³. Para un dado patrón de entrada, el sistema

deberá reconocerlo como clave de evocación de una memoria previa y realizar compleción de patrones, o realizar separación de patrones y almacenar esa información de entrada como una memoria nueva, pero no le será posible hacer ambos dada la naturaleza del sistema atractor de CA3. Así, el balance entre la actividad de la red autoasociativa y las entradas desde la CE y el GD determinarán si CA3 realiza compleción de patrones o separación de patrones.

La vía de las fibras musgosas envía proyecciones unidireccionales y poderosas del GD a CA3, lo que hace que actúen como sinapsis “detonadoras” que por sí solas despolarizan fuertemente a las neuronas de CA3 ²²⁶. Por otra parte, neuronas en la capa II de la CE tienen colaterales que van directamente a CA3, evitando al GD ²²⁷. De acuerdo a estudios computacionales, la información de entrada de la VP por sí sola no es suficiente para generar un almacenamiento eficiente en la memoria (a diferencia del de las FM), ya que es muy débil para permitir el disparo del circuito de CA3 que se encuentra dominado por el efecto aleatorizante de los colaterales recurrentes ²⁰³. Sin embargo, para permitir la evocación sería suficiente con una entrada parcial de información de la VP (correspondiente por ejemplo a una clave espacial incompleta) aunque esta no sea tan fuerte, ya que las colaterales recurrentes en CA3 se encargarían del proceso de recuperación de la memoria para una correcta evocación. Por otro lado, según estos estudios, si la información proveniente del exterior (claves de recuperación) no es suficientemente fuerte como para permitir la recuperación de la memoria, los inputs externos y fuertes provenientes de la vía de FM van a ser preponderantes sobre los inputs internos de los colaterales recurrentes, y van a dominar la actividad de las neuronas de CA3 de forma tal que nuevos patrones de disparo se almacenen en CA3 ^{203,228}. Esto lleva a plantear la teoría de que la vía de las fibras musgosas de GD a CA3 es crucial para la codificación y podría por lo tanto ser usada para forzar la separación de patrones en las representaciones neuronales de CA3 y así reducir la interferencia y favorecer el nuevo aprendizaje, mientras que las proyecciones directas y más débiles de la capa II de la CE a CA3 podrían ser utilizadas para proveer una clave que permita recuperar una memoria ya adquirida ²²⁹. Se han encontrado evidencias consistentes con la predicción de este modelo de que la vía GD-CA3 sería crucial para la codificación (y no para la evocación), mientras que la vía directa de CE a CA3 se activaría preferencialmente durante la evocación y no en la adquisición ^{73,230-232}. Consistente con esta idea, la inactivación de la vía de las FM interfiere con el nuevo aprendizaje pero deja a la evocación intacta ^{230,232}.

Por lo tanto, el circuito de CA3 podría actuar asociando la información proveniente del GD y la CE, y de acuerdo a qué proyección domine la actividad en CA3, podrían encontrarse señales consistentes con un proceso de separación de patrones o de compleción de patrones (Fig.A4).

Estudios electrofisiológicos y de genes tempranos (IEGs, del inglés “Immediate early genes”) apoyan estos modelos computacionales. Como vimos antes, los campos espaciales neuronales pueden variar de acuerdo a cambios pequeños en las entradas sensoriales que recibe un animal (remapeo), y esto es evidencia de la presencia de separación de patrones en el hipocampo. Sin embargo, no siempre el mapa que representa el entorno cambia cuando las claves se modifican, sino que se ha demostrado que cambios pequeños en el contexto difícilmente produzcan remapeo, y esto es una evidencia de procesos de compleción de patrones a nivel hipocampal ²³³.

La capacidad del HP de formar mapas independientes según el contexto es fundamental para la formación de memorias, cuanto más diferentes sean estos mapas, menor será la posibilidad de interferencia entre las memorias representadas. Mapeando las respuestas poblacionales dependientes de actividad encontraron que cuando los cambios ambientales son pequeños, la superposición en las representaciones poblacionales del ambiente en CA3 es mayor que en CA1 y permanece estable a pesar que la información entrante del GD se encuentra gravemente degradada (consistente con compleción de patrones en CA3), mientras que cuando estos cambios son mayores, la superposición es mayor en CA1 que en CA3 y GD (consistente con separación de patrones en CA3) ^{72,231,234}. Esto se ajusta a lo que los modelos computacionales predicen respecto a los circuitos atractores como CA3, que responden en forma no lineal (dependiendo del cambio en la entrada de información sensorial, pueden separar o completar), a diferencia de CA1 que muestra una transformación lineal y gradual en la que no separa ni completa. Como existe un balance entre la codificación (que se beneficia de la separación de patrones) y la evocación (que se beneficia de la compleción de patrones), y como ambos llevan al sistema en direcciones opuestas, los parámetros que optimizan uno a su vez alteran el otro ⁷³, y existen investigaciones que sugieren que el sistema hipocampal podría cambiar dinámicamente entre un modo de codificación y uno de evocación ²³⁵⁻²³⁹.

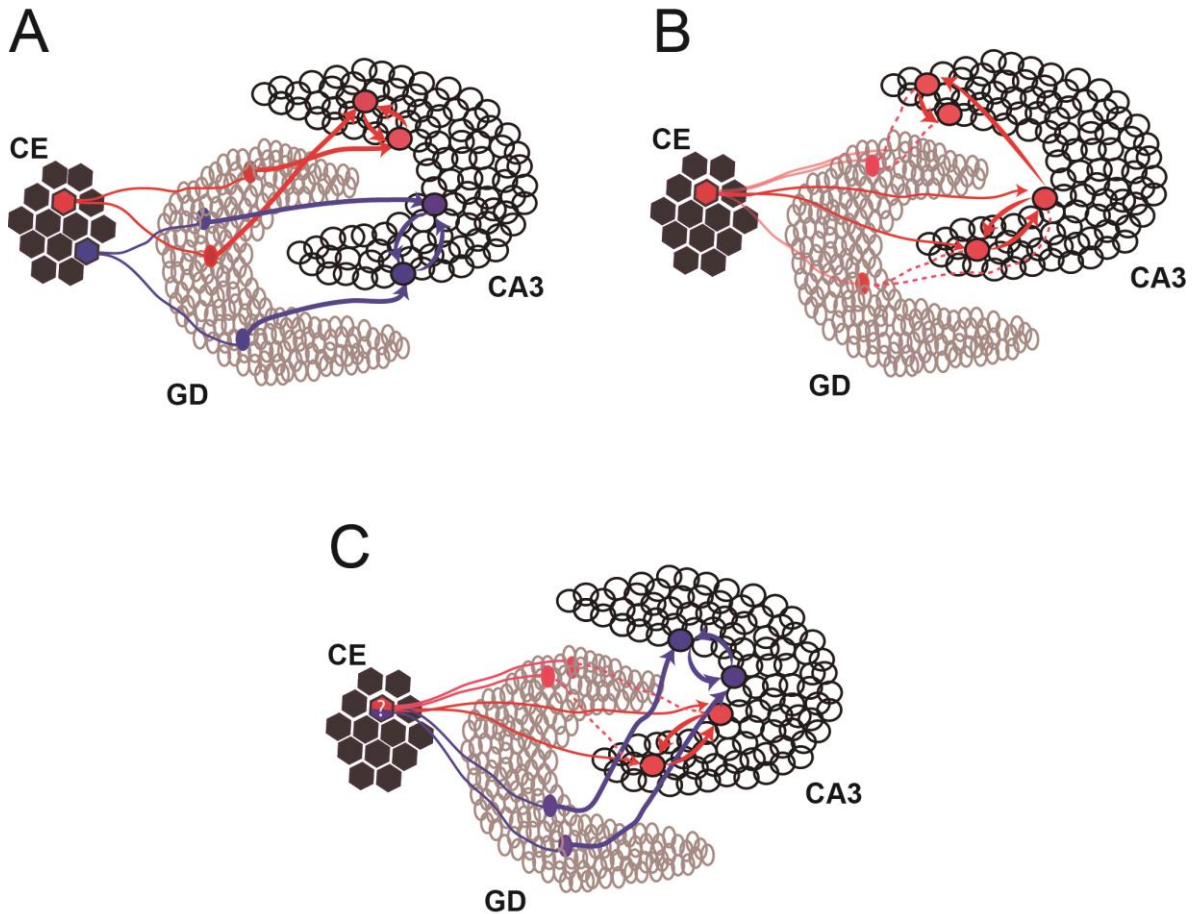


Figura A4. Separación y completión de patrones en el HP. (a) La separación de patrones se asocia clásicamente al GD del HP. De acuerdo con modelos computacionales cuando los patrones de actividad neuronal que abandonan un circuito se encuentran más diferenciados que los patrones de disparo que ingresan al circuito, este circuito es considerado un “separador”. Existen varias características anatómo-funcionales del giro dentado que lo hacen especialmente apto como sustrato celular de esta función: el GD se encuentra altamente inhibido por interneuronas locales por lo que sus neuronas raramente se activan durante registros comportamentales in vivo ^{217,218} y además constituye una capa con muchas más neuronas que su principal región aferente, la CE. Estas características hacen que dentro del GD puedan activarse poblaciones neuronales distintas aún frente a información similar, y estudios sugieren que tanto cambios en la identidad como en la tasa de disparo neuronal dentro de la población podrían permitir esta separación ^{73,203,217}. Además, el hecho de que FM individuales provenientes de células granulares sean capaces de despolarizar a las células piramidales de CA3 ²⁴⁰ permite que estas controlen la codificación de nuevas memorias al poder generar un almacenamiento eficiente de estas representaciones diferenciadas ²⁰². De esta forma, entradas superpuestas que vienen de la corteza entorrinal, y por ejemplo transmitan información sobre un contexto A (rosa) y un contexto B (azul), serían codificados por separado por el GD. **(b)** De acuerdo con modelos computacionales, los circuitos asociativos como CA3 pueden actuar realizando completión de patrones. La presencia de sólo algunas de las claves mnemónicas originales es suficiente para inducir la recuperación de la memoria original. Esto se debe a que las claves son capaces de activar un subgrupo de las neuronas que participaron de la memoria original y este subgrupo, gracias a que previamente fortaleció sus conexiones con el

circuito de neuronas originales que representan a la memoria almacenada (línea punteada), es capaz de activarlas y generar la compleción ²²⁵. La información de entrada de la vía perforante por sí sola no es suficiente para generar un almacenamiento eficiente en la memoria ya que es muy débil para permitir el disparo en un circuito como el de CA3, dominado por el efecto aleatorizante de las colaterales recurrentes. Sin embargo, una información de entrada parcial si alcanza para permitir la evocación aunque esta no sea tan fuerte porque las colaterales recurrentes en CA3 se encargarían del proceso de reactivación de la representación original para una correcta evocación. **(c)** Para una dada situación, el balance entre estas dos funciones determina si en el circuito autoasociativo de CA3 predomina el efecto de la compleción de patrones manejado por las conexiones previamente fortalecidas vía colaterales recurrentes entre neuronas de CA3 (consistente con la evocación de una memoria anterior) o el de la separación de patrones en GD (consistente con la formación de una memoria nueva). Ilustraciones basadas en imagen de Deng et al.²⁴¹

Dado que la memoria episódica implica la evocación de eventos únicos, la separación de patrones se propone como un componente esencial para el almacenamiento de representaciones no confundibles de estos episodios y se ha estudiado principalmente en el hipocampo ²⁴². Existe evidencia experimental que apoya el rol del GD en la separación de patrones. La presencia de este proceso en el GD se ha estudiado de manera efectiva mediante electrofisiología ^{217,234}. Leutgeb ²¹⁷ encontró en ratas que pequeños cambios en la forma del ambiente de exploración afectan el patrón de actividad de células granulares moduladas por la ubicación. Además, se han desarrollado tareas para demostrar la relevancia de los procesos de separación de patrones para la cognición ^{224,243-247}. Gilbert et al. ²⁴⁸ encontró que la ablación del GD genera un déficit en la discriminación de dos posiciones similares en base a claves distales, pero no si la separación es mayor. La naturaleza gradual del deterioro observado demuestra una falla en la separación de patrones a nivel conductual. Con un enfoque genético McHugh ²⁴⁹ encontró que ratones que carecían de la subunidad esencial NR1 del rNMDA en las células granulares del GD no podían distinguir dos contextos similares si bien su desempeño en la tarea de condicionamiento de miedo contextual era normal. Más aún, la ausencia de rNMDAs en el GD afecta el remapeo de las tasas de disparo en CA3 que es necesario para el aprendizaje rápido ²⁵⁰. Esto generó la idea de que si bien la conectividad del GD podría ser el sustrato para la separación, la plasticidad sináptica podría presentar una estrategia para la eficiencia de este proceso. De esta forma, la pérdida de NR1 en las células granulares del GD podría reducir el impulso del GD a CA3, aumentando el impulso relativo de la proyección directa de CE a CA3, e impidiendo que el GD de lugar a la codificación en CA3. Avanzando con estos estudios, en los últimos años se han comenzado a dilucidar las bases moleculares de la separación de patrones en el GD

^{247,251}. Un problema de muchos de los estudios anteriores es que gran parte de las tareas han sido diseñadas para examinar cómo la respuesta del animal a la situación actual puede ser alterada por la información de memorias pasadas distintas, en lugar de estudiar la habilidad de los animales de distinguir distintos patrones de información concurrentes, por lo que han sido criticadas ya que la separación de patrones ocurre durante la codificación de la información y no en la evocación ²⁵².

Como el circuito del GD cambia continuamente por la integración de nuevas neuronas gracias a la neurogenesis adulta, se estudió el rol de estas nuevas neuronas en la separación de patrones. Clelland et al. ²⁴⁴ encontró que el bloqueo de la neurogenesis adulta hipocampal por irradiación vía rayos X alteró la habilidad del animal para distinguir cambios pequeños en discriminaciones espaciales, pero no cambios grandes, mientras que Sahay et al. ²⁵³ vio que animales que tenían niveles mayores de neurogenesis adulta gracias a una estrategia genética eran mejores discriminando dos contextos similares. Estas nuevas neuronas podrían ser un sustrato preferencial durante el remapeo de las células de lugar en presencia de cambios sutiles en el ambiente, ya que las neuronas granulares inmaduras tienen una excitabilidad y plasticidad mayor que las distingue de la población de neuronas viejas y relativamente silentes ^{254,255}. Además, existen autores que sugieren que a su vez las neuronas maduras podrían especializarse para ciertas características de su ambiente ya que responderían preferencialmente a los inputs que recibieron durante su desarrollo ²⁵², etapa en la que presentan un umbral reducido para la inducción de LTP ²⁵⁶⁻²⁵⁸. En este sentido, el estudio de Nakashiba et al. ²⁵⁹ sugiere que ni el número mayor ni la actividad más dispersa del GD son suficientes como para generar separación de patrones de contextos similares, y que serían necesarias las células granulares jóvenes nacidas en el adulto para permitir este proceso.

Existe mucho debate sobre si las células granulares del giro dentado permiten la separación de patrones de todo tipo de estímulos o lo hacen en forma específica para las representaciones de tipo espacial. Los modelos computacionales se centran específicamente en las células granulares del GD, que se cree que por sus características anatómicas se comporta como un separador de patrones independiente de dominio ²⁶⁰. Cuanto más detallada es una memoria, más importante es que esta memoria sea única, ya que hay muchos otros episodios que podrían potencialmente interferir con las mismas ²⁶¹. Solo cuando es necesario superar interferencia de eventos superpuestos o similares

es cuando la separación se vuelve crucial para la evocación. Desde el punto de vista clásico, la separación de patrones sólo sería necesaria en el HP, que al incluir más detalles contextuales sería más susceptible de interferencia, mientras que la memoria de familiaridad no lo sería. Pero como ahora se reconoce que los sistemas neocorticales de aprendizaje también pueden aprender información conjunta cuando la tarea lo requiere, la separación de patrones también podría ser necesaria en memorias de reconocimiento que requieran integrar varias características. Más aún, la idea de que los circuitos neuronales pueden codificar dos inputs similares en representaciones diferenciables, y que esta separación es beneficiosa para el subsecuente procesamiento de la información y la formación de una memoria a partir del mismo, es una parte fundamental de los circuitos neuronales en general ⁷³. Y de hecho muchas regiones del cerebro tienen una salida de información menos correlacionada que la información de entrada, por lo que la separación de patrones es una característica de muchos circuitos neuronales.

La memoria como sustrato

La idea de un sustrato material en el cerebro donde se encuentre la información aprendida (el “engrama” o traza de la memoria) fue por primera vez mencionada en los estudios teóricos de Richard Semon, que planteó que el aprendizaje debía inducir cambios persistentes en células específicas en el cerebro que retengan esa información aprendida, y luego puedan reactivarla dadas las condiciones adecuadas ^{262,263}. Luego, Hebb volvió a hablar de engramas y sugerir que objetos o ideas podían estar representados en patrones de actividad generados por grupos de neuronas, pero en este caso fue un paso más lejos al describir por primera vez un mecanismo básico por el que podrían ocurrir estos cambios persistentes, a través de la plasticidad sináptica es decir por cambios dependientes de la experiencia en la fuerza sináptica. *“Cuando el axón de una célula A está lo suficientemente cerca como para excitar a una célula B y repetidamente toma parte en la activación, ocurren procesos de crecimiento o cambios metabólicos en una o ambas células de manera que tanto la eficiencia de la célula A, como la capacidad de excitación de la célula B son aumentadas”*. De acuerdo a la visión de Hebb, la plasticidad sináptica fortalecería las conexiones entre neuronas coactivas, lo que estabilizaría la habilidad de los ensambles neuronales para reproducir los patrones de actividad neuronal generados por el evento original mucho tiempo después de la experiencia (y aún ante la presencia de actividad en solo un subgrupo del ensamble)².

La memoria podría ser almacenada en un patrón de conectividad específico entre células de múltiples regiones del cerebro que se establece durante la codificación de la memoria y se fortalece en la consolidación en forma dependiente de síntesis de proteínas, siendo crucial este fortalecimiento para la posterior evocación de esa memoria ²⁶⁴. Esta idea es parte del modelo actualmente más aceptado de almacenamiento de la memoria que postula que la huella de la memoria está codificada por cambios mantenidos en la eficacia sináptica de las conexiones de la red implicada ²⁶⁵. De acuerdo a este modelo, la adquisición de una memoria comienza cuando se explora un ambiente nuevo, y esto genera un aumento en la actividad sináptica en una pequeña fracción de neuronas (ensamble neuronal), y esto lleva a mecanismos de plasticidad que se cree que subyacen al almacenamiento de memorias de largo término ^{144,265,266}. La elección de una población determinada de neuronas para formar parte de una memoria particular tiene implicancias para la estabilidad y especificidad de la memoria, y en última instancia determina la capacidad de almacenamiento de un sistema ²⁶⁷. El ensamble neuronal activo es definido operacionalmente por la expresión de c-Fos (marcador de actividad neuronal) en una fracción de neuronas, y se vio que la actividad de este ensamble es necesaria y suficiente para la representación mnemónica del contexto ²⁶⁸⁻²⁷¹ por lo que se considera a este ensamble como el engrama celular de la memoria. El mecanismo por el que se asignan neuronas a este engrama involucra la actividad del factor de transcripción CREB, que modula la excitabilidad neuronal manejando en última instancia esta asignación ^{272,273}, pero también mecanismos a nivel de circuitos como la inhibición lateral, que son capaces de modular el tamaño de este engrama ²⁷⁴.

Actualmente es ampliamente aceptada la idea de que cambios en la fuerza de las conexiones sinápticas dependientes de la actividad neuronal son los que subyacen al procesamiento y el almacenamiento de la memoria ^{275,276}. El modelo experimental dominante para explicar los mecanismos celulares subyacentes al aprendizaje y la memoria se basa en los fenómenos conocidos como potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *long term potentiation*) y depresión a largo plazo (LTD, del inglés *long term depression*) ^{40,277}. Estos fenómenos fueron descubiertos en 1973, durante un estudio en el que encontraron que la estimulación de alta frecuencia producía cambios en la eficacia de las sinapsis en forma rápida, específica y persistente, tal como fue predicho por Hebb ^{53,278}. Posteriormente se encontró que esta potenciación es vulnerable y puede ser interrumpida luego de varios minutos después de la inducción ^{279,280}. Más aún, se observó que el LTP también ocurre durante el aprendizaje ²⁸¹ y que este LTP ocluye al inducido

por estimulación de alta frecuencia ²⁷⁷, y que los agentes que lo bloquean también generan amnesia ³⁹. De hecho, las modificaciones dependientes de la experiencia que subyacen al almacenamiento de la memoria comparten muchos mecanismos moleculares con procesos de plasticidad sináptica dependientes de la actividad como el LTP y LTD ^{265,278}. El LTP es duradero, se expresa selectivamente en sinapsis que han sufrido patrones particulares de actividad que además pueden ser fisiológicos y requiere de actividad presináptica en conjunto con la postsináptica (aunque sólo en el caso de LTP asociativo). Se ha determinado que existen fases diferenciables en cuanto al mantenimiento del LTP, que coinciden en sus características con las de la memoria, es decir las formas de corta duración (MCT y early LTP o E-LTP) se asemejan en que pueden establecerse en ausencia de síntesis de ARNm y de proteínas “de novo”, mientras que las formas duraderas (MLT y late LTP o L-LTP) requieren de síntesis de estas macromoléculas ^{143,278,282-284}. Esto sugiere que estos procesos comparten un mecanismo común, idea que se ha formalizado en la hipótesis de plasticidad sináptica y memoria: “La plasticidad sináptica dependiente de actividad es inducida en las sinapsis apropiadas durante la formación de la memoria, y es tanto necesaria como suficiente para el almacenamiento de la información que subyace a este tipo de memoria mediada por el área en la cual se observa la plasticidad” ²⁶⁵. El LTP está asociado tanto a cambios rápidos de la expresión génica –minutos- como a cambios tardíos -horas o días- ²⁸⁵. Cambios plásticos rápidos se asocian con cambios post-traduccionales como la fosforilación de proteínas en la sinapsis, mientras que modificaciones plásticas más duraderas involucran cambios en la composición molecular de las sinapsis existentes ²⁸⁶. En analogía a la consolidación de la memoria, se suele referir con el término consolidación sináptica al fortalecimiento y estabilización de las conexiones sinápticas inicialmente débiles en forma dependiente de síntesis de proteínas. La consolidación sináptica involucra la modificación post-traducciona l de proteínas y la activación de factores de transcripción que modulan la expresión génica, tal que luego este pool de proteínas permitan el remodelamiento sináptico que lleva a la estabilidad de la traza ^{275,287-289}. Generalmente, estos cambios se dan en forma sinapsis-específica, por lo que existen teorías que sugieren que la especificidad de los cambios plásticos al nivel de sinapsis únicas se logra gracias a que las proteínas plásticas son capturadas por las sinapsis recientemente activas ²⁹⁰⁻²⁹².

Las espinas dendríticas son estructuras post-sinápticas en forma de protrusiones que reciben la gran mayoría de las proyecciones excitatorias del sistema nervioso central y es

en ellas donde ocurren gran parte de los cambios plásticos a nivel estructural ^{293,294}, si bien también han sido descritos cambios en la presinapsis que también acompañan la reorganización sináptica ²⁹⁵. El mantenimiento del LTP en forma estable involucra la inserción de receptores de glutamato en la membrana postsináptica, el ensanchamiento de la densidad post sináptica y el aumento en el tamaño de las espinas dendríticas ^{266,296,297}, todos procesos íntimamente relacionados con cambios en la dinámica de polimerización de actina ²⁹⁸⁻³⁰⁴. Consistente con la idea de que son necesarios cambios en el citoesqueleto para que puedan generarse nuevas espinas y modificarse la estructura de las espinas existentes en forma estable, mecanismos dependientes de la polimerización de actina son necesarios para formas persistentes de LTP que involucran el pasaje de espinas pequeñas a grandes con forma de hongo ^{266,299,305}. Además, se ha descrito que también se forman nuevas espinas en la cercanía de las espinas activadas durante el LTP ³⁰⁶. Por otra parte, el LTD se encuentra asociado al achicamiento de las espinas causado por la despolimerización de actina y en algunos casos la desaparición de espinas ^{300,307}. Los mismos cambios en el citoesqueleto de las espinas dendríticas que llevan a un aumento en el tamaño de la sinapsis, y consecuentemente en el número de receptores en la misma, ocurren luego de la inducción del LTP y durante el aprendizaje ^{306,308}.

En el HP, antagonistas de rNMDAs bloquean tanto la inducción del LTP como el aprendizaje espacial a las mismas concentraciones, mientras que no tienen efecto sobre una tarea de discriminación visual que no requiere de la función hipocampal ³⁰⁹. Además, los knock outs de varias kinasas también tienen afectada la generación de LTP y el aprendizaje espacial ³¹⁰⁻³¹². Por otro lado, se han observado aumentos en los niveles de potenciación sináptica en el HP inducidos por el comportamiento exploratorio de un ambiente novedoso, sugiriendo un rol del LTP en el HP en la codificación de información espacial ^{313,314}. Aunque los procesos intracelulares implicados en LTP y LTD se han estudiado principalmente en la HP ³¹⁵, varios de los mecanismos de plasticidad sináptica que operan en la HP parecen también jugar un papel en la PRh ^{316,317}. El LTD podría proporcionar un mecanismo para la reducción de la respuesta al estímulo cuando un estímulo se vuelve familiar ³¹⁸, y esto fue observado en el caso de la Prh. Griffiths et al. ³¹⁹ utilizaron un péptido para evitar la eliminación del receptor AMPA (rAMPA) inducida por la actividad, sin afectar la transmisión sináptica de la información a través de la Prh. En animales infectados con lentivirus que expresan este péptido, el LTD se bloqueó sin producir un efecto sobre el LTP. En paralelo se encontró déficit de memoria de

reconocimiento tanto a corto como a largo plazo proporcionando una fuerte evidencia de que LTD (y no el LTP) es necesario para el almacenamiento de la memoria de reconocimiento.

Proteínas relacionadas con plasticidad en el cerebro

Una de las características principales de la consolidación de la memoria, como vimos anteriormente, es el requerimiento de síntesis de nuevas proteínas ^{143,163}, y ya hace 40 años que se ha demostrado que la formación de memorias requiere de la síntesis de proteínas ^{161,163,320,321}, pero los mecanismos por los cuales esta síntesis de proteínas altamente regulada contribuye a la formación de memorias de largo término sólo se han comenzado a estudiar recientemente. A nivel celular, la mayor parte del campo postula que el aprendizaje desencadena modificaciones postraduccionales rápidas que subyacen a la MCT, y esto se acompaña de programas de transcripción y transcripción de genes que conducen a la síntesis de proteínas relacionadas con la plasticidad que permiten la consolidación de estos cambios en un subconjunto específico de sinapsis y estos cambios permiten el mantenimiento de la MLT ^{143,163}.

Se han identificado varias de las cascadas de señalización intracelular, factores de transcripción y genes involucrados en este proceso ^{143,322-324}. La primera ventana de expresión génica está asociada con la activación de varios factores de transcripción de expresión constitutiva, incluyendo la proteína CREB (del inglés, cyclic-AMP/calcium responsive-element binding protein), que llevan a un aumento de transcripción de un diverso grupo de genes tempranos (IEGs, del inglés *immediate early genes*) como c-Fos ³²⁵⁻³³¹. Muchas quinasas participan en la regulación de esta transcripción, entre ellas PKA (proteína quinasa dependiente de AMP cíclico) ^{157,322,332-334} y MAPK/ERK (del inglés, *extracellular-signal regulated kinase*) ^{316,335-343} que actúan a través de la fosforilación de CREB ^{316,333,344-347}. En una segunda ola de expresión génica, se induce la expresión de algunos genes efectores como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) ^{172,348-357}, CamKII ³⁵⁸⁻³⁶³, Homer2 ³⁶⁴⁻³⁶⁷, etc.

El avance en la identificación y el estudio de las proteínas expresadas durante la consolidación de la memoria se ha dado en gran parte gracias al uso de moscas mutantes y ratones modificados genéticamente. Estas técnicas permitieron identificar componentes importantes para el procesamiento de la MLT como la PKA ³⁶⁸, CREB ³⁶⁹ y rNMDA de glutamato ³⁷⁰. Sin embargo, estas técnicas no permiten estudiar su función en mayor

profundidad, ya que no es posible distinguir la contribución de estas moléculas en las distintas fases de la memoria. El uso de métodos que impiden la traducción de genes específicos *in vivo* como el uso de oligonucleótidos antisentido (ODNs) o ARN de interferencia ha permitido importantes avances en este sentido ^{327,371-373}.

RNMDAs, detectores de coincidencias

Los rNMDAs son receptores ionotrópicos de glutamato presentes en el sistema nervioso central que tienen características farmacológicas y funcionales que los hacen únicos ^{374,375}. En particular, su alta permeabilidad al calcio, cuya entrada es crítica para la plasticidad sináptica actividad-dependiente, y su bloqueo voltaje-dependiente por el Mg^{2+} extracelular, que les permite actuar como detectores de coincidencias, han logrado que se los postulara como receptores fundamentales para la plasticidad sináptica ³⁷⁶⁻³⁷⁸. El LTP dependiente de rNMDAs es la forma de plasticidad sináptica predominante en el cerebro ²⁷⁸. Los rNMDAs al actuar como detectores de coincidencias satisfacen los requerimientos de especificidad, asociatividad y cooperatividad del LTP. Además, cuando los rNMDAs se activan el aumento en el calcio intracelular lleva a un cambio duradero en la transmisión sináptica rNMDA-dependiente ³⁷⁹, que puede deberse a la inserción de nuevos receptores de tipo AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) en la densidad postsináptica, cambios en las propiedades de conductancia de los canales, etc. ^{380,381}. Aunque hay formas mecánicamente distintas de LTP y LTD que ocurren en diferentes tipos de sinapsis, se acepta ampliamente que los rNMDA son fundamentales para al menos algunas formas de LTP y LTD ³⁸²⁻³⁸⁴, en las cuales su actividad es fundamental para iniciar la inserción o remoción de rAMPA de la sinapsis ³⁸⁵.

Los rNMDAs son receptores heteroméricos que están constituidos por un gran pool de subunidades homólogas que generan una gran diversidad de subtipos de receptor: dos subunidades esenciales NR1 y otras dos subunidades no esenciales que pueden ser NR2A-D o también incluir NR3A-B, y las propiedades del receptor varían de acuerdo a la composición del mismo ³⁸⁶⁻³⁹¹. La mayoría de los receptores en el adulto contienen a la subunidad NR2A ³⁹². La presencia de distintos tipos de subunidades en los rNMDAs podría tener influencia sobre la polaridad de la plasticidad sináptica, ya que el bloqueo específico de los receptores que contienen NR2B afecta específicamente la inducción del

LTD y no el LTP; y la inhibición de los receptores que contienen la subunidad NR2A tiene el efecto opuesto ³⁹³.

Los receptores de rNMDA pueden ser fosforilados en muchos sitios por PKA, PKC y CAMKII ³⁹⁴. Estas quinasas pueden regular el tráfico de estos receptores o sus propiedades, generando cambios en la fuerza sináptica que subyacen a muchas formas de plasticidad sináptica, mientras que fosfatasa como la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina pueden inhibir su funcionamiento ^{395,396}.

Un gran número de trabajos demostraron el rol de esta forma de plasticidad para el aprendizaje y formación de la memoria, y se la ha postulado como correlato celular subyacente a estos procesos ³⁹⁷⁻³⁹⁹. Su importancia se ha demostrado en el condicionamiento de miedo ⁴⁰⁰, aprendizaje espacial ^{370,401,402}, condicionamiento de preferencia de lugar ⁴⁰³, memoria olfativa ^{404,405}, reconocimiento de objetos ⁸⁵ y aprendizaje reverso ⁴⁰⁶, entre otras tareas. El trabajo de Morris, así como otros, demostró que el bloqueo de los rNMDA en el GD perjudica a la adquisición en la tarea del laberinto acuático de Morris, al tiempo que no evita el aprendizaje por discriminación visual ^{309,401,407,408}, apoyando la importancia de rNMDA para la LTP y las memorias dependientes de hipocampo. Más aún, la estabilización de los campos espaciales hipocampales depende de la activación de rNMDAs ⁴⁰⁹. Por otra parte, el bloqueo de rNMDAs en Prh afecta a la memoria de largo término de reconocimiento de objetos, pero no a la de corto término ^{84,85}. Además, antagonistas selectivos de rNMDAs en rodajas de cerebro no afectan la transmisión sináptica normal de baja frecuencia en la Prh, solamente alteran la inducción de procesos plásticos como LTP y LTD ^{410,411}; sugiriendo que fallas en la memoria de reconocimiento de objetos pueden darse con manipulaciones farmacológicas que no afecten el procesamiento sináptico en la Prh sino únicamente los cambios plásticos asociados. Los rNMDAs han sido implicados específicamente con cambios plásticos lentos y relacionados con el mantenimiento de memorias de reconocimiento de objetos durante intervalos de tiempo largos, en contraste con procesos dependientes de receptores de kainato asociados a cambios plásticos rápidos y de corta duración que permitirían el mantenimiento de corto plazo de memorias de objetos ⁸⁴.

Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que los rNMDA en el GD no siempre son esenciales para el aprendizaje espacial y la memoria, y sugieren que los rNMDA tienen un papel más sutil de lo que se suponía inicialmente ⁴¹². Por ejemplo, las ratas

tratadas con antagonistas de rNMDA no se vieron afectadas en la tarea de laberinto acuático de Morris cuando se entrenaba en un laberinto ubicado en una sala de pruebas distinta ⁴¹³, por lo que se propuso que en lugar de rNMDA contribuyendo a la memoria espacial en general, los rNMDA del GD podrían ser importantes solo cuando se necesita resolver un conflicto o inhibir las respuestas conductuales aprendidas previamente ^{414,415}. La evidencia para esta propuesta provino de estudios en los que interrumpir la plasticidad de GD a través de un knockout selectivo de la subunidad NR1 del rNMDA disminuyó la capacidad de los ratones para distinguir entre contextos, sugiriendo que mecanismos específicos relacionados con la plasticidad podrían estar involucrados en el almacenamiento de engramas diferenciados por "separación de patrones " ²⁴⁹.

BDNF, el persistente

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain derived neurotrophic factor*) pertenece a una familia de factores neurotróficos denominados neurotrofinas ^{416,417}. Si bien esta proteína, a través de su receptor TrkB, tiene un rol crucial en la supervivencia y diferenciación de las poblaciones neuronales durante el desarrollo ⁴¹⁸, mantiene niveles altos de expresión en sinapsis glutamatérgicas en el adulto ⁴¹⁹ que son importantes para la regulación de la transmisión sináptica excitatoria y de la plasticidad dependiente de actividad ⁴¹⁹⁻⁴²². A su vez, BDNF también es capaz de modular la transmisión sináptica inhibitoria GABAérgica ⁴²³⁻⁴²⁵. Además, BDNF puede aumentar la transmisión sináptica tanto por mecanismos presinápticos –ej. aumento en la liberación de glutamato- como postsinápticos –ej. fosforilación de receptores de neurotransmisores- ⁴²⁶⁻⁴²⁸. BDNF puede almacenarse en dendritas y en axones ⁴²⁶, y es liberado en forma dependiente de actividad como una mezcla entre su precursor proBDNF y su forma madura ⁴²⁹. Además, BDNF controla su propia expresión y liberación a través de la movilización de calcio PLC-dependiente ⁴³⁰⁻⁴³² y por su efecto directo sobre la despolarización de membrana ⁴³³, lo que permite que la señalización de BDNF sea sostenida en el tiempo.

En el hipocampo, BDNF se encuentra principalmente en los procesos dendríticos ⁴³⁴⁻⁴³⁶. La unión de BDNF a su receptor TrkB dispara la activación de varias vías de señalización: 1) ERK-dependiente 2) PI3K-dependiente (del inglés, phosphatidylinositol 3 kinase) o 3) PLCγ (del inglés, phospholipase C gamma) ^{437,438}.

Más allá de los efectos tempranos e independientes de la síntesis proteica de BDNF como la potenciación de la liberación de neurotransmisores, la modificación de sus

receptores o la disminución de la transmisión GABAérgica ^{423,425,439-442}, diversos estudios apoyan el rol de BDNF en cambios de largo plazo de la eficiencia sináptica. El LTP temprano se encuentra afectado en ratones BDNF^{-/-}, y puede restaurarse mediante el agregado de BDNF ⁴⁴³, y del mismo modo anticuerpos contra BDNF o TrkB-IgGs reducen el LTP ⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁶. Un puff breve de BDNF no tiene efecto en la eficacia sináptica por sí sólo, pero desencadena LTP si apareado con una estimulación de alta frecuencia débil, mientras que aplicación de BDNF por varios minutos puede llevar a un aumento en la eficacia sináptica de largo término lo que se conoce como BDNF-LTP ⁴⁴⁷. Esta potenciación persistente que puede durar por lo menos 15 hs en animales anestesiados se ha demostrado *in vitro* en la sinapsis CA3-CA1, y también en la vía perforante al GD *in vivo* ^{448,449}. No sólo el aumento sostenido de BDNF es suficiente para generar LTP, sino que también es necesario para la fase de mantenimiento del LTP producido por una estimulación de alta frecuencia o estimulación inducida por ritmos theta (TBS, del inglés theta burst stimulation) ^{429,445,450,451}. Curiosamente, el TBS libera BDNF en forma ERK-dependiente⁴⁵¹, y a su vez, la inducción del BDNF-LTP también requiere de la activación de ERK y de expresión génica asociada con la activación del factor de transcripción CREB por su fosforilación ERK-dependiente ^{452,453}. Por otra parte, la modulación sináptica de BDNF requiere de cascadas de transducción de señales cuya eficacia depende de la presencia de actividad eléctrica, y de hecho la potenciación sináptica inducida por BDNF es facilitada por la actividad presináptica o por el aumento de TrkB en membrana en forma dependiente de actividad sugiriendo que los terminales activos podrían ser más susceptibles a esta potenciación y el BDNF podría así lograr un refinamiento sináptico dependiente de actividad ^{454,455}.

BDNF tiene una respuesta bimodal, con un componente temprano asociado con la liberación presináptica de BDNF, y un componente más tardío asociado con la liberación postsináptica de BDNF que contribuye al mantenimiento del LTP ^{450,451}. Esto se explica en parte porque el BDNF exógeno únicamente ocluye el efecto del LTP tardío (y no el temprano), lo que evidencia que este actúa por mecanismos en común con el LTP tardío, que difieren de los del LTP temprano ⁴⁵⁶. En este sentido, patrones de estimulación que generan LTP tardío disparan un aumento persistente en la secreción de BDNF (5-12 min), mientras que estimulaciones que producen sólo LTP temprano sólo generan aumentos cortos en la secreción de BDNF⁴⁵⁷. Esto sugiere que la liberación de BDNF de corta duración, aunque modula el LTP temprano, es insuficiente para generar LTP tardío.

Además, BDNF se ha postulado como uno de los mayores reguladores actividad-dependientes de la síntesis dendrítica de proteínas asociadas a plasticidad, a partir de sus mensajeros que viajan a las dendritas (ej. Arc, Homer2, α CamKII^{453,458,459}), y esta síntesis de proteínas local inducida por BDNF parece ser necesaria para sus efectos de largo plazo en la fuerza sináptica⁴⁶⁰. De estos resultados surge la posibilidad de que BDNF actúe en conjunto con el aumento de los niveles de mensajeros específicos relacionados con plasticidad para la regulación local de la fuerza sináptica. BDNF es capaz de aumentar la síntesis de CamKII y Arc en sinaptodendrosomas, indicando que es capaz de regular la síntesis de proteínas localmente. En particular, se ha demostrado que BDNF puede aumentar la fosforilación del factor eucariótico de iniciación 4E, paso limitante en la traducción, en forma ERK-dependiente^{453,461}; y además activar a mTOR (del inglés, mammalian target of rapamycin) en forma PI3K-dependiente⁴⁶².

Los cambios duraderos generados por BDNF en la plasticidad sináptica dependen de la síntesis de proteínas⁴⁶⁰. Consistente con la idea de que BDNF es capaz de promover el almacenamiento de memorias en el cerebro favoreciendo modificaciones morfológicas que establezcan cambios en el tiempo, el BDNF liberado en las dendritas promueve el desarrollo de arborizaciones y crecimiento dendrítico en forma local⁴⁶³. BDNF aumenta el número de espinas dendríticas en forma ERK-dependiente^{464,465} y promueve la polimerización de actina mediante dos vías: la fosforilación y consecuente inactivación de ADF/cofilina⁴⁶⁶ y la activación de PAK3, un efector de Rac que controla la actividad de ADF/cofilina⁴⁶⁷. Además, BDNF también es capaz de generar cambios estructurales en la presinápsis, por ejemplo a través del aumento en el número de sinapsis como se observó en rodajas de hipocampo⁴⁶⁴. Mientras que la señalización de BDNF a través de TrkB promueve el LTP, su precursor proBDNF es capaz de interactuar con el receptor p75^{NTR} facilitando el LTD y regulando negativamente la formación y complejidad de espinas dendríticas, lo que sugiere una regulación bidireccional^{429,468}.

BDNF ha sido implicado en la inserción de rAMPA y su estabilización en la membrana^{469,470}. Además, el BDNF es capaz de regular el tráfico y la expresión de los rNMDAs⁴⁷¹, además de modificar la fuerza sináptica a través de un aumento en la probabilidad de apertura de los rNMDAs mediante la fosforilación de subunidades del receptor⁴⁷²⁻⁴⁷⁴. Más aún, el bloqueo de los receptores que contienen a la subunidad NR2B, cuya fosforilación está asociada al LTP⁴⁷⁵, previene el aumento BDNF-dependiente de la transmisión glutamatérgica⁴⁷⁶. Por otra parte, BDNF también es capaz de aumentar la neurogénesis, ya sea a través de un aumento en la proliferación⁴⁷⁷ o en la supervivencia⁴⁷⁸.

Un gran número de estudios sugieren que el BDNF juega un papel crucial en el aprendizaje y la memoria ^{172,348-350,352-357,479-483}. La expresión de BDNF es inducida rápidamente en el hipocampo durante el aprendizaje contextual ³⁴⁸ y varias tareas de aprendizaje en distintas especies han sido asociadas con aumentos en los niveles de mensajero de BDNF ⁴⁸⁴. Además, la interferencia con la señalización vía BDNF/TrkB resulta en una deficiencia en la adquisición de información espacial ^{349,485-487}, y su inactivación afecta memorias de reconocimiento de objetos ¹⁰⁶ y memorias espaciales ⁴⁸⁸. En seres humanos, un polimorfismo en un nucleótido en la región no codificante del gen de BDNF que sustituye una metionina por una valina en el codón 66, está asociado a una deficiencia en la memoria episódica ³⁵². Además, así como se han detectado efectos rápidos y transientes del BDNF sobre la plasticidad sináptica ^{419,489}, también se han encontrado efectos de BDNF en el hipocampo sobre memorias de corto término ^{172,482}. Las características funcionales de esta molécula, tanto a nivel de la regulación de la síntesis de macromoléculas como en la inducción de cambios estructurales, sugieren que el BDNF podría estar involucrado en los mecanismos de mantenimiento y almacenamiento de la MLT. Si la síntesis de proteínas es necesaria para inducir o mantener los cambios morfológicos generados por el aprendizaje, el BDNF podría ser efector de estos cambios ya que al ser liberado en las sinapsis podría inducir la transcripción génica y traducción proteica global o local en las dendritas de forma tal de generar cambios estructurales, y a su vez inducir su propia transcripción para lograr cambios que se sostengan en el tiempo.

Arc, el sináptico

Si bien se sabe que las modificaciones sinápticas dependientes de actividad para poder ser duraderas requieren de expresión génica, no se conocen los eventos que suceden luego de la activación sináptica que llevan a la modificación de sinapsis individuales. Pero en principio podría decirse que para que esto ocurra un proceso de señalización que module la expresión génica debería darse tal que se sintetice el subgrupo de productos génicos necesarios para llevar a cabo las modificaciones sinápticas, y que estos productos puedan afectar en forma específica sólo a las sinapsis activas (ya sea por un traslado selectivo de la proteína, una traducción dendrítica específica del mensajero que viajó por toda la neurona o la modificación *in situ* de la proteína que viajó en forma inespecífica a todas las sinapsis).

La activación neuronal lleva a una serie de respuestas altamente organizadas espacio-temporalmente. Un subgrupo de genes es capaz de responder muy rápidamente a las señales externas, los llamados genes tempranos (IEGs, del inglés *immediate early genes*). Su traducción se activa en la célula minutos después de la transcripción sin necesidad de síntesis de proteínas *de novo* (todas las proteínas necesarias para su traducción ya se encuentran en la célula –incluyendo factores de transcripción–), y su expresión es transiente ^{490,491}. Las funciones de los IEGs son muy variadas, desde factores de transcripción como *c-fos* (que orquestran la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con plasticidad) hasta proteínas efectoras como factores de crecimiento como BDNF, enzimas, proteínas estructurales, o proteínas asociadas a vías de transducción de señales. En este contexto los IEGs, en conjunto con proteínas de expresión constitutiva, serían parte de un programa con un amplio espectro de funciones relacionadas con los parámetros neuronales a modificar en respuesta a la actividad sináptica. Los productos de estos genes inducibles tienen roles críticos para el establecimiento y mantenimiento a largo plazo de cambios plásticos neuronales ⁴⁹²⁻⁴⁹⁴, por lo que son una medida no sólo de actividad en una dada región sino también de plasticidad neuronal.

Como otros IEGs, la transcripción de Arc (del inglés, *Activity-regulated cytoskeletal-associated protein*) es inducida por la actividad sináptica ⁴⁹⁵⁻⁴⁹⁷ y la activación de rNMDAs ⁴⁹⁸. Sin embargo, el gen temprano Arc es único, ya que a diferencia de la mayoría de los genes tempranos y mensajeros de expresión constitutiva que permanecen en la región del soma, su mensajero viaja a las dendritas rápidamente luego de la inducción de LTP ^{497,499}. En particular, el mensajero de Arc se acumula en forma altamente selectiva en los sitios sinápticos en los que los patrones de actividad fueron suficientes como para activar a rNMDAs, sugiriendo que se sintetiza localmente ^{498,500}. Estas características lo apuntan como un factor clave en el acople de la actividad sináptica con la plasticidad sináptica dependiente de síntesis de proteínas, y de hecho Arc podría actuar como una marca sináptica que se dirige a las regiones activas de las dendritas marcándolas para posteriores cambios estructurales.

Arc es actualmente considerada una proteína clave en la formación de la memoria y en diferentes tipos de plasticidad sináptica, incluyendo LTP y LTD y escalada sináptica homeostática ⁵⁰¹. Ratones knock out (KO) para Arc presentan fallas específicas en la

fase tardía del LTP en las regiones del GD y CA1 de rodajas hipocampales. Además, el LTD dependiente de rNMDA también está reducido en registros de rodajas hipocampales^{502,503}. Para estudiar la dinámica del requerimiento de Arc en LTP *in vivo*, Messaoudi⁴⁴⁹ infundió ODNs antisentido (ASO) de Arc luego de una estimulación de alta frecuencia de la vía perforante al GD. Encontró un efecto temprano y transiente del Arc ASO 15 minutos luego de la inducción que evidencia que la expresión del LTP temprano depende de la síntesis de Arc, y un efecto a las 2hs pero no a las 4hs sobre el mantenimiento del LTP, evidenciando el rol crítico de la traducción sostenida de Arc dentro de una ventana temporal en la consolidación del LTP. Además, en neuronas de CA1 la traducción del Arc dendrítico es necesaria para el LTD dependiente de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs), que requiere de la endocitosis de rAMPA⁵⁰⁴. De la misma forma, el LTP dependiente de mGluR también requiere de síntesis de proteínas y de la vía de señalización de Arc⁵⁰⁵, señalando a Arc como un mediador crítico de la consolidación sináptica común al LTP y LTD. Sin embargo, la regulación de la expresión de Arc difiere entre LTP y LTD: mientras que hay un aumento persistente en la expresión de Arc durante el LTP, el LTD involucra una disminución inicial seguida de un aumento transiente en la expresión de Arc⁵⁰⁶.

Como mencionamos previamente, el LTP tardío requiere de cambios estructurales duraderos como la expansión de la densidad postsináptica y el ensanchamiento de las espinas asociados con cambios en la dinámica de actina^{266,299,507-509}. Ya desde los estudios iniciales de Lyford⁴⁹⁷ se observó que la proteína Arc es capaz de interactuar con actina polimerizada en ensayos biquímicos, y estudios posteriores en neuronas primarias sugirieron que su interacción con la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) es importante para la desestabilización del citoesqueleto de actina⁵¹⁰. La traducción sostenida del mensajero Arc es necesaria para la fosforilación del regulador de actina cofilina en las dendritas (que en su forma fosforilada promueve la polimerización), así como también para el aumento en el diámetro de la sinapsis y el aumento local del contenido de F-actina²⁹⁹. Más aún, la reversión del LTP mediada por los ODNs Arc ASO 2hs luego de la inducción está acompañada por una defosforilación de la cofilina hiperfosforilada y pérdida de la F-actina en la vía perforante, mientras que el estabilizador de F-actina jasplakinolide bloquea la reversión del LTP⁴⁴⁹. De hecho, la sobreexpresión de Arc aumenta la densidad de espinas *in vitro*, así como también aumenta la cantidad de espinas finas y plásticas en relación a las más estables, y su inhibición disminuye la

densidad de espinas *in vivo* ⁵¹¹. Además, Arc se asocia con la densidad post-sináptica, donde interactúa con endofilinas y dinaminas y así acelera la endocitosis de rAMPA favoreciendo la concentración de proteínas de la maquinaria endocítica ^{503,512,513}. Y, por otra parte, promueve el reciclaje de endosomas tempranos favoreciendo el mantenimiento de un LTP estable ⁵¹⁴. Estos resultados en conjunto sugieren que la síntesis de Arc regula la polimerización de actina y la formación de un LTP y LTD estables.

La teoría de “etiquetado sináptico y captura” postula que las sinapsis son marcadas por cambios plásticos locales inducidos por la actividad que capturan proteínas asociadas a plasticidad cuya expresión aumenta en forma dependiente de actividad. Estas proteínas podrían estabilizar los cambios en la fuerza sináptica en forma sinapsis-específica ^{290,515}. Arc podría ser una de las posibles proteínas reclutadas que cambia y estabiliza la fuerza de sinapsis específicas en base a señales locales ²⁹⁰. De hecho, un estudio reciente sugirió que la afinidad aumentada de Arc por la forma inactiva de CamKII β en las sinapsis permitiría que Arc se mantenga preferencialmente en sinapsis inactivas controlando el tráfico local de rAMPA en forma sinapsis-específica de acuerdo a la historia de actividad sináptica local ⁵¹⁶. Estos resultados sugieren que mientras que en las sinapsis más débiles de neuronas potenciadas predomina la forma inactiva de CamKII β y por lo tanto Arc favorece el LTD, en sinapsis que recibieron una estimulación fuerte predominaría la forma activa de CamKII β y por lo tanto se favorecería el LTP.

Arc está fuertemente asociado con la actividad neuronal relacionada con experiencias conductualmente relevantes, y de hecho es inducido en el HP y en estructuras neocorticales asociadas luego de experiencias espaciales en una proporción que se corresponde con los niveles de actividad que se obtienen de registros electrofisiológicos ^{219,517}. Más aún, el comportamiento exploratorio induce Arc en ensamblajes neuronales contexto-específicos en el HP ^{72,219,517,518}, lo que sugiere que estos ensamblajes podrían contener células de lugar que expresan su campo de disparo en estos ambientes. Los estudios demuestran que el mensajero de Arc se transcribe dentro de los 1-5 minutos posteriores al comportamiento, a los 15-30 el mensajero viaja del núcleo al citoplasma y para los 45 minutos ya puede encontrarse en las dendritas ^{517,519,520}. Los niveles y la persistencia de la inducción de Arc varían entre regiones del cerebro, lo que podría tener efectos sobre los roles diferenciados de estas regiones en el procesamiento y el almacenamiento de información en procesos cognitivos ^{521,522}. En particular, se ha

reportado un aumento sincronizado de la expresión de la proteína Arc de 30 min a 2 hs en CA1, mientras en el GD esta expresión se sostiene por hasta 8 hs ⁵¹⁹. El reclutamiento del mensajero de Arc a dominios dendríticos y específicamente en sinapsis activas, así como la síntesis local de la proteína Arc proveen un modelo para explicar cómo sinapsis individuales pueden modificarse en forma dependiente de actividad y de expresión génica ²⁸⁶. A pesar de que la expresión de Arc está asociada a la actividad neuronal, sus patrones de expresión parecen ser diferenciables durante distintas etapas del aprendizaje (aprendizaje inicial, entrenamiento masivo, etc), sugiriendo que la función de este IEG puede diferir de acuerdo al contexto molecular de genes que se coexpresan en determinado momento ⁵⁰⁸. Algunos estudios reportan la inducción de una segunda ola de Arc que podría estar asociada a una reactivación a nivel de la actividad reverberante de los circuitos durante la consolidación ^{519,523}. Estos estudios apoyan el rol de la expresión tardía de Arc en los cambios plásticos asociados a la reactivación de los ensamblajes neuronales, que podrían permitir su estabilización.

Arc es una proteína efectora río abajo de múltiples vías de señalización neuronales. Arc se transcribe a muy bajos niveles en condiciones basales, y a niveles aún más bajos frente a la actividad de rAMPA ⁵²⁴, mientras que los rGlus y el influjo de calcio por canales voltaje dependientes (VGCC) y rNMDAs vía PKA y MAPK (del inglés, Mitogen-Activated Protein Kinases) están asociados a su inducción ^{498,525-528}. La cinética de transcripción y traducción de Arc varía de acuerdo a cuál vía la induce: el efecto de los rGlus es rápido y sobre la traducción del mensajero presente en dendritas, y el efecto de rNMDAs y VGCC aumenta en forma temprana la transcripción y más tardíamente la traducción de Arc ⁵¹³. Como la expresión de Arc se induce en grupos de neuronas distintas en ambientes diferentes se postula que está asociada al desarrollo de representaciones internas de ambientes específicos, y como tanto la expresión de Arc como la estabilización de los campos espaciales hipocámpales dependen de la activación de rNMDAs, podría tener un rol específico en la estabilización de largo término de estas representaciones internas ⁵¹⁷.

La formación de MLT depende de la habilidad neuronal de modular las conexiones sinápticas. De acuerdo con esto, consistente con los déficits reportados en plasticidad sináptica, los ratones KO para Arc presentan déficits en la formación de memorias de largo plazo, pero no de corto plazo, en varias tareas de aprendizaje tales como MWM, el

condicionamiento del miedo, la aversión condicionada al gusto y el reconocimiento de objetos novedosos⁵⁰². Además, el uso de ODNs permitió evidenciar que Arc es necesario para la consolidación de memorias de largo término en diversas estructuras y en una variedad de paradigmas ^{529,530}. Guzowski et al. ³⁷¹ encontró que infusiones hipocampales de ODNs para bloquear la síntesis de la proteína Arc alteraron la fase de mantenimiento del LTP inducido en la vía perforante y también afectaron la consolidación de memorias espaciales sin interferir en la adquisición.

Por otro lado, BDNF es capaz de inducir la expresión de Arc en forma dependiente de ERK y de rNMDAs ^{453,456}. La proteína Arc aumenta durante el BDNF-LTP en forma dependiente de transcripción ^{453,456,531}, y la síntesis de Arc es necesaria tanto para la formación del BDNF-LTP como para su consolidación en el tiempo, indicando que la transcripción sostenida de Arc durante una ventana temporal crítica es crucial para la consolidación sináptica ^{449,453,456,531}. Es posible que la liberación sostenida de BDNF sea el mecanismo por el cual Arc mantiene su transcripción y, consistente con esta idea, la expresión temprana de Arc depende de la actividad neuronal, mientras que la expresión más tardía depende de BDNF ⁵³². Estas evidencias apuntan a Arc como un posible efector de los cambios plásticos inducidos por BDNF.

Objetivos

Objetivo general: Comprender los mecanismos biológicos que regulan los procesos de separación de patrones y compleción de patrones a nivel comportamental, y entender cómo se da el balance entre la adquisición de nuevas memorias y la evocación de memorias previas en presencia de estímulos similares pero no idénticos al original.

Objetivo particular 1: Analizar los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la separación de patrones comportamental necesaria para diferenciar memorias espaciales y de objetos, y comparar la participación de estos mecanismos en la Prh y en el GD del HP.

Objetivo particular 1a: Estudiar el papel de las proteínas asociadas a plasticidad sináptica BDNF, Arc y los rNMDAs como posibles mediadores de cambios plásticos en el proceso de separación de patrones relacionado con la formación y consolidación de representaciones mnemónicas diferenciables de estímulos similares.

Objetivo particular 1b: Evaluar el rol del GD del HP (y su posible interacción con la Prh) en la separación de patrones comportamental necesaria para la diferenciación de memorias de objetos similares.

Objetivo particular 2: Estudiar los mecanismos, tanto moleculares como a nivel del circuito hipocampal, que permiten la evocación de una experiencia previa a pesar de los cambios en el contexto. Evaluar cómo estos mecanismos pueden afectar el balance a nivel de procesamiento hipocampal favoreciendo un procesamiento más afín a la adquisición de una memoria nueva (consistente con un procesamiento de tipo separación de patrones) o a la evocación de la memoria original en presencia de estímulos degradados (consistente con un procesamiento de tipo compleción de patrones).

Para estudiar la separación de patrones en memorias espaciales y no espaciales utilizamos una tarea dependiente de Prh y una tarea dependiente de HP y manipulamos la similitud de los estímulos en las tareas durante la codificación de la información.

Para cumplir con el objetivo particular 1 hicimos experimentos que combinan manipulaciones específicas de expresión de las proteínas BDNF y Arc y de la actividad de

los rNMDAs en GD o en la Prh durante la resolución de una versión modificada de la tarea de reconocimiento de objetos (REO) o de reconocimiento de posición (REP).

Para el objetivo particular 2, evaluamos el efecto de manipulaciones en el número de claves presentes durante la sesión de evaluación sobre la capacidad de evocación, y estudiamos cómo distintas manipulaciones farmacológicas son capaces de modular la evocación en presencia de claves parciales, y cómo estos efectos son dependientes del número de claves presentes en la evaluación.

Materiales y métodos

Sujetos

Los sujetos fueron 397 ratas macho Long Evans de nuestra colonia de cría (Capítulos 1 y 2) y 197 ratas macho Wistar (Capítulo 3), que pesaban aproximadamente 250-300 g al comienzo de las pruebas. Las ratas se alojaron en un ciclo invertido de 12 h de luz / 12 h de oscuridad (se encienden 19:00-07:00), en grupos de dos a cinco. Todas las pruebas de comportamiento se realizaron durante la fase oscura del ciclo. Las ratas se privaron de alimentos al 85-90% de su peso de alimentación libre para aumentar la exploración espontánea, excepto durante la recuperación de la cirugía, donde los alimentos estaban disponibles ad libitum. El agua permaneció disponible ad libitum durante todo el estudio. Toda la experimentación se realizó de acuerdo con el Comité Nacional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Buenos Aires y el Comité Nacional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Favaloro (CICUAL).

Cirugía y canulación

Las ratas se implantaron bilateralmente en Prh o GD con cánulas guía de calibre 22. Los sujetos experimentales fueron anestesiados con ketamina (Holliday, 74 mg kg⁻¹, ip) y xilazina (Konig, 7,4 mg kg⁻¹, ip) y se colocaron en un marco estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) con la barra incisiva fijada en -3.2 mm. Las cánulas guía se implantaron según las siguientes coordenadas, medidas en relación al bregma del cráneo (Paxinos y Watson, 1998): para Prh anteroposterior -5,5 mm, lateral \pm 6,6 mm, dorsoventral -7,1 mm; para DG anteroposterior -3.9 mm, lateral \pm 1.9 mm, dorsoventral -3.0 mm; para CA3 anteroposterior -3.6 mm, lateral \pm 3.6 mm, dorsoventral -3.6 mm; para CA1 anteroposterior -3.9 mm, lateral \pm 3.0 mm, dorsoventral -2.6 mm. Las cánulas se aseguraron al cráneo con acrílico dental y un tornillo de joyería. Los obturadores, cortados para quedar alineados con la punta de las cánulas guía y con un diámetro exterior de 0,36 mm, se insertaron en las guías y permanecieron allí excepto durante las infusiones. Al finalizar cada cirugía, se aplicó un antibiótico durante tres días (Enrofloxacin, 0,27 mg kg⁻¹, Vetanco, Arg). Los animales recibieron al menos 7 días para recuperarse antes de las infusiones de fármacos y las pruebas de comportamiento.

Procedimiento de infusión

Dependiendo del experimento, las ratas recibieron infusiones bilaterales de ODNs ($4\text{nmol}\mu\text{l}^{-1}$ / $0.5\ \mu\text{l}$ lateral; Genbiotech), BDNF recombinante humano (BDNFr) ($0.5\ \mu\text{g}\ -\mu\text{l}^{-1}$ / $0.5\ \mu\text{l}$ lado; Byoscience), antagonista competitivo de rNMDA AP5 (ácido D(-)-2-amino-5-fosfonopentanoico, $2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y $0,5\ \mu\text{l}$ de lado;), Emetina ($50\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$; Sigma-Aldrich), antagonista competitivo de receptores AMPA/kainato DNQX (6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona, $2\ \mu\text{g} /\mu\text{l}$), agonista parcial de rNMDA D-Cycloserina ($2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$; Sigma-Aldrich), antagonista no competitivo selectivo de TrkB ANA-12 ($1\ \mu\text{g} / \mu\text{l}$; Sigma-Aldrich), o Vehículo (solución salina o DMSO 5% en el caso del DNQX o DMSO 2%-Tween 2% en el caso de ANA-12) en diferentes momentos durante la tarea de comportamiento. Los ODNs fueron secuencias de 18-nt purificadas por HPLC, disueltas en solución salina estéril a una concentración de $4\ \text{nmol}\mu\text{l}^{-1}$. Todos los ODN fueron fosforotiodados en las tres bases terminales de los extremos 5' y 3'. Esta modificación da como resultado una mayor estabilidad y menor toxicidad del ODN. BDNF ASO, 5'-TCTTCCCCTTTTAATGGT-3' ; BDNF MSO, 5'-ATACTTTCTGTTCTTGCC-3'. Arc ASO, 5'-GTCCAGCTCCATCTGCTCGC-3' ; Arc MSO, 5'-CGTGCA CCTCTCGCAGCTTC-3'. Todas las secuencias ODN se sometieron a una búsqueda BLAST en el servidor BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica utilizando la base de datos Genbank ⁴⁸⁰. Las secuencias de control MSO, que incluían en ambos casos los mismos 18 nucleótidos que el ASO pero en un orden aleatorio, no generaron ninguna coincidencia completa con las secuencias de genes identificadas en la base de datos. Las infusiones bilaterales se realizaron utilizando dos jeringas Hamilton de $5\ \mu\text{l}$ que se conectaron a las cánulas de infusión mediante un tubo de propileno. Las jeringas fueron impulsadas de forma tal que se administró $0,5\ \mu\text{l}$ a cada hemisferio durante el transcurso de 1 minuto. Las cánulas de infusión se dejaron en su lugar durante un minuto adicional para permitir la difusión. Se permitieron al menos 3 días para el lavado entre infusiones repetidas.

Localización de cánulas

Uno o dos días luego de finalizados los procedimientos conductuales, todos los animales fueron infundidos $0.5\mu\text{l}$ de una solución al 4% de azul de metileno en solución salina a través de la cánula y los animales fueron sacrificados 15 minutos después. La localización de la cánula fue verificada mediante examinación histológica. La infusión se extendió en un radio de menos de 1 mm y fue correcta (dentro de 1 mm del sitio elegido para la

infusión) en más del 95% de los animales, llegando a un total de 16 animales descartados dentro de la tesis. Sólo los datos conductuales de los animales con las cánulas correctamente localizadas fueron incluidos para el análisis final.

Ensayos bioquímicos

Para los ensayos bioquímicos de la Fig. 7C, fueron sacrificados animales de los grupos Entrenado 1h luego de los procedimientos conductuales en los cuales se los expuso a un par de objetos similares (AB y BC) o disímiles (AB y CD). En el caso de las Fig. 15B el entrenamiento se realizó 2h luego de la infusión de ODNs ASO o MSO de Arc en GD y se los sacrificó 1 hora después de la exposición a un par de objetos similares (AB y BC). En el grupo Naive, los animales fueron retirados de la caja donde se los mantiene y sacrificados a los mismos tiempos que a los animales de los otros grupos. Después de que los animales fueron sacrificados por decapitación, el cerebro fue removido, se extrajeron fracciones enriquecidas en Prh que se homogeneizaron inmediatamente después de su remoción, y luego fueron alicuotados y almacenados a -70° C. En el caso de las Fig. 2B y 5B, se sacrificaron animales implantados en Prh 1 h luego de recibir infusiones de ácido kaínico y 3 h después de recibir la infusión de ASO o MSO.

Inmunoblot

Después de sacrificar a las ratas, los cerebros se congelaron inmediatamente y la Prh y/o GD se microdisectaron. El tejido se homogeneizó en buffer a 4° C (Tris-HCL 20 mM [pH 7,4], sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 10 mg / ml, leupeptina 15 mg / ml, 10 mg / ml bacitracina, 10 mg / ml de pepstatina, 15 mg / ml de inhibidor de tripsina, 50 mM NaF y 1 mM de sodio ortovanadato). Las muestras de homogenatos (15 μ g de proteína para muestras de GD y 40 μ g de proteína para muestras de Prh) se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% en condiciones reductoras. Los geles se corrieron por duplicado. Se utilizó BDNF humano recombinante como estándar para el Western blot (rhBDNF, Alomone). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Biorad) en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 10% v / v) durante 2 hs 100 V. Luego de la pre-incubación en buffer de bloqueo (20 mM Tris-HCL pH 7.4, 2.5% leche en polvo, 150 mM NaCl, 0.05% v/v Tween 20), estas membranas fueron incubadas ON a 4° C con anticuerpo

anti-BDNF (N20, 1: 1000, Santa Cruz Biotechnology Inc), con anticuerpo anti-Arc (1: 500, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) y anti-actina (1: 5000, Santa Cruz Biotechnology Inc). Posteriormente, las membranas fueron lavadas 5 veces durante 20 minutos en buffer TTBS (20 mM Tris-HCL, pH 7.4, 150 mMNaCl, 0.05% v/v Tween 20) y luego incubadas con un anticuerpo secundario anti-conejo o anti-mouse acoplados a peroxidasa de rabanito (1:10000, Bio Rad, Hercules, CA) durante 1h a temperatura ambiente. Luego de esta incubación, las membranas fueron nuevamente lavadas en buffer TTBS 5 veces durante 20 minutos. Finalmente, se visualizaron los complejos antígeno-anticuerpo por un método de quimioluminiscencia mejorada (GE Healthcare), visualizadas por Storm 845 phosphorimager (GE Healthcare Life Sciences) y cuantificadas usando el software ImageQuant (GE Healthcare). Para remover los anticuerpos para una posterior reincubación, las membranas fueron incubadas durante 60 min en buffer de remoción (8 mM Tris-HCl, 7 mM SDS, 0.5 M NaCl, 100 mM Urea, pH: 4.5) a 65° C con agitación en un baño termostático. Luego, las membranas fueron lavadas en agua destilada 5 veces por 20 min, secadas y almacenadas a 4°C hasta su reincubación.

Para el análisis, se obtuvieron los valores de densidad óptica (DO) y las áreas de banda para cada muestra de GD o Prh microdisecada tanto para la proteína diana (BDNF, Arc) como para el control de carga actina. Cada valor de DO objetivo se normalizó a su correspondiente valor de DO de actina y los niveles normalizados se promediaron entre duplicados de gel. Los datos se analizaron usando un ANOVA de una vía seguido de comparaciones post hoc de Bonferroni (Fig. 7C) o un test de *t* no pareado para los controles del funcionamiento de los oligonucleótidos antisentido de BDNF y Arc (Fig. 2B y 5B).

Contextos

El campo abierto triangular utilizado para la tarea de reconocimiento espontáneo de objetos (REO) se hizo con un tablero de espuma blanca. Cada pared tenía 60 cm de largo x 60 cm de alto. Las paredes del campo abierto triangular eran más altas para minimizar el acceso visual a las señales distales en la sala.

El campo abierto circular (90 cm de diámetro x 45 cm de alto) utilizado para la tarea de reconocimiento espontáneo de posición (REP) estaba hecho de plástico negro, y se encontraba rodeado por varias señales espaciales y muebles estándar.

Ambos campos abiertos estaban situados en el medio de una habitación con poca luz. El piso de los campos abiertos siempre estaba cubierto con viruta de madera. Se colocó una cámara de video sobre la arena y se registraron las fases de entrenamiento y evaluación para su posterior análisis. Los objetos para la tarea REO estaban hechos de dos objetos más pequeños diferentes, a excepción de la condición extra similar en la que estaban compuestos por tres objetos pequeños. Los objetos compuestos se hicieron simplemente juntando dos o tres de los elementos pequeños en las condiciones descritas en la sección de "Tareas de comportamiento" (Fig. M1). Para la REP, los objetos utilizados eran latas de refresco o botellas de cerveza de las cuales se había eliminado la etiqueta. Todos los objetos se fijaron al piso del campo abierto con Patafix (UHU) y se limpiaron con una solución de etanol al 50% entre ensayos. Para la tarea REO, los tres objetos compuestos se alinearon cerca de una de las paredes de la arena y las posiciones dentro de esta línea se asignaron pseudoaleatoriamente. Para la tarea REP (Fig. M1), las posiciones variaron de acuerdo con la condición utilizada, con los objetos siempre colocados a lo largo de una circunferencia a 15 cm de la pared y a 30 cm del centro de la arena. Para la condición similar los objetos fueron separados por un ángulo de 50°; y para la condición diferente se separaron por un ángulo de 120°.

Para la tarea de evocación asociativa (EA), utilizamos el mismo campo abierto circular de la tarea de REP pero en este caso 6 claves espaciales se encontraban sobre una cortina blanca que rodeaba por completo al campo impidiendo la visibilidad de cualquier otra clave espacial distal presente en el cuarto. De esta forma, fue posible controlar el número de claves espaciales utilizadas por los animales para orientarse en el espacio. Las claves eran desmontables ya que se encontraban unidas con velcro a la cortina. Todas las claves consistían en formas de cartón y tela de colores diversos que ocupaban aproximadamente la misma superficie (850 cm²).

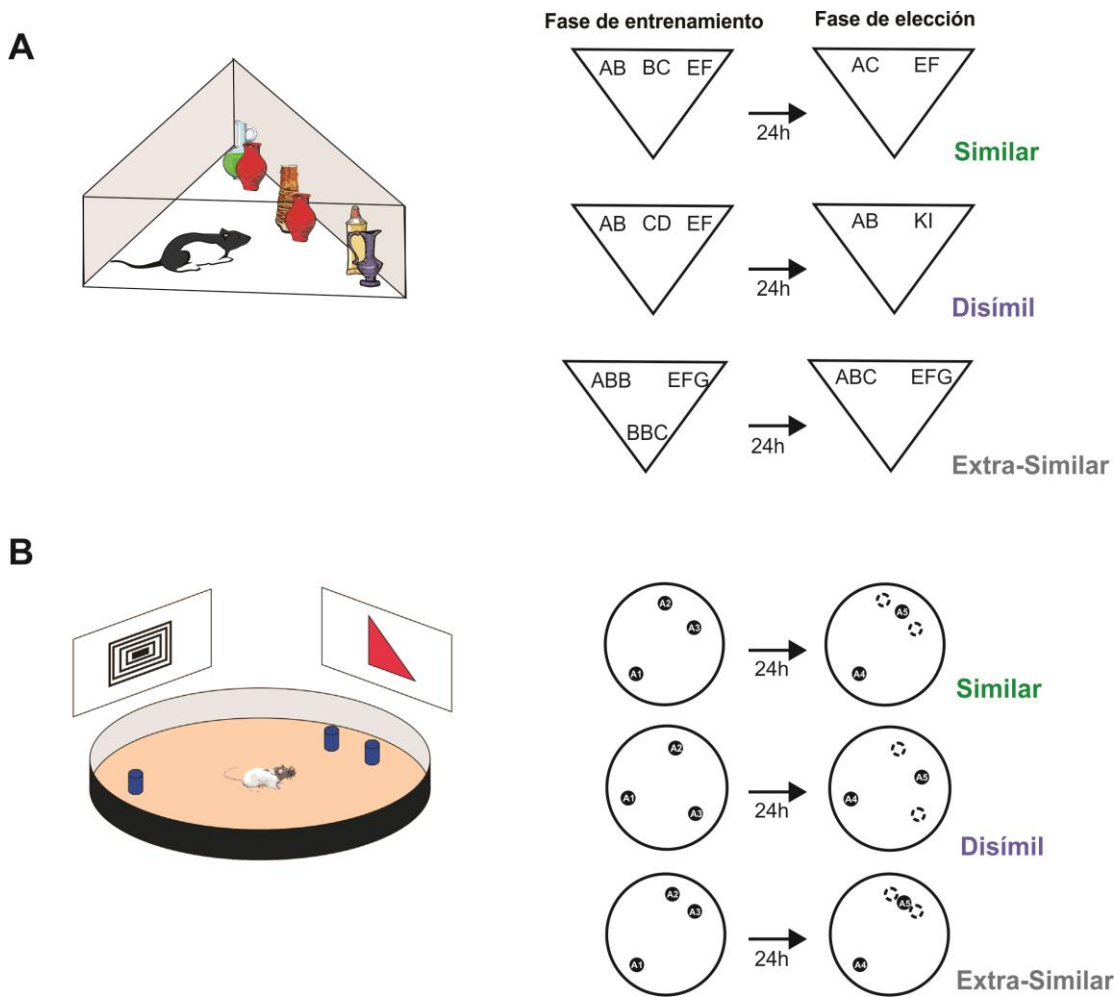


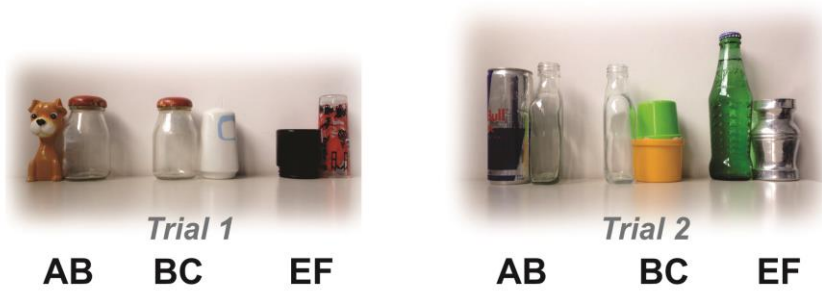
Figura M1. (A) Descripción de la tarea de reconocimiento espontáneo de objetos y a tarea de reconocimiento espontáneo de posición. (Izquierda) Dibujos que representan el contexto y la tarea de reconocimiento espontáneo de objetos (REO). (Derecha) Ilustración esquemática de las tres configuraciones de la tarea REO. (B) (Izquierda) Dibujos animados que representan el aparato y la tarea de reconocimiento espontáneo de posición (REP). (Derecha) Ilustración esquemática de las tres configuraciones de la tarea REP.

Tareas de comportamiento

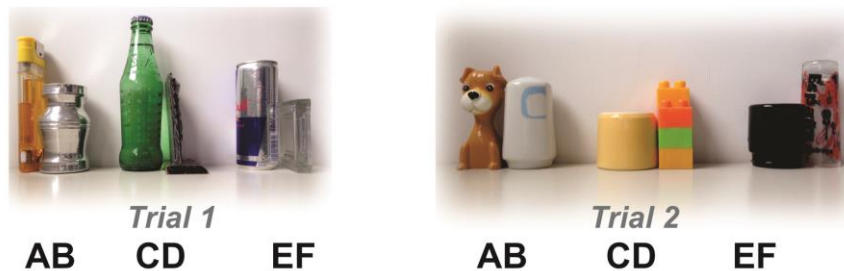
Para la tarea REO (Fig. M1), cada rata fue manipulada durante 1 día y luego se habituaron a la arena por 5 minutos al día durante 3 días antes de la exposición a los objetos (Fig. M1). Después de la habituación las ratas fueron expuestas, durante una fase de entrenamiento de 5 minutos de duración, a tres objetos hechos de dos o tres características dependiendo de la condición (Fig. M2). Para la condición similar, dos de

los objetos compartían una característica (AB y BC) y el tercer objeto estaba compuesto por otras dos características diferentes (EF). Para la condición disímil, los tres objetos estaban hechos de diferentes características (AB, CD y EF). Para la condición extra similar, dos de los objetos compartían dos de tres características (ABB y BBC), y el tercero era completamente diferente ya que no compartía ninguna característica (EFG).

A Similar



B Disímil



C Extra-similar



Figura M2. Objetos representativos para los ensayos 1 y 2 de versiones similares, disímil y extrasimilar de la tarea REO.

La fase de evaluación duró 3 minutos y se llevó a cabo 24 horas después de la finalización de la fase de entrenamiento. En este caso, los animales fueron expuestos a dos objetos, uno novedoso y otro familiar, que variaban en composición según la condición evaluada. Para la condición similar, el objeto novedoso estaba formado por las

dos características no compartidas de los objetos presentados en la fase de muestra (AC) y el objeto familiar era una copia del tercer objeto (EF). Para la condición disímil, el objeto novedoso estaba formado por dos características novedosas (KI) y el objeto familiar era una copia de uno de los objetos presentados durante la fase de muestra (AB, CD o EF). Para la condición extra similar, el nuevo objeto estaba hecho de una nueva combinación de características familiares (ABC) y el objeto familiar era una copia del tercer objeto presentado en la fase de entrenamiento (EFG). La exploración se registró manualmente tanto para la fase de entrenamiento como para la de elección. La lógica detrás de la tarea es que si las ratas fueran capaces de separar los dos objetos similares durante su almacenamiento, sus representaciones deberían ser distintas y resistentes a la confusión; por lo tanto, deberían mostrar preferencia por el objeto nuevo durante la fase de evaluación. Sin embargo, si las representaciones de los dos objetos similares no se separaran suficientemente durante su almacenamiento, la presentación del nuevo objeto activaría una representación familiar en la memoria y, por lo tanto, el objeto novedoso no sería distinguible. Como resultado, las ratas deberían comportarse como si el nuevo objeto fuera familiar. Como se piensa que la separación de patrones ocurre durante las etapas de codificación / consolidación de la formación de memoria, la similitud de los objetos a recordar se varió durante la codificación / consolidación, en lugar de la fase de recuperación de la tarea. A diferencia de otras pruebas de separación de patrones ^{224,244,259}, el uso de una variable continua como medida de rendimiento en esta tarea proporciona datos suficientes en un solo ensayo para permitir manipulaciones en diferentes etapas de la memoria.

Para la tarea REP (Fig. M1), cada rata fue manipulada durante 1 día y luego se habituaron a la arena por 10 minutos al día durante 5 días antes de la exposición a los objetos. Después de la habituación, las ratas se expusieron a tres objetos idénticos A1, A2 y A3, durante una fase de entrenamiento que duró 10 min. Para la REP similar (s-REP), los objetos A2 y A3 se colocaron a 50° de separación (20,5 cm entre ellos) y el objeto A3 a la misma distancia de los otros dos. Para el REP diferente (d-REP), los objetos A1, A2 y A3 eran equidistantes, separados 120° (49 cm entre ellos). Veinticuatro horas después de la fase de entrenamiento, las ratas se expusieron a dos nuevas copias idénticas de los objetos, llamadas A4 y A5, durante 5 minutos. Durante esta fase elección, el objeto A4 se colocó en una ubicación familiar (la misma posición que en la fase de muestra) y el objeto A5 se colocó en una nueva ubicación. Para la tarea s-REP y d-REP,

la ubicación novedosa se definió como una posición exactamente en el medio de aquellas posiciones en las que se ubicaron los objetos A2 y A3 durante la fase de muestra (ver esquemas en la figura M1).

Para la tarea de EA, cada rata fue manipulada durante 1 día y luego se habituaron a la arena circular con todas las claves por 10 minutos al día durante 5 días antes de la exposición a los objetos. Luego de la habituación, en la fase de entrenamiento los animales fueron expuestos durante 10 minutos a un objeto en posiciones pseudoaleatorias en la arena en presencia de las 6 claves.

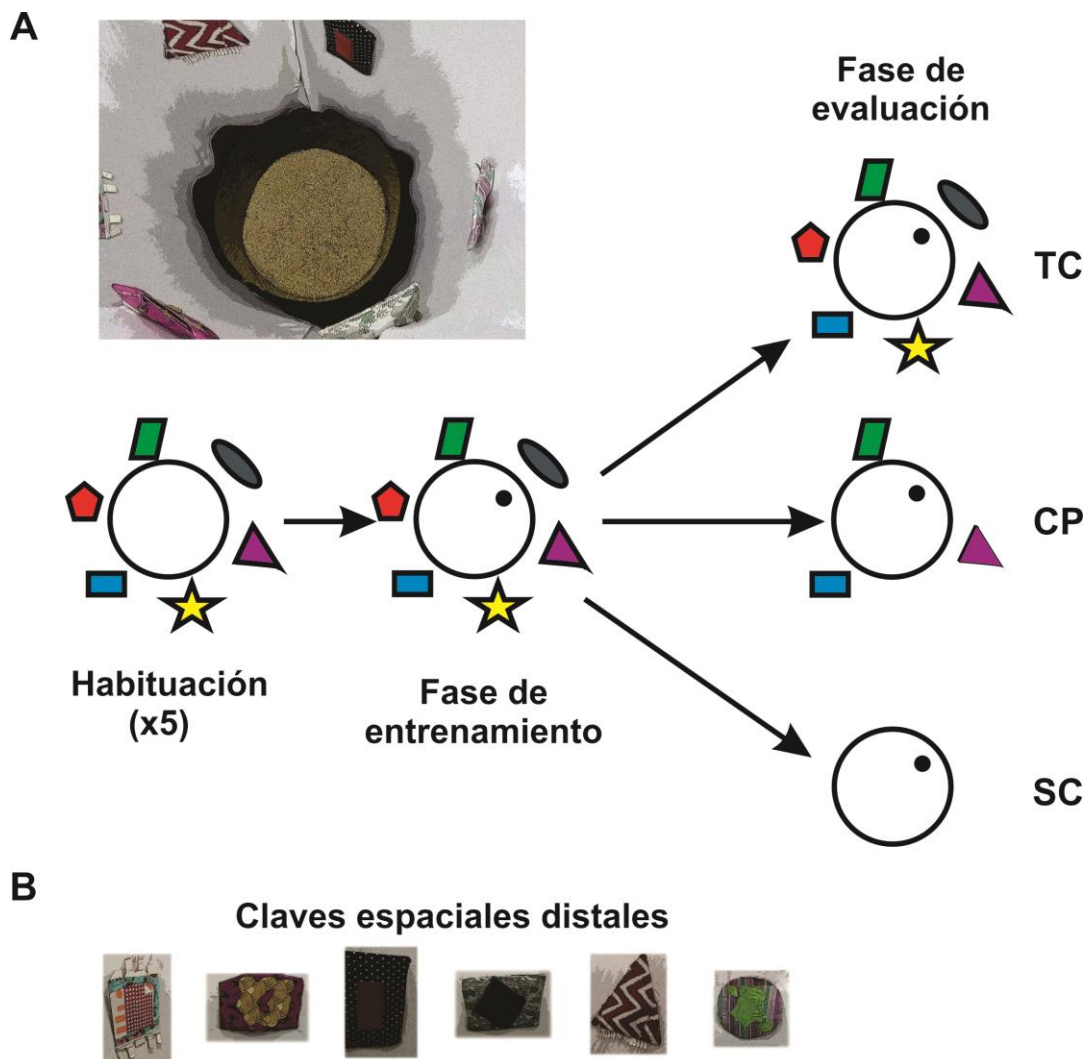


Figura M3. (A) Descripción de la tarea de evocación asociativa. (Arriba) Imagen del contexto utilizado en la tarea de evocación asociativa (EA) donde se observa la arena rodeada de una cortina blanca con claves contextuales. (Abajo) Ilustración esquemática de las tres

configuraciones de la tarea EA. (B) Claves espaciales distales que se colocan sobre la cortina en la arena de la tarea de EA.

Veinticuatro horas después de la fase de entrenamiento, en una fase de evaluación de 10 minutos se les presentó a los animales una copia idéntica del objeto en la misma posición del entrenamiento pero en presencia de un número variable de claves contextuales distales. Para la condición de “todas las claves” (TC) la presentación del objeto ocurrió en un contexto con las 6 claves que estaban presentes en el entrenamiento. En la condición “claves parciales” (CP) la presentación del objeto se dio en presencia de sólo 3 de las claves del contexto, mientras que en la condición de “2 claves parciales” (CP2) se presentaron sólo 2 claves contextuales. Para la condición “sin claves” (SC) se presentó el objeto en ausencia de claves espaciales (ver esquemas Fig. M3).

Para los experimentos de reconsolidación, cada rata fue manipulada durante 1 día y luego se habituaron a la arena circular con todas las claves por 10 minutos al día durante 5 días antes de la exposición a los objetos, y también fueron habituados a la arena triangular (la utilizada para la tarea de REO) durante los últimos 3 días por 5 minutos. Luego, fueron entrenados en la tarea de EA durante 10 minutos y 24 horas más tarde se realizó una sesión de evaluación (Ev1) en la que fueron expuestos a un contexto vacío (en ausencia de objetos) por 10 minutos con un número variable de claves contextuales dependiendo del experimento. Durante una segunda sesión de evaluación (Ev2) 24 horas después de la primera, los animales se expusieron al objeto original (presentado en el entrenamiento) junto a un objeto novedoso en la arena triangular durante 5 minutos. En el caso del experimento de la Fig. 21, los animales fueron entrenados en el contexto TC (en presencia de todas las claves) con un objeto A, y en el contexto SC (en ausencia de claves distales) con un objeto B en el día 1. Estos dos entrenamientos fueron separados por 2 horas, y su orden fue pseudoaleatorio. El día 2 durante la primera evaluación (Ev1), un grupo fue expuesto al contexto TC vacío y otro fue expuesto al SC vacío. El día 3, de la segunda evaluación (Ev2), la memoria de los dos objetos presentados en el día 1 fue evaluada exponiendo al objeto original (ya sea A o B) junto a un objeto novedoso en la arena triangular (B o D) durante 5 minutos.

Diseño experimental y análisis estadístico

En todos los experimentos, se contrabalancearon las inyecciones de fármacos y vehículos o ASO y MSO entre trials, así como las distintas condiciones experimentales.

Para los experimentos de REP y REO, los resultados se expresaron como un índice de discriminación que se calculó como el tiempo que el animal pasó explorando el objeto nuevo (REO) o el objeto en la ubicación novedosa (REP) menos el tiempo explorando el objeto familiar (REO) o el objeto en la ubicación familiar (REP) dividida por el tiempo total de exploración ($(t_{\text{novedoso}} - t_{\text{familiar}}) / t_{\text{total}}$). Para los experimentos de EA, los resultados se presentaron como el porcentaje de exploración en la fase de evaluación respecto a la fase de entrenamiento ($(t_{\text{evaluación}} / t_{\text{entrenamiento}}) * 100$). Para todos los experimentos, se definió la exploración de un objeto cuando la rata que tiene su nariz dirigida al objeto a una distancia de 2 cm o menos, o tocando el objeto con su nariz. Apoyarse sobre el objeto con la cabeza orientada hacia arriba no cuenta como exploración. Escalar o sentarse sobre los objetos no se incluye como exploración, a excepción de que la nariz de la rata se encuentre dirigida al objeto. Para el experimento de EA en que se cuantificaron el número de alzadas o *rearings* (del inglés), se consideraron alzadas cuando el animal se sube a una posición vertical apoyándose ambas patas traseras, ya sea en el aire, apoyándose contra la pared o contra el objeto (pero únicamente cuando su cabeza está orientada hacia arriba, es decir cuando no haya exploración del objeto).

En el Capítulo 1 y 2, se utilizaron pruebas de *t* de muestra única para comparar el índice de discriminación de las distintas condiciones con respecto al valor cero, con el fin de analizar si los animales aprendieron la tarea. En el Capítulo 3, se realizaron pruebas de *t* de muestra única para comparar el valor de porcentaje de exploración con respecto al 100%, considerando valores significativamente distintos de cero o del 100% respectivamente como una medida de memoria. Para el experimento que se muestra en la Figura 1 a la mitad de las ratas se las evaluó primero en la "condición novedosa" o en la condición similar y luego en la "condición familiar" o en la disímil, y la otra mitad se las evaluó primero para las condiciones familiares o disímiles y luego para las novedosas o similares. Se compararon los índices de discriminación dentro del sujeto usando un test de *t* pareado. Para el experimento de la Figura 18, se realizó un primer ensayo en el que un tercio de los animales se evaluaron en la condición TC, un tercio en la CP y un tercio en la SC; un segundo ensayo en que se evaluó la mitad de cada uno de estos tercios en

una de las condiciones restantes y la mitad en la otra, y en el tercer ensayo se las evaluó en la condición remanente. Para los experimentos mostrados en las Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 12, 13, 14C, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 24 y 25 los sujetos experimentales se evaluaron dos veces. En la primera prueba, la mitad de los animales recibió una inyección de ASO/Eme/BDNF/DNQX/AP5 (dependiendo del experimento) y la otra mitad recibió una inyección de MSO o los correspondientes Vehículos de cada droga. En el segundo ensayo, se les inyectó ASO/Eme/BDNF/DNQX/AP5 o MSO/Vehículo según lo que habían recibido en el primer ensayo. Para la fase de entrenamiento, el porcentaje de tiempo que explora cada objeto se comparó utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, con tiempo y objeto como medidas repetidas. Para la fase de evaluación, se compararon las proporciones de discriminación dentro del sujeto usando una test de t pareado. Se usaron diferentes objetos para reproducir las características (A, B, C, etc.) de las mismas condiciones de tarea en las pruebas consecutivas del diseño intrasujeto. Para la Fig. 8B, los grupos BDNF y Veh fueron grupos independientes que sólo fueron evaluados una única vez. Para el experimento en las Figuras 9A, 10C, 11C y 15A, los animales se probaron dos veces, una vez inyectados con Arc-ASO (o AP5, dependiendo del experimento) y BDNF-ASO en el mismo hemisferio y una vez con Arc-ASO (o AP5) y BDNF-ASO en diferentes hemisferios. El MSO Control (o Veh) fue inyectado en el otro hemisferio para cada caso. Se compararon los índices de discriminación dentro del sujeto usando un test de t pareado. Para el experimento de la Figura 8D, los animales fueron evaluados solo una vez, y los índices de discriminación se analizaron usando un test de t o un ANOVA de dos vías seguido de comparaciones post hoc de Sidak. En los experimentos de las Figuras 10F y 11F, cada animal atravesó 3 ensayos en los que cada rata fue entrenada luego de la infusión de Veh/Veh, Veh/BDNF o AP5/Veh, en orden contrabalanceado entre animales. En el experimento de la Figura 15C, los animales fueron evaluados dos veces. Durante el primer ensayo, a la mitad de ellos se les infundió Veh y MSO o ASO, y a la otra mitad BDNF y MSO o ASO; mientras que en el segundo ensayo los animales infundidos con MSO recibieron ASO y los infundidos con ASO recibieron MSO. En la Figura 20B, 21B, y 22B, los animales fueron evaluados en dos oportunidades; en la primer instancia a la mitad de los animales se les infundió Vehículo en Prh y Vehículo o AP5/ANA-12 en CA3/GD, y a la otra mitad se les infundió Emetina en Prh y Vehículo o AP5/ANA-12 en CA3/GD, mientras que en la segunda a los animales que habían recibido Vehículo se les infundió AP5/ANA-12 y viceversa.

Para el caso de la Fig15A y 19B en que los datos no alcanzaron la normalidad se utilizó estadística no paramétrica mediante un Test de Wilcoxon pareado. En el caso de la Fig. 17C se realizó una transformación de tipo X^2 para normalizar los datos. Para la Figura 2B los datos fueron transformados usando una función de $X^{0.5}$. Para la Figura 21B *panel izquierdo* los datos se transformaron usando la función $1/X$.

Histología

Para verificar histológicamente el sitio de infusión, las ratas se anestesiaron mediante inyección IP con 2 ml de Euthatal (Rhône Merieux) y se perfundieron transcárdialmente con solución salina con buffer fosfato (PBS), seguido de formalina neutra al 10%. Los cerebros se eliminaron y se fijaron posteriormente en formalina durante al menos 24 horas antes de sumergirse en una solución de sacarosa al 20% hasta que se hundieron. Secciones de 60 μm se cortaron en un micrótopo de congelación y cada quinta sección se montó en un portaobjetos de vidrio recubierto de gelatina y se tiñó con violeta de cresilo. Los portaobjetos se examinaron con un microscopio óptico para verificar la ubicación de las inyecciones. Para el análisis de la extensión alcanzada por el ODN después de la inyección, las ratas se inyectaron con 2 nmol / μl (0,5 μl / lado) de ODN Arc ASO biotinilado y 2 h más tarde, se anestesiaron y perfundieron transcárdialmente con solución salina al 0,9% seguido de 4% paraformaldehído. Los cerebros se aislaron y se cortaron, y el ASO se detectó mediante tinción con avidina-biotina⁴⁸⁰.

CAPÍTULO 1

Mecanismos moleculares en la corteza perirrinal y giro dentado selectivamente necesarios para la diferenciación en la memoria de trazas de objetos y espaciales

PARTE 1

Mecanismos moleculares en la corteza perirrinal selectivamente necesarios para la discriminación de memorias similares, pero independientes de su persistencia.

Debido a que se sabe que el hipocampo media la memoria espacial en roedores, la mayoría de las tareas usadas para evaluar la separación de patrones han involucrado manipulaciones contextuales o espaciales ^{224,244,247,259,533}. Sin embargo, la separación de patrones podría, en principio, ocurrir durante la codificación de representaciones que no sean espaciales, como por ejemplo las representaciones de objetos ⁵³⁴.

El GD podría actuar como un separador de patrones de dominio general, tanto de memorias espaciales como memorias de objetos. Pero, por otro lado, si pensamos que podría haber separación de patrones en el dominio espacial y en el dominio de los objetos, y que estas dos funciones pueden depender de distintas regiones del cerebro, la Prh podría cumplir un rol en la separación de patrones necesaria para la discriminación de la identidad de objetos similares. En particular, se ha visto que la Prh es crucial para la resolución de tareas donde las características de los objetos son ambiguas y se ha propuesto que cumpliría esta función almacenando representaciones conjuntas únicas de estos elementos que luego pueden usarse para desambiguar objetos similares durante la recuperación de la memoria ^{17,100,113}. Como la corteza perirrinal es esencial para la memoria de reconocimiento de objetos, nosotros hipotetizamos que la separación de patrones no espacial dependerá más fuertemente de esta estructura que del GD. La corteza perirrinal podría actuar como un "separador de patrones", desempeñando un papel similar al GD en el dominio espacial, pero en este caso para las memorias de objetos.

Para estudiar el uso comportamental de representaciones no espaciales diferenciadas en la memoria utilizamos una versión modificada de la tarea de REO (dependiente de Prh) y

manipulamos la similitud de los estímulos (objetos) en la tarea durante la codificación de la información. En la tarea original de reconocimiento espontáneo de objetos (REO) ⁵³⁵⁻⁵³⁷, las ratas se exponen durante una fase de entrenamiento (o muestreo) a dos objetos idénticos colocados dentro de una arena. Después de un intervalo de tiempo variable, se somete a las ratas a una fase de evaluación (o de elección) en la que uno de los objetos es reemplazado por un objeto completamente nuevo. Típicamente, en esta tarea, dado que las ratas tienen una preferencia innata por la novedad, si su memoria está intacta pasan mucho más tiempo explorando el objeto novedoso que el familiar. Nuestra versión modificada de la tarea consiste de una condición similar (s-REO) y una condición disímil (d-REO). Brevemente, la condición similar de la tarea consistió en una fase de entrenamiento en la cual las ratas fueron expuestas a tres objetos: dos de ellos eran similares entre sí (AB y BC) y el tercer objeto era diferente (EF). Por otra parte, en la condición disímil los tres objetos presentados durante el entrenamiento (AB, CD, EF) no comparten ningún elemento (Fig. M1). Esta tarea es análoga a la tarea de REP previamente desarrollada en el laboratorio, que se desarrolló como una prueba para la expresión comportamental de la separación de patrones en el dominio espacial ²⁴⁷. En la tarea de REP, la similitud entre las representaciones espaciales se manipuló variando la distancia entre objetos idénticos. En la tarea análoga utilizada en el presente estudio para evaluar la separación de patrones durante la consolidación de la memoria de objetos, la similitud entre objetos se manipuló variando el número de características compartidas por ellos en la fase de codificación (Figura M1). Como es sabido que cuando los animales utilizan información espacial para resolver la tarea de reconocimiento de objetos es posible encontrar una dependencia hipocampal en la misma, la tarea fue diseñada con una habituación extendida al contexto y se utilizó un contexto de paredes altas para minimizar las posibilidades de que la rata use las claves espaciales distales presentes en el cuarto ^{18,538}.

Resultados

La exploración y preferencia de objetos es impulsada por la novedad en la tarea REO modificada

No hubo diferencias en el porcentaje de tiempo que los animales pasaron explorando los tres objetos durante la fase de “entrenamiento” tanto en la condición similar como en la

disímil (Fig. 1A). Además, la cantidad total de tiempo que las ratas pasaron explorando durante la tarea no difirió entre las condiciones (similar vs. diferente: prueba t pareada, $p = 0.943$). La fase de "evaluación" o de elección se llevó a cabo 24 horas después de la fase de "entrenamiento" y la memoria se evaluó comparando la cantidad de tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo y el objeto familiar. En la condición "similar", el objeto nuevo estaba formado por las características no superpuestas (AC) de los dos objetos similares de la fase entrenamiento (AB y BC) y el objeto familiar era una copia del tercero presentado en la fase de entrenamiento (EF) (Fig. M1). La ubicación del objeto siempre se asignó de manera pseudoaleatoria para disminuir la contribución de algún sesgo para la ubicación dentro de la arena. Las ratas pasaron mucho más tiempo explorando el objeto novedoso que el objeto familiar (Fig. 1B), indicando que podían almacenar representaciones separadas de los objetos similares presentados durante el entrenamiento y así reconocer el nuevo objeto como una configuración novedosa a pesar de estar formado a partir de características familiares. Se obtuvo un resultado similar para la condición disímil en la que un nuevo objeto formado por dos características completamente novedosas (KI) se presentó en la evaluación junto a alguno de los objetos familiares vistos previamente durante la fase de entrenamiento (AB, CD o EF) (Fig. 1B). Como conclusión, estos resultados indican que los animales pudieron desambiguar espontáneamente tanto las representaciones de dos objetos similares vistos 24 h antes de la evaluación, al igual que las de dos objetos disímiles. Sin embargo, existía la posibilidad de que las ratas exploraran más el objeto novedoso durante la fase de evaluación debido a un cambio en el número de objetos de tres en el entrenamiento a dos durante la evaluación de la memoria. Para descartar que la novedad proveniente del cambio en el número de objetos pudiese estar impulsando la exploración preferentemente de uno de ellos, utilizamos una condición familiar en la que presentamos dos objetos familiares (AB o BC, y EF) durante la fase de evaluación y comparamos la exploración entre los mismos (Fig. 1C), y la comparamos con la condición novedosa que utilizamos antes. Mientras que en la condición novedosa el índice de discriminación era diferente de cero, este no fue el caso para la condición familiar (p (fam) = 0.68, $t = 0.43$; p (nov) = 0.016, $t = 3.97$; prueba t de muestra única). No hubo preferencia por ninguno de los dos objetos después de esta manipulación, lo que indica que la novedad del nuevo objeto compuesto fue el principal factor para la exploración en esta tarea, y no el cambio en el número de objetos (Fig. 1D).

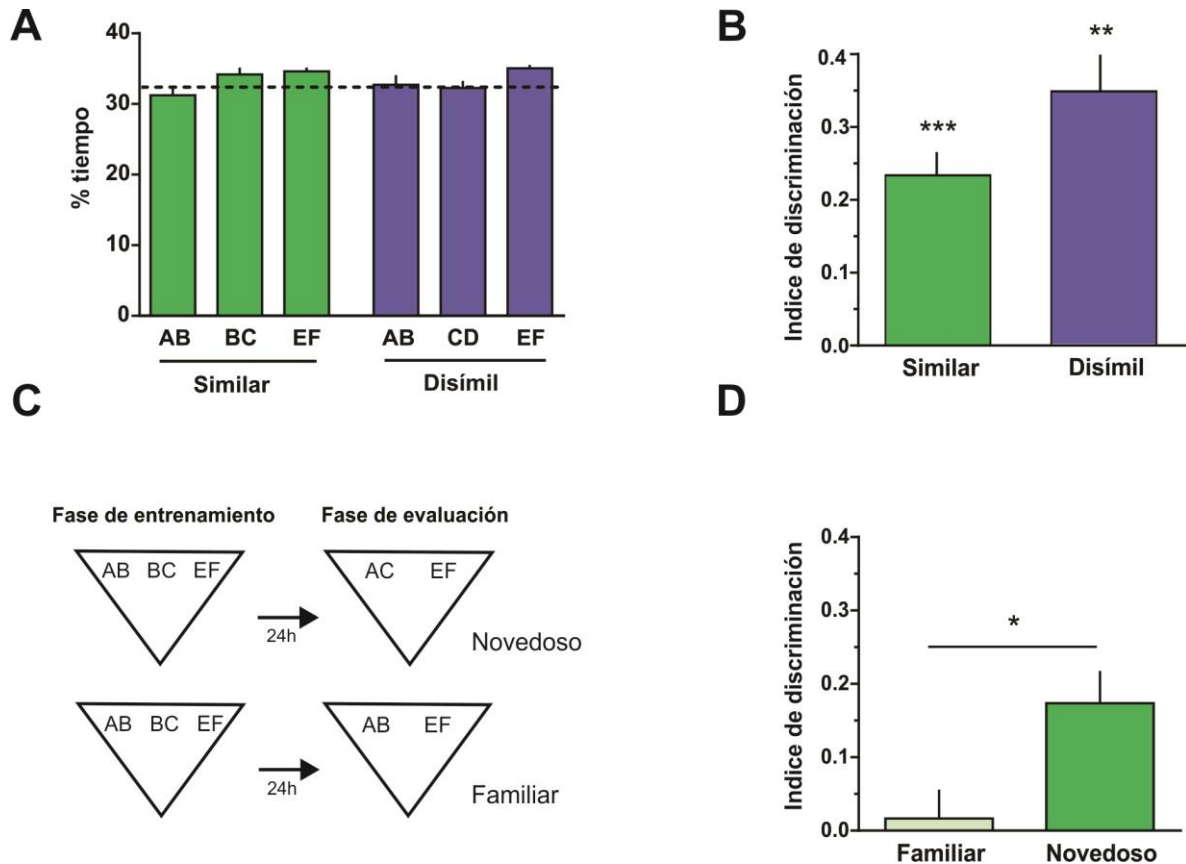


Figura 1. La tarea de reconocimiento espontáneo de objetos. (A) Porcentaje de tiempo dedicado a explorar cada uno de los objetos en la fase de entrenamiento en la condición disímil (verde) y similar (azul). Las ratas pasaron la misma cantidad de tiempo explorando cada uno de los tres objetos durante la fase de entrenamiento. Similar: Medidas repetidas (MR) ANOVA de una vía (% de tiempo), $F_{obj} = 2.829$ $p = 0.125$, $F_{ind} = 1.624e-13$ $p > 0.999$; Disímil: ANOVA de una vía MR (% de tiempo), $F_{obj} = 1.456$ $p = 0.274$, $F_{ind} = 1.014e-13$ $p > 0.999$. (B) Porcentajes de discriminación durante la fase de evaluación, 24 horas después de la fase de entrenamiento, en la condición similar y disímil. Prueba t de muestra única (similar, $t = 8.11$) $p < 0.0001$; prueba t de muestra única (disímil, $t = 4.361$) $p = 0.003$; Prueba t pareada similar vs disímil ($t = 1.521$) $p = 0.172$, $n = 8$. (C) (Izquierda) Tarea de control. (Derecha) Índice de discriminación durante la fase de evaluación para las condiciones novedoso y familiar. Prueba t pareada ($t = 2.861$) $p = 0.0187$, $n = 10$, $d = 0.054$. Los datos se expresan como la media \pm EE * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La síntesis de proteínas, entre ellas BDNF, es necesaria para la discriminación de representaciones de objetos similares en la Prh

Se cree que el almacenamiento a largo plazo de información en el cerebro requiere cambios estructurales en las sinapsis ¹⁴³. Desde hace tiempo se sabe que las formas estables de plasticidad sináptica y memoria dependen de la síntesis de proteínas inducida por la actividad neuronal ^{161,163}. La síntesis de proteínas de novo es necesaria durante la

consolidación de la MLT para estabilizar las conexiones sinápticas previamente reforzadas o los nuevos contactos sinápticos formados durante el aprendizaje ^{275,276}.

BDNF es una neurotrofina esencial para la consolidación de la memoria en diferentes tareas de aprendizaje, incluido el reconocimiento de objetos ²⁵¹. Además, BDNF puede inducir potenciación a largo plazo en el GD ^{449,456}. Anteriormente hemos demostrado que se requiere BDNF para la consolidación de memorias espaciales similares en el GD ²⁴⁷, por lo que planteamos la hipótesis de que también puede participar en este proceso en la Prh para el caso de las memorias de objetos similares. Si la Prh es la ubicación donde se almacenan en forma diferenciada memorias de objetos similares gracias a un proceso de ortogonalización y separación de patrones, inhibir la síntesis de BDNF en la Prh debería afectar el desempeño en las tareas de reconocimiento de objetos únicamente cuando hay una mayor superposición o similitud entre los estímulos, impidiendo la formación de representaciones separadas en la Prh.

Si bien es posible encender y apagar la expresión de un gen utilizando ratones transgénicos ⁴⁰², la resolución temporal de este tipo de técnicas es de días y por lo tanto no es adecuada para estudiar procesos mnemónicos que ocurren en el lapso de horas. Una excelente manera de bloquear funcionalmente la expresión de un gen determinado es mediante métodos que impidan la traducción del ARNm correspondiente. En este sentido, existen dos técnicas para lograr un bloqueo *in vivo* efectivo y transitorio de la traducción: la utilización de oligonucleótidos antisentido (ODNs) o la de ARN de interferencia ^{327,373,539}. Debido a la probada efectividad y alta resolución temporal de los oligonucleótidos antisentido para estudiar los mecanismos de expresión génica asociados a la formación de la memoria ^{172,371}, decidimos utilizar esa técnica en este trabajo. Para evaluar el requerimiento de BDNF en la tarea REO, inyectamos un oligonucleótido antisentido para BDNF (BDNF-ASO) o un oligonucleótido control con la misma composición de bases pero en un orden aleatorio (BDNF-MSO) en la Prh 2 h antes de la fase de entrenamiento para las versiones similar y disímil de la tarea REO (Fig. 2A). Para garantizar primero que el BDNF-ASO estaba bloqueando eficientemente la expresión de BDNF en la Prh, infundimos ASO o MSO 2 h antes de la inyección de ácido kaínico o vehículo en la Prh de animales no entrenados (en inglés, *naive*). El ácido kaínico ha sido previamente utilizado como método para inducir genes tempranos ⁵³². Treinta minutos después de la inyección de ácido kaínico, la Prh se disecó y se procesó para el análisis por Western blot del contenido de proteína BDNF. El BDNF-ASO fue capaz de bloquear el aumento en la expresión de BDNF causado por el ácido kaínico, no así el BDNF-MSO

(Fig. 2B), lo que indica que el ASO estaba efectivamente evitando la expresión de la proteína BDNF.

Los animales inyectados con BDNF-ASO y BDNF-MSO no mostraron diferencias en los niveles de exploración durante la fase de entrenamiento y exploraron los tres objetos por igual (Fig. 2C, recuadro).

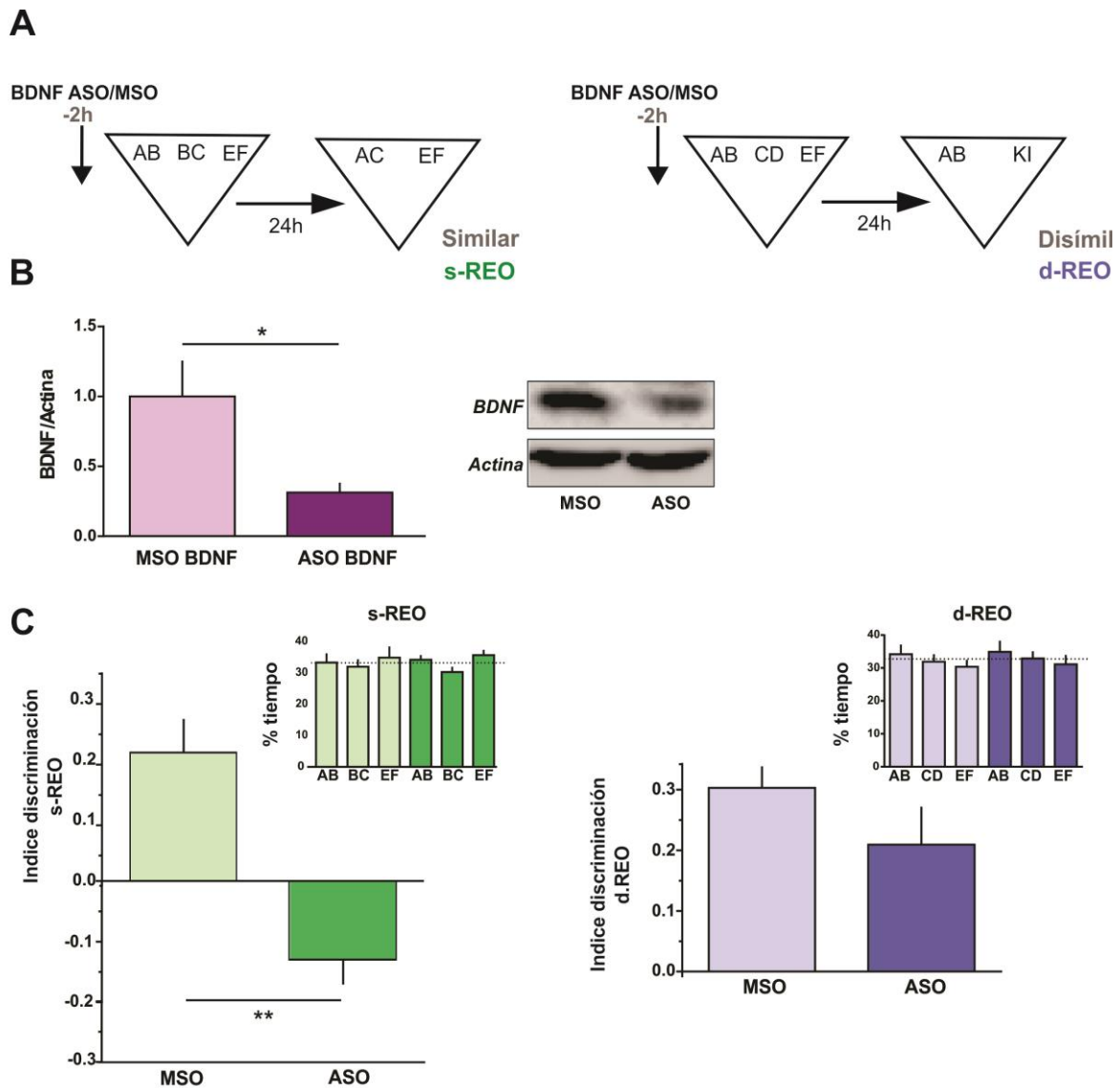


Figura 2. La expresión de BDNF en Prh es necesaria para la consolidación de representaciones mnemónicas de objetos similares, pero no diferentes. (A) Ilustración esquemática de las dos configuraciones de la tarea REO en las que se representa el momento en el que se infundió BDNF ASO o MSO. **(B)** Niveles de proteína BDNF en la Prh de animales no entrenados infundidos con oligonucleótido antisentido de BDNF (BDNF ASO) o sin sentido (BDNF MSO) 2 h antes de la inyección de ácido kaínico en la Prh. Prueba t de no pareada ($t = 2.334$), $p = 0.0322$, $n = 9-10$, $d = 0.377$. **(C)** Efecto de las inyecciones BDNF ASO o BDNF MSO sobre los

*Índices de discriminación para la versión similar (s-REO) y disímil (d-REO) de la tarea. Prueba t pareada ($t = 4.284$) $p = 0.0036$, $n = 8-13$, $d = 2.284$. Recuadro: Porcentaje de tiempo dedicado a explorar cada uno de los objetos en la fase de entrenamiento en s-REO (izquierda) y d-REO (derecha), 2 h después de BDNF ASO (gris) o BDNF MSO (blanco). Similar: ANOVA de dos vías MR; $F = 0.652$ p (fármaco) = 0.440, $F = 0.957$ p (objeto) = 0.403, $F = 0.135$ p (interacción) = 0.875. Disímil: ANOVA de dos vías MR $F = 0.055$ p (droga) = 0.818, $F = 1.388$ p (objeto) = 0.269, $F = 0.001$ p (interacción) = 0.999. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.*

Cuando los animales fueron evaluados 24 h más tarde, encontramos una diferencia significativa en el índice de discriminación entre los animales inyectados con BDNF-ASO y animales inyectados con BDNF-MSO solo para la versión similar de la tarea (Fig. 2C), sin que hubiese diferencias en los tiempos totales de exploración (data no mostrada, prueba t pareada, $p_{\text{similar}} = 0.945$, $p_{\text{disímil}} = 0.523$). Una prueba t de muestra única indica que los animales inyectados con BDNF-MSO aprendieron las tareas s-REO y d-REO ($p_{\text{similar}} = 0.01$, $t = 3.38$; $p_{\text{disímil}} = < 0.0001$, $t = 8.55$), mientras que los animales inyectados con BDNF-ASO solo aprendieron la tarea d-REO ($p_{\text{similar}} = 0.16$, $t = 3.14$; $p_{\text{disímil}} = 0.006$, $t = 3.35$). Además, infundimos BDNF-ASO o MSO en la Prh 2 horas antes de la versión similar de la tarea y evaluamos la memoria de corto plazo a 3 horas luego de la adquisición. No encontramos diferencias significativas entre el ASO y MSO en estas condiciones (test de t pareado, $p = 0.6358$ $t = 0.499$). Ambos grupos mostraron índices de discriminación similares (BDNF MSO ID 0.23 ± 0.03 vs. BDNF ASO ID 0.24 ± 0.03 , $n = 7$). Como la memoria de corto término no fue afectada, esto sugiere que el BDNF es necesario para la consolidación de memorias de objetos similares en la Prh pero no para la adquisición.

A continuación nos preguntamos si era específicamente la expresión de BDNF la que estaba involucrada en el proceso de consolidación de memorias similares, o si otras moléculas también podrían participar en este proceso de almacenamiento y diferenciación de memorias en la Prh. Si el requerimiento de síntesis de proteínas en la Prh se diera independientemente de la similitud de los estímulos, contrariamente a los efectos del bloqueo de BDNF, la inhibición general de la síntesis de proteínas en la Prh debería perjudicar la REO tanto en la condición similar como en la disímil. Para bloquear la síntesis de proteínas, inyectamos el inhibidor de la traducción Emetina en la Prh, 15 minutos antes de la fase de entrenamiento, en las condiciones similar y disímil de la tarea. Cuando se evaluó la memoria 24 h después, encontramos un déficit para el grupo inyectado con Emetina solo en la condición similar (Fig 3B, panel izquierdo). No se observó deterioro de la memoria en los animales inyectados con Emetina cuando se los evaluó en la condición disímil (Fig. 3B, panel derecho). Un análisis de test de t para

muestra única indicó que los animales inyectados con Vehículo podían aprender tanto el s-REO como el d-REO ($p_{\text{similar}} = 0.001$, $t = 4.75$; $p < 0.0001$, $t = 6.67$), mientras que los animales inyectados con Emetina solo pudieron resolver la versión disímil de la tarea ($p_{\text{similar}} = 0.16$, $t = 1.5$; $p_{\text{disímil}} = 0.01$, $t = 3.22$). Estos resultados sugieren que la síntesis de proteínas en la Prh es necesaria para la consolidación de memorias similares, pero no de memorias disímiles, y que BDNF participa en un mecanismo general de desambiguación de recuerdos de objetos en la Prh que es dependiente de síntesis de proteínas.

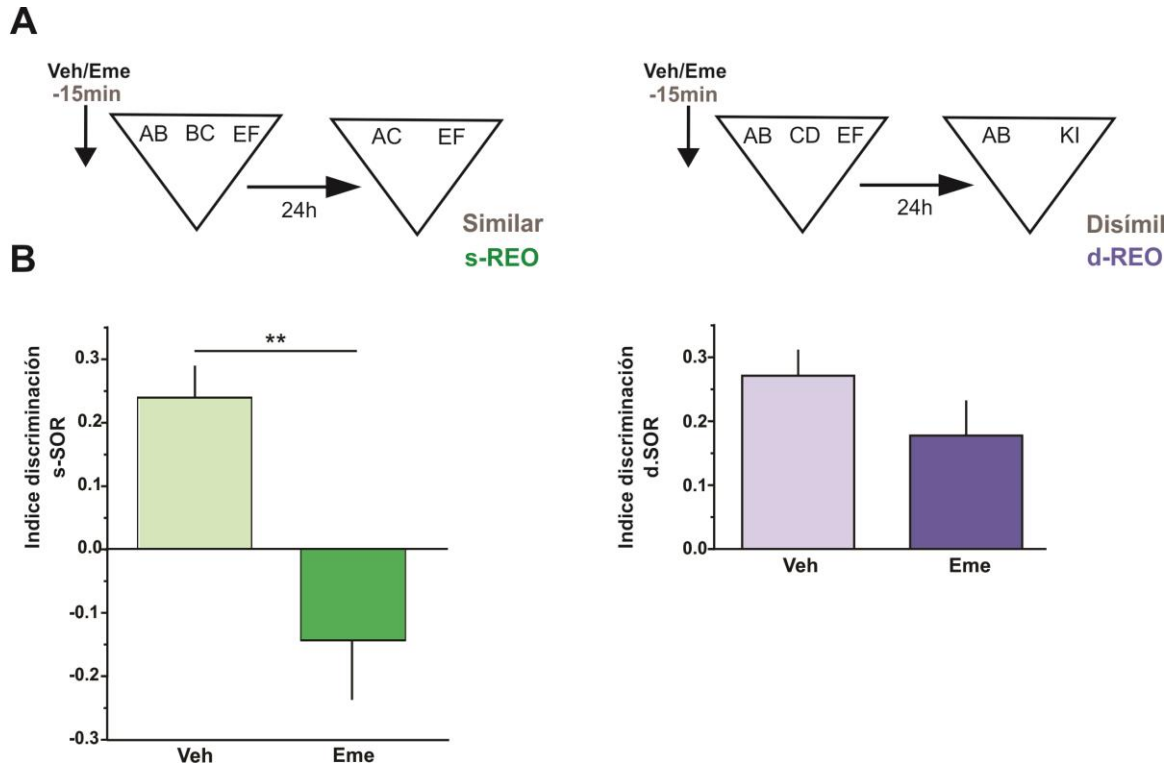


Figura 3. La síntesis de proteínas en Prh es necesaria para la consolidación de representaciones mnemónicas de objetos similares, pero no diferentes. (A) La inyección de Emetina en la Prh 15 minutos antes de la fase de entrenamiento afectó el desempeño en la tarea s-REO durante la fase de elección 24 h más tarde en relación con las ratas inyectadas con vehículo (izquierda), mientras que la Emetina no tuvo efecto en la versión d-REO de la tarea (derecha). Prueba *t* pareada (s-REO, $t = 3.540$) $p = 0.0076$, $n = 9$, $d = 1.698$; prueba *t* pareada (d-REO, $t = 1.284$) $p = 0.231$, $n = 10$. Los datos se expresan como la media \pm EE; ** $p < 0.01$.

La expresión de Arc / Arg3.1 es necesaria para la discriminación de memorias de objetos similares en la Prh

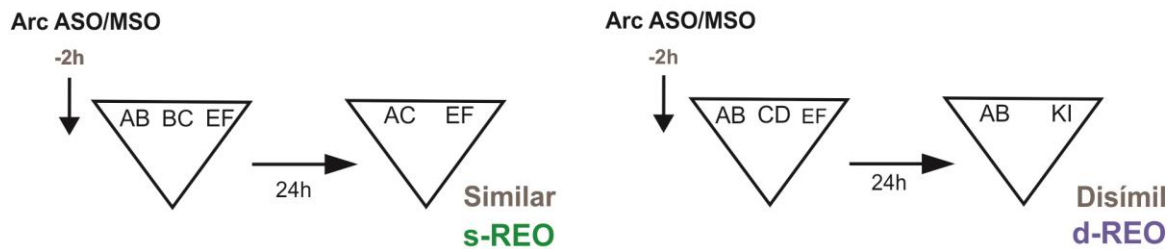
Luego decidimos buscar un potencial efector de BDNF en la Prh. BDNF es capaz de inducir la expresión del IEG Arc, y además, la potenciación a largo plazo inducida por BDNF en el GD depende de la síntesis de Arc ^{449,453,458}. Por lo tanto, hipotetizamos que la

expresión de Arc podría ser inducida por BDNF en la Prh durante la consolidación de memorias de objetos similares. La mayoría de los trabajos se han centrado en el estudio de Arc en regiones cerebrales como el hipocampo y la amígdala, y no hay información con respecto al papel de Arc en el reconocimiento de objetos en la Prh o específicamente en la separación de patrones. Enfocamos este conjunto de experimentos en la función de la proteína Arc en la Prh durante el almacenamiento y desambiguación de las representaciones de objetos. Como con BDNF, la expresión de Arc puede bloquearse eficazmente mediante la aplicación de oligonucleótidos antisentido que se unen específicamente al ARNm de Arc ^{449,529,530,532}. Infundimos Arc-ASO o un oligonucleótido control (Arc-MSO) en la Prh 2 h antes de la fase de entrenamiento y evaluamos a los animales 24 h más tarde (Fig. 4A). La infusión de los ODN no afectó los tiempos totales de exploración durante la fase de entrenamiento (data no mostrada; ASO vs MSO, prueba t pareada, $p_{\text{similar}} = 0.585$; $p_{\text{disímil}} = 0.919$), y las ratas pasaron el mismo tiempo explorando cada uno de los tres objetos (Fig. 4B). Sin embargo, la infusión de Arc-ASO deterioró la memoria de reconocimiento de objetos respecto a animales infundidos con Arc-MSO para la condición similar, pero no para la disímil de la tarea (Fig. 4C). Pruebas t de muestra única indican que los animales inyectados con Arc-MSO pudieron aprender tanto el s-REO como el d-REO ($p_{\text{similar}} < 0.0001$, $t = 7.14$; $p_{\text{disímil}} < 0.0001$, $t = 11.8$), mientras que los animales inyectados con Arc-ASO solo la versión disímil de la tarea ($p_{\text{similar}} = 0.13$, $t = 1.64$; $p_{\text{disímil}} < 0.0001$, $t = 10.8$).

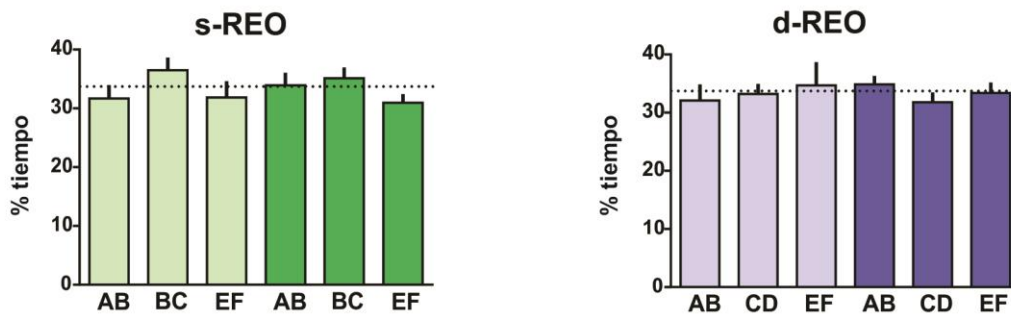
Por otra parte, no se observó deterioro de la memoria de animales infundidos con Arc-ASO 2 horas antes de la fase de entrenamiento cuando se los evaluó después de 3 h (Fig. 5A). Pruebas t de muestra única indican que tanto los animales inyectados con Arc-MSO como Arc-ASO pudieron recordar el objeto novedoso del s-REO a las 3 h (MSO similar = 0.04, $t = 2.8$; ASO similar = 0.02, $t = 3.3$). No hubo diferencias en los tiempos totales de exploración entre los animales inyectados con ASO y MSO durante la fase de evaluación (prueba t pareada, $p_{\text{similar}} = 0.206$; $p_{\text{disímil}} = 0.875$). Esto demuestra que la adquisición inicial de la tarea no se vio afectada por el bloqueo de Arc ya que la MCT no se vio afectada. Además estos resultados evidencian que el efecto de esta manipulación depende del intervalo de tiempo entre el "entrenamiento" y la "evaluación", lo que sugiere que el oligonucleótido está actuando sobre la fase de consolidación. Para verificar que el Arc-ASO estaba bloqueando eficientemente la expresión de Arc en la Prh, infundimos ASO o MSO 2 h antes de la inyección de ácido kaínico o vehículo en la Prh de animales

no entrenados. Treinta minutos después de la inyección de ácido kaínico, la Prh se diseccó y se procesó para el análisis por Western blot del contenido de proteína Arc en Prh. El oligonucleótido Arc-ASO fue capaz de bloquear el aumento en la expresión de Arc causada por el ácido kaínico, y no así el Arc-MSO (Fig. 5B), lo que indica que el ODN bloqueó efectivamente la expresión de Arc.

A



B



C

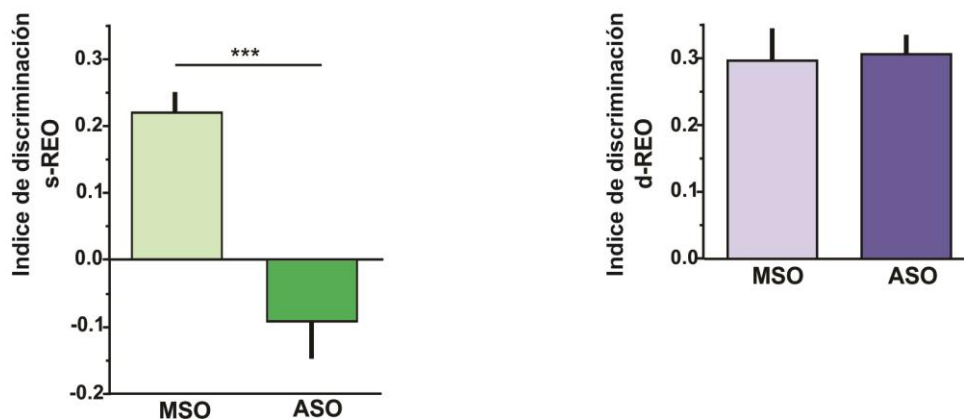


Figura 4. La expresión de Arc en la Prh es necesaria para la consolidación de representaciones de memoria de objetos similares, pero no diferentes. (A) Ilustración esquemática de las dos configuraciones de la tarea REO mostrando el momento en el que se infunde el Arc ASO. (B) Porcentaje de tiempo dedicado a explorar cada uno de los objetos en la fase de entrenamiento, 2 h después de la infusión de Arc ASO (gris) o MSO (blanco). Similar: ANOVA de dos vías MR; $F = 0.026$ p (droga) = 0.875, $F = 1.561$ p (objeto) = 0.240, $F = 0.256$ p (interacción) = 0.777. Disímil: ANOVA de dos vías MR; $F = 4615$ p (droga) = 0.522, $F = 0.1971$ p

(objeto) = 0.824, $F = 0.2516$ p (interacción) = 0.782. **(C)** Efecto de la infusión previa al entrenamiento de Arc-ASO o Arc-MSO en la Prh en la fase de evaluación a las 24 h en la versión s-REO (izquierda) o d-REO (derecha) de la tarea. Prueba t pareada (s-REO, $t = 5.762$) $p = 0.0002$, $n = 11$, $d = 7.599$; prueba t pareada (d-REO, $t = 0,421$) $p = 0,683$, $n = 11$. Los datos se expresan como la media \pm EE; *** $p < 0.001$.

Estos resultados no pueden explicarse por un daño inespecífico a la Prh por el oligonucleótido Arc-ASO, porque no se observaron cambios en el desempeño de los animales después de la administración de Arc-MSO, y la tinción con safranina no reveló ninguna lesión en el sitio de la infusión (Fig. 5C). Además, el diseño experimental es intrasujeto, por lo que cada rata fue inyectada con ASO y MSO. Por lo tanto, es muy poco probable que el ASO y MSO tuvieran efectos tóxicos diferenciales que fueran de algún modo reversibles. Por otra parte, evaluamos la propagación del ODN 2 h después de la inyección de Arc-ASO biotinilado en la Prh. Encontramos poca propagación fuera de Prh, lo que indica que el déficit observado no fue causado por el bloqueo de la expresión de Arc en otras estructuras (Fig. 5C).

La expresión de Arc en la Prh no es necesaria para la discriminación dependiente de GD de representaciones espaciales similares

Otra interpretación de estos resultados podría ser que Arc se requiere en la Prh para la discriminación de información similar de cualquier tipo, y que el déficit es evidente o no según la dificultad de la tarea. Si este fuera el caso, la desambiguación de información similar, independientemente del tipo de estímulo involucrado, también debería verse afectada por la infusión de Arc-ASO en la Prh. Para evaluar esta posibilidad, sometimos a los animales a una tarea de discriminación espacial espontánea que es particularmente sensible a las manipulaciones del GD^{247,540} (Fig. 5D). Al igual que con nuestra versión del REO, la tarea de reconocimiento de localización espontánea (REP) puede ejecutarse en dos condiciones diferentes, la configuración similar (s-REP) y la disímil (d-REP) (Fig. 5D, Fig. M1). La similitud de las posiciones se puede manipular variando la distancia entre los objetos dentro de una arena circular rodeada de claves espaciales distales. La s-REP, pero no la d-REP es sensible a las manipulaciones del GD como el bloqueo de BDNF²⁴⁷ o de la neurogénesis adulta^{540,541}. La infusión de Arc-ASO en Prh 2 h antes de la fase de entrenamiento no produjo ningún déficit observable en la tarea de REP para ninguna de las condiciones (Fig. 5E). Las pruebas t de muestra única indican que los animales

inyectados con Arc-MSO y Arc-ASO pudieron aprender la tarea s-REP y d-REP (MSO $p_{\text{similar}} = 0.006$, $t = 3.86$; ASO $p_{\text{similar}} = 0.007$, $t = 3.76$; MSO $p_{\text{disímil}} = 0.002$, $t = 4.73$; ASO $p_{\text{disímil}} = 0.04$, $t = 2.56$). Estos resultados demuestran que la desambiguación de la información espacial similar no requiere de Arc en la Prh, evidenciando que el déficit inducido por el Arc-ASO en la Prh es específico para las memorias en la categoría de objetos.

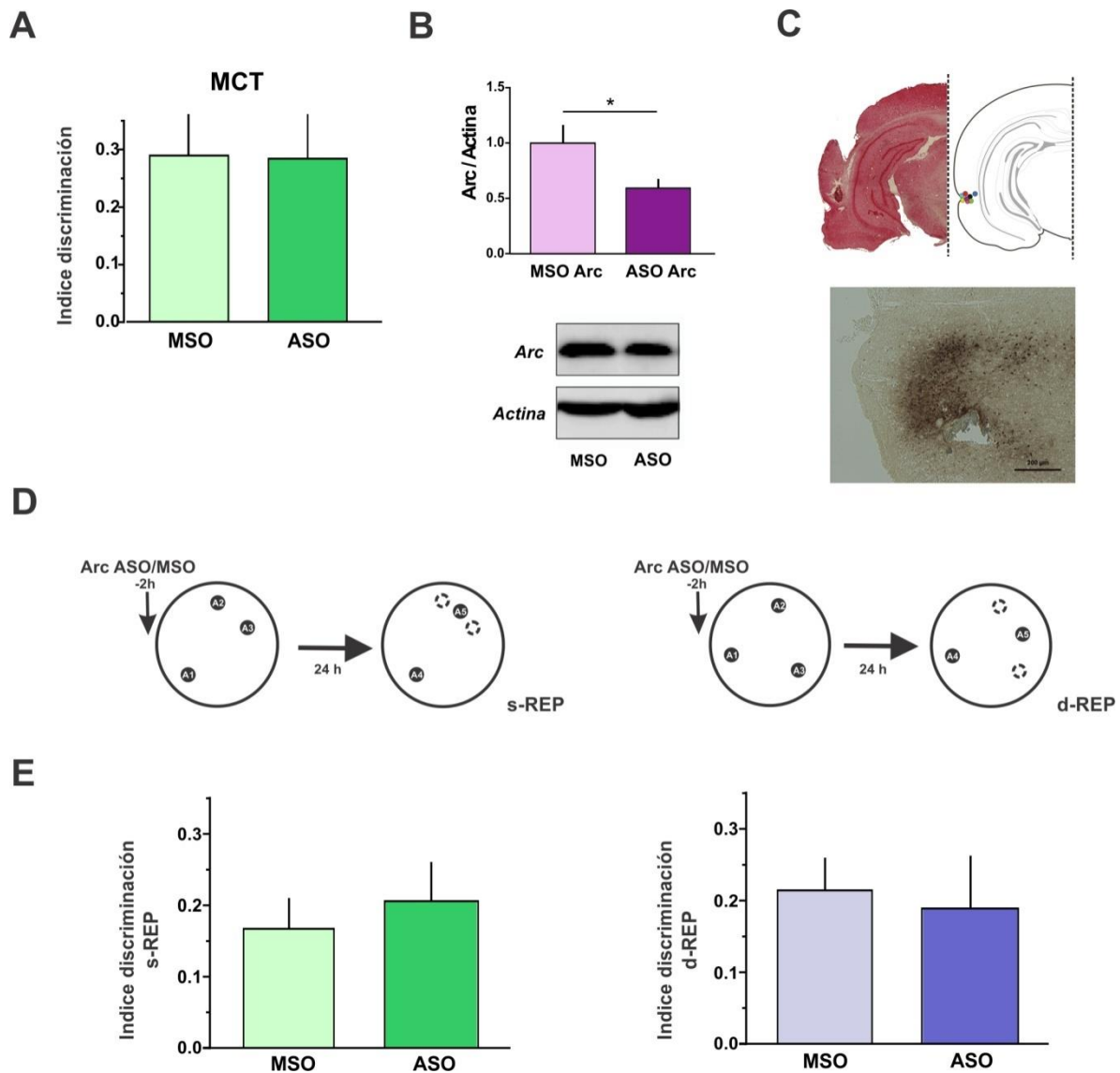


Figura 5. La expresión del Arc en la Prh no es necesaria para la discriminación de representaciones espaciales similares o para la memoria de corto plazo. (A) Prueba de memoria de corto plazo después de la inyección de Arc ASO o MSO 2 h antes del s-REO evaluada 3 horas después. Prueba *t* pareada $p = 0.974$, $t = 0.0343$, $n = 6$. **(B)** Los niveles de proteína Arc en la Prh de animales no entrenados infundidos con Arc ASO o MSO 2 h antes de la inyección de ácido kaínico en la Prh. Prueba *t* no pareada $p = 0.046$, $t = 2.317$, $n = 5-6$, $d = 1.644$. **(C)** (Panel superior) Sección coronal que muestra la trayectoria de la cánula e indica los sitios de infusión

representativos en la Prh. (Panel inferior) *Dispersión representativa del ODN Arc ASO biotinilado en la Prh 2 h después de la inyección de 2 nmol. (D) Representación esquemática de la configuración similar (s-REP, izquierda) y configuración disímil de la tarea de reconocimiento espontáneo de posición (d-REP, derecha) que muestra el tiempo de infusión de Arc ASO o MSO. (E)(Panel superior) Efecto de la infusión de Arc ASO o Arc MSO en la Prh en la tarea REP evaluada a las 24 horas. Prueba t pareada (s-REP, $t = 0.521$) $p = 0.618$; prueba t pareada (d-REP, $t = 0.713$) $p = 0.499$, $n = 8$. (Panel inferior) Efecto de la infusión de Arc ASO o Arc MSO en el GD en la tarea REP. Prueba t pareada (s-REP, $t = 3.351$) $p = 0.007$; prueba t pareada (d-REP, $t = 0.7193$) $p = 0.492$, $n = 9-11$. Datos expresados como la media \pm EE; * $p < 0.05$.*

La expresión de Arc es necesaria para la desambiguación de memorias de objetos en la Prh solo en una ventana temporal restringida

Estudios anteriores observaron que los mecanismos plásticos disparados durante el período de consolidación de la memoria son claves para el mantenimiento de representaciones similares espaciales en forma diferenciada en el GD²⁴⁷, y los resultados anteriores parecen sugerir un rol de proteínas asociadas a plasticidad como BDNF y Arc en la consolidación de memorias de objetos diferenciadas en Prh.

Una característica fundamental de la consolidación de la memoria es que es un proceso restringido en el tiempo, en el cual los agentes amnésicos solo son efectivos durante un intervalo de tiempo limitado^{83,163}. Para los siguientes experimentos decidimos evaluar si el requerimiento de expresión de Arc forma parte de ese período de tiempo luego de la experiencia en que la activación de una serie de procesos celulares y moleculares es necesaria para la estabilización de esta traza del objeto, que probablemente se encuentra codificada dentro de la Prh, en el tiempo. Teniendo esto en cuenta, decidimos estudiar la ventana temporal durante la cual interferir con estos procesos en la Prh perjudica la diferenciación y consolidación de las trazas de objetos similares. Para probar si el requerimiento de Arc para MLT de la condición similar del REO se limita a las primeras horas después de la fase de entrenamiento, el oligonucleótido Arc-ASO se inyectó en la Prh inmediatamente o 3 h después de la fase de entrenamiento y las ratas fueron evaluadas 24 h después de la adquisición (Fig. 6A). Encontramos un efecto significativo de Arc-ASO, en comparación con el Arc-MSO cuando la inyección se realizó inmediatamente después de la fase de entrenamiento, pero solo para la condición similar (Fig. 6B). Las pruebas t de muestra única indicaron que los animales inyectados con MSO pudieron aprender tanto la condición s-REO como la d-REO ($p_{\text{similar}} = 0.0001$, $t = 6.2$; $p_{\text{disímil}} = 0.0049$, $t = 4.04$), mientras que los animales inyectados con ASO solo pudieron resolver

la versión d-REO de la tarea ($p_{\text{similar}} = 0.43$, $t = 0.81$; $p_{\text{disímil}} < 0.0001$, $t = 9.1$). No observamos ningún deterioro de la memoria en el REO similar cuando el Arc-ASO se inyectó en la Prh 3 h después de la fase de entrenamiento (Fig. 6B, panel inferior), lo que indica que el efecto de Arc-ASO es temporalmente restringido. La inyección de Arc-ASO no modificó los tiempos totales de exploración en comparación con el Arc-MSO (prueba t pareada, $p_{\text{similar}} = 0,837$; $p_{\text{disímil}} = 0,654$). Además, las pruebas t de muestra única indicaron que tanto los animales inyectados con Arc-MSO como Arc-ASO pudieron aprender el s-REO (MSO_{similar} $p = 0.009$, $t = 3.75$; ASO_{similar} $p = 0.005$, $t = 4.26$).

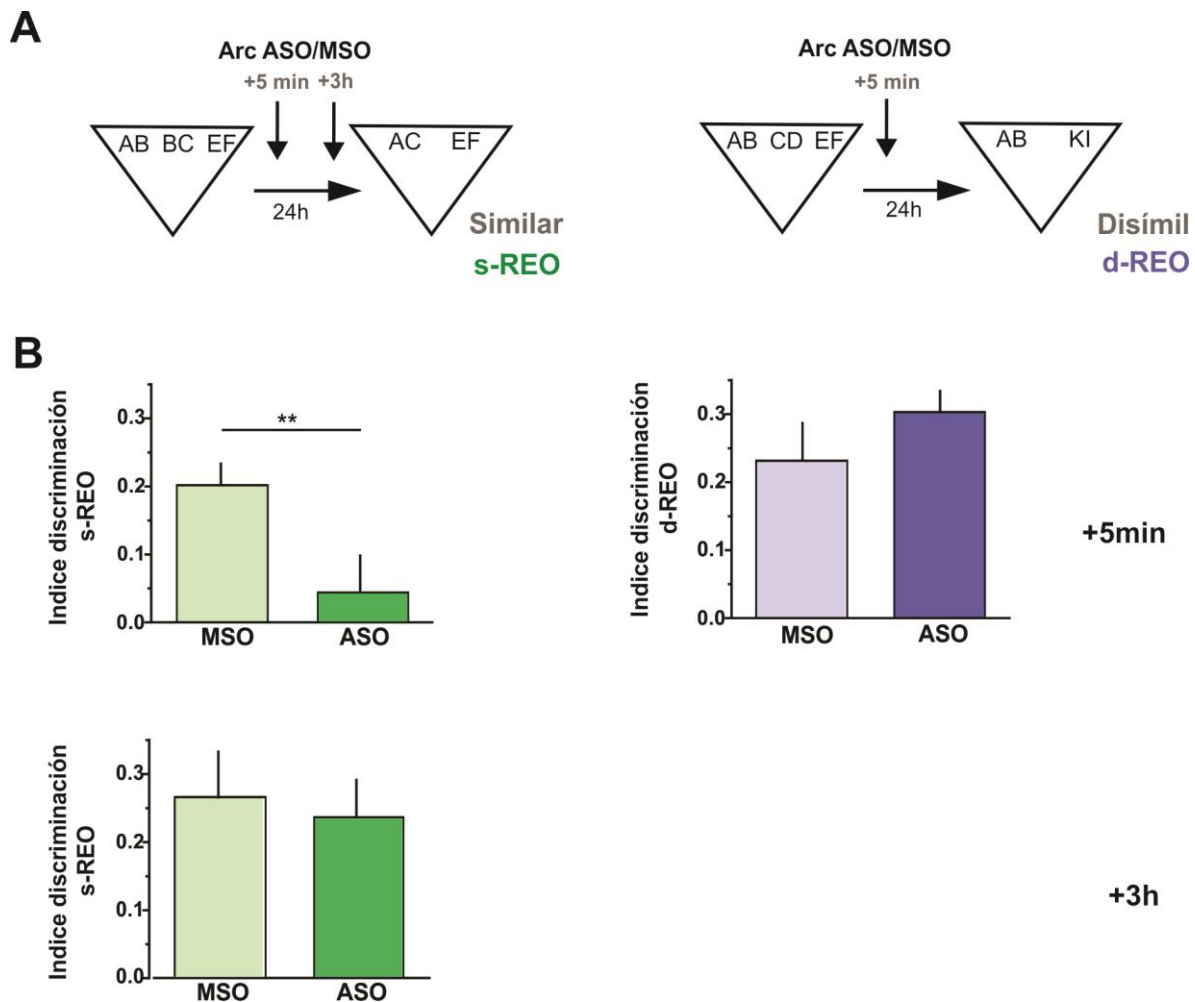


Figura 6. La expresión de Arc en la Prh se requiere en una ventana temporal restringida para la consolidación de representaciones de objetos similares en la memoria. (A) Ilustración esquemática de las configuraciones de la versión similar (s-REO, izquierda) o disímil (d-REO derecha) de la tarea que representan los tiempos en los que se infundió Arc MSO o ASO. (B) Efecto de la inyección de Arc ASO o Arc MSO en la Prh 5 min o 3 h después de la fase de entrenamiento en la versión s-REO (izquierda) o la d-REO (derecha) de la tarea evaluada en una fase de elección 24 h después. Prueba t pareada (similar 0h, $t = 2.274$) $p = 0.046$, $n = 11$, $d =$

1.611; prueba *t* pareada (disímil 0 h, $t = 0,999$) $p = 0,351$, $n = 8$; prueba *t* pareada (similar 3h, $t = 0.459$) $p = 0.663$, $n = 7$. Los datos se expresan como la media \pm EE; ** $p < 0.01$.

La expresión de Arc en la Prh aumenta frente a la presentación de objetos similares

La información que arrojan estos experimentos proporciona evidencia convincente de que Arc en la Prh es parte de los mecanismos moleculares subyacentes a la desambiguación de memorias de objetos similares. Además, estos hallazgos aíslan la acción de Arc a la fase de consolidación de la memoria específicamente. De particular interés para esta conclusión es el descubrimiento de que las inyecciones posteriores al entrenamiento, es decir realizadas después de la codificación inicial de los objetos a recordar, interrumpen la memoria solo en el REO similar pero no en el REO disímil. Esto plantea la pregunta de si Arc se expresa por igual en ambas condiciones, pero solo se necesita en la primera, o si Arc se expresa de acuerdo a la necesidad del sistema, es decir, espontáneamente en respuesta al encuentro de objetos similares, cuyas representaciones debe separarse antes de su almacenamiento en la memoria. Nuestro laboratorio ha visto previamente que BDNF se expresa de esta última manera en el GD después de la exposición a posiciones similares²⁴⁷.

Para evaluar esta posibilidad, expusimos ratas a dos objetos similares o dos objetos diferentes dentro de la arena de entrenamiento y un grupo de control a la arena vacía (Fig. 7A). Una hora después de la exposición, las ratas se sacrificaron y una muestra enriquecida en Prh se disecó y se homogeneizó para el análisis por Western blot del contenido de proteína Arc en la estructura. No hubo diferencias en los tiempos totales de exploración entre grupos, y las ratas pasaron la misma cantidad de tiempo explorando cada objeto tanto en la condición similar como en la disímil (ANOVA bidireccional (% tiempo) $p_{\text{posición}} = 0.943$, $p_{\text{condición}} = 0.673$, $p_{\text{interacción}} = 0.591$; prueba *t* (tiempo total) $p = 0.943$) (Fig. 7B). La inmunotinción reveló un aumento del doble en la expresión de Arc en la Prh en los animales expuestos a dos objetos similares en comparación con los expuestos a dos objetos diferentes o al contexto vacío (Fig. 7C). Estos hallazgos proporcionan evidencias de que Arc se expresa diferencialmente en la Prh de acuerdo a la necesidad del sistema, es decir que los niveles de Arc aumentan de forma espontánea únicamente cuando es preciso separar las representaciones de objetos similares pero no si estos son claramente distinguibles.

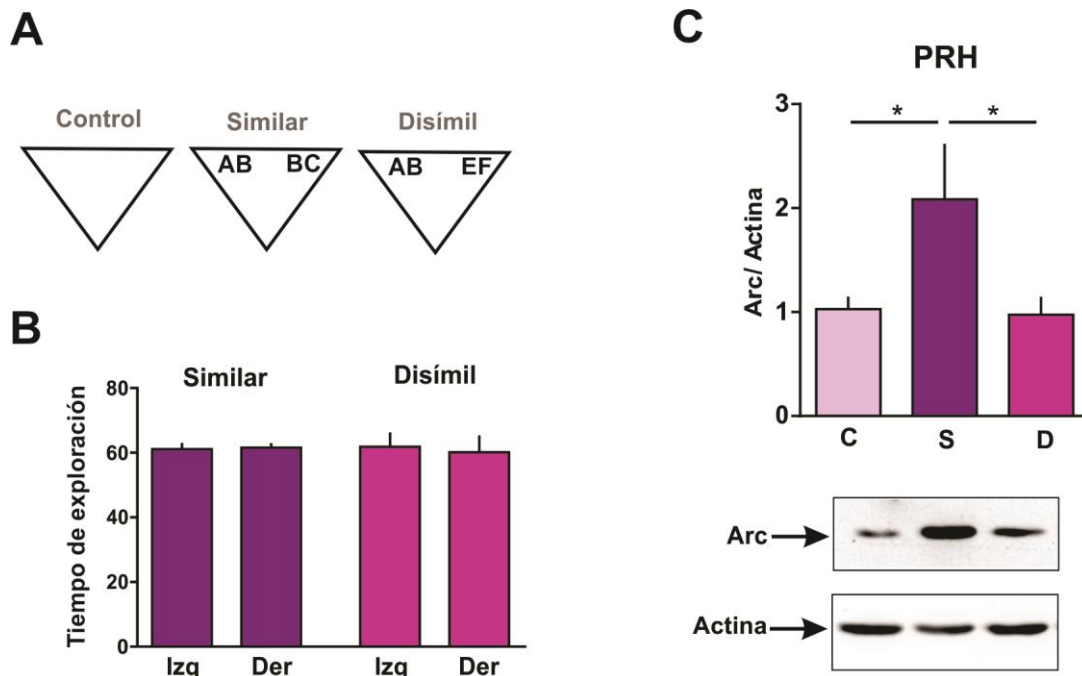


Figura 7. La exploración de objetos similares, pero no de objetos diferentes, se asocia con un aumento en los niveles de proteína de Arc en la Prh. (A) Representaciones esquemáticas de las configuraciones de objetos en ambas condiciones. (B) Porcentaje de exploración de los objetos utilizados durante la tarea similar y disímil, teniendo en cuenta la ubicación (izquierda o derecha) del objeto durante la tarea. (C) Los niveles de proteína de Arc en la Prh después de la exposición a los objetos. ANOVA de una vía, $F = 3.818$ $p = 0.038$, $n = 8$. Control vs Similar: $d = 2.407$; Disímil vs Similar: $d = 2.073$. Los datos se expresan como la media \pm SEM; * $p < 0.05$.

BDNF mejora la desambiguación de memorias de objetos superpuestos en Prh a través de la expresión de Arc

Luego nos preguntamos si BDNF y la expresión de Arc en Prh durante la consolidación de memorias similares eran parte de la misma vía o de vías diferentes. Como se ha demostrado que BDNF es capaz de mejorar la consolidación de la memoria cuando se lo infunde exógenamente ^{247,351,542}, pensamos que podría también mejorar la diferenciación de las memorias similares si era infundido durante la consolidación. Y razonamos que este supuesto efecto potenciador debería evitarse si se bloqueaba la expresión del Arc. Para poder ver la mejora de la memoria, redujimos el rendimiento de los animales control a niveles aleatorios haciendo que la discriminación sea más difícil. Por lo tanto, modificamos la tarea de forma tal que los objetos usados durante la fase de entrenamiento fueran aún más similares entre sí, y llamamos a esta versión de la tarea la versión extra-similar del REO (xs-REO). En esta versión, utilizamos objetos hechos de

tres características en lugar de dos, dos de estos objetos compartían dos de las características (ABB y BBC) y el tercer objeto era completamente diferente de los otros dos (EFG) (Fig. 8A, ver también la Fig. M1). Evaluamos la memoria 24 h después de la fase de entrenamiento usando un objeto nuevo hecho de la característica repetida y las otras dos características no compartidas (ABC) y un objeto familiar (EFG) (Fig. 8B). No hubo diferencias en la exploración de los tres objetos durante la fase de entrenamiento, lo que indica que hacer dos objetos aún más similares no afecta la percepción visual o táctil de ellos y que los animales continúan siendo capaces de discriminar los objetos ABB y BBC perceptualmente (Fig 8A, panel inferior). Si esto no fuera así, se esperaría ver que los animales distribuyan su tiempo en forma desigual tal que pasen la mitad de su tiempo explorando el objeto más distinguible, y distribuyan la mitad del tiempo restante en explorar cada uno de los otros dos objetos no distinguibles ¹¹². A pesar de que la percepción de los objetos no pareció verse afectada, el índice de discriminación para las ratas control inyectadas con solución salina no fue significativamente distinto de cero, lo que indica que no pudieron almacenar las representaciones de los dos objetos similares como diferentes (Fig. 8B, $p_{\text{xsVeh}} = 0.08$, $t = 2.02$, prueba t de muestra única). En este contexto, la inyección de BDNF recombinante humano (BDNFrh) en Prh 5 minutos después de la fase de entrenamiento mejoró significativamente el rendimiento en comparación con el grupo control (Fig. 8B). Además, una prueba t de muestra única reveló que el índice de discriminación de animales inyectados con BDNF fue significativamente distinto de cero ($p_{\text{BDNF}} = 0.0015$, $t = 5.06$). Esto indica que la infusión de BDNF en Prh mejoró la consolidación y diferenciación de memorias de objetos similares. Para analizar si la expresión de Arc es necesaria para este efecto potenciador de BDNF, combinamos la inyección de BDNFrh con Arc-ASO en la Prh. Se inyectó Arc-ASO o Arc-MSO 2 h antes de la fase de entrenamiento y se inyectaron BDNFrh o solución salina (Veh) 5 min después de la fase de entrenamiento (Fig. 8C). No hubo diferencias en el tiempo de exploración durante la fase de entrenamiento entre los animales inyectados con Arc-ASO y Arc-MSO (Fig 8C, panel inferior). Sin embargo, la infusión de Arc-ASO, pero no la infusión de Arc-MSO, impidió la mejora dependiente de BDNF en el rendimiento durante la fase de evaluación llevada a cabo al día siguiente (Fig. 8D). Además, las pruebas t de muestra única muestran que el único grupo con un índice de discriminación significativamente mayor a cero es el grupo BDNF/MSO ($p_{\text{Veh/MSO}} = 0.0002$, $t = 9.47$; $p_{\text{BDNF/MSO}} = 0.03$, $t = 0051$; $p_{\text{Veh/ASO}} = 0,96$, $t = 3,01$; $p_{\text{BDNF/ASO}} = 0,9$, $t = 0,9$). Estos

resultados indican que la expresión de Arc es necesaria para la mejora en la discriminación o consolidación de memorias altamente similares inducida por BDNF.

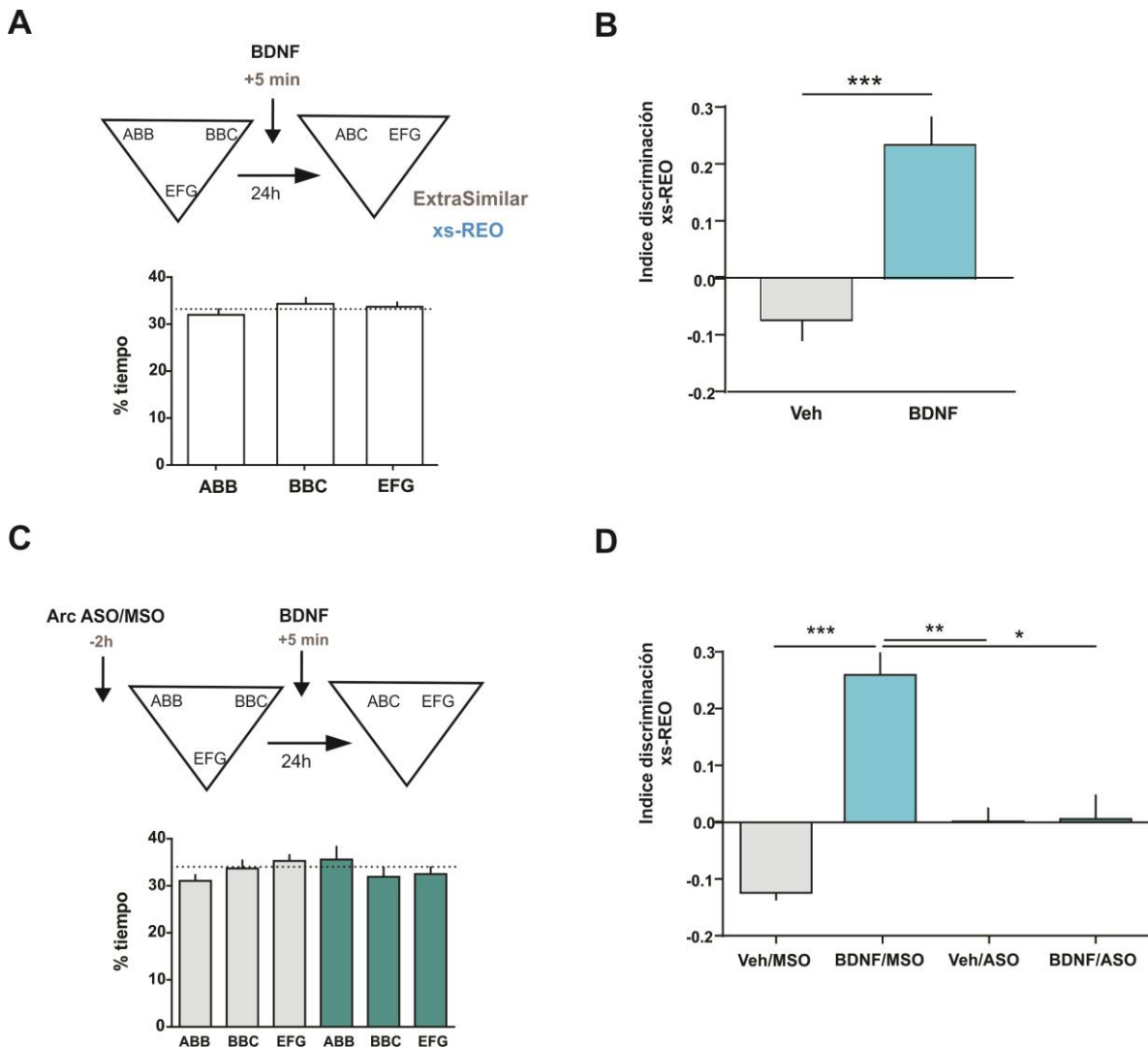


Figura 8. Arc es necesario para la mejora la desambiguación de memorias de objetos superpuestas mediada por BDNFr en Prh. (A) (Parte superior) Ilustración esquemática de la configuración similar o disímil de la tarea mostrando los tiempos de infusión de BDNFr o Veh (Parte inferior) Porcentaje de tiempo dedicado a explorar cada uno de los objetos en la fase de entrenamiento en el xs-REO. ANOVA de un factor (% de tiempo), $F = 0.845$, $p = 0.436$ **(B)** Ratas inyectadas con BDNF recombinante en Prh 5 minutos después de la fase de entrenamiento. Prueba t no pareada ($t = 5.224$) $p = 0.0001$, $n = 8$, $d = 2.612$. **(C)** Porcentaje de tiempo dedicado a explorar cada uno de los objetos en la fase de entrenamiento en xs-REO después de la inyección de Arc MSO (blanco) o ASO (gris). ANOVA de dos vías (% de tiempo) $F = 1.496$ p (fármaco) = 0.235; $F = 0.098$ p (objeto) = 0.907; $F = 1.358$ p (interacción) = 0.269. **(D)** Efectos de la inyección combinada de BDNF y Arc ASO sobre los índices de discriminación en xs-REO. ANOVA de dos vías $F = 14.95$ p (BDNF) = 0.001; $F = 1.627$ p (Arc ASO) = 0.217; $F = 14.29$ p (interacción) = 0.0012; $n = 6$. BDNF / MSO frente a BDNF / ASO: $d = 1.796$; Veh / MSO vs BDNF / MSO: $d =$

1.411; Veh / ASO vs BDNF / MSO: $d = 0.294$. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

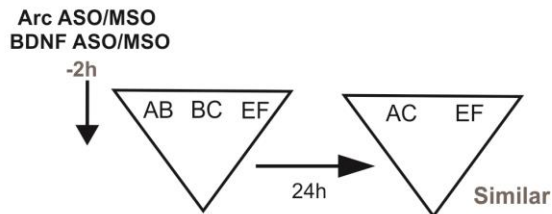
Experimentos de "desconexión molecular" sugieren que Arc es un efector crítico de BDNF durante la desambiguación de recuerdos de objetos superpuestos en la Prh.

Luego se buscó determinar si BDNF y Arc interactúan durante la consolidación de la versión similar de la tarea de REO. Con este fin, se llevó a cabo un experimento de "desconexión molecular" que nos permite evaluar la interacción funcional entre dos vías de señalización celulares. La lógica detrás de este experimento se puede encontrar en un experimento típico desconexión cerebral en el que se quiere determinar si dos estructuras cerebrales se conectan para resolver una tarea en particular^{543,544}, pero pensando en dos vías moleculares o de expresión génica dentro de una región dada en lugar de dos regiones. Si dos vías moleculares (o elementos dentro de una vía) interactúan para producir un comportamiento, entonces el bloqueo de ambas en una misma estructura de un hemisferio no tendría ningún efecto si la estructura del hemisferio contrario es suficiente para efectuar la conducta ya que en esta estructura la vía permanecería funcional. Sin embargo, si existe una interacción entre elementos el bloqueo de una molécula en un hemisferio y la segunda molécula en el hemisferio contrario llevaría a un déficit ya que en este caso la vía de señalización se interrumpiría en ambos hemisferios, con lo cual la conducta debería verse alterada.

Por lo tanto, para evaluar si las vías de señalización de BDNF y Arc están conectadas en la Prh, bloqueamos la expresión de BDNF y la de Arc en la Prh del mismo hemisferio (*mismo*) o la expresión de BDNF en la Prh de un hemisferio y la expresión de Arc en la Prh del hemisferio contrario (*distinto*) (Fig. 9A). No encontramos ningún efecto en la tarea REO similar evaluada a las 24 h si se inyectaron BDNF-ASO y Arc-ASO en la misma Prh 2 h antes de la fase de entrenamiento, siempre inyectando los ODNs control (BDNF-MSO y Arc-MSO) en la otra Prh (Fig 9B). Sin embargo, cuando BDNF-ASO / Arc-MSO y BDNF-MSO / Arc-ASO se inyectaron en la Prh en distintos hemisferios, hubo una deficiencia significativa en el desempeño en la tarea REO similar (Fig. 9B). No hubo diferencias en los tiempos totales de exploración entre los dos grupos (data no mostrada; $t=0.140$ $p=0.892$). Además, las pruebas t de muestra única revelaron que el índice de discriminación del grupo "mismo" era diferente de cero, mientras que el índice de

discriminación del grupo "diferente" no lo era ($p_{\text{mismo}} = 0.0023$, $t = 5.73$; $p_{\text{distinto}} = 0.29$, $t = 1.17$). Este resultado sugiere que BDNF y Arc interactúan durante la consolidación de memorias superpuestas en la Prh.

A



B

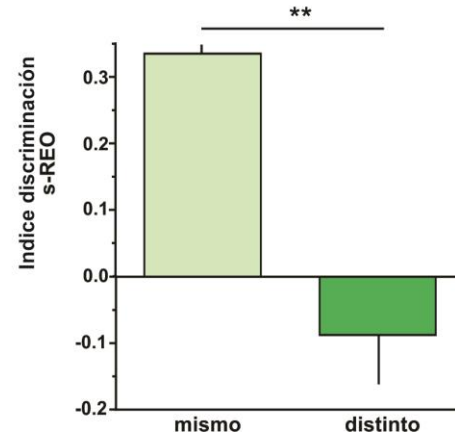


Figura 9. Las vías moleculares de Arc y BDNF interactúan durante la consolidación de representaciones de objetos similares en la Prh. (A) Ilustración esquemática de la tarea s-REO donde se indican los tiempos de infusión de Arc ASO y BDNF ASO. **(B)** Efectos de la inyección de un Arc ASO y BDNF ASO en la Prh del mismo hemisferio o del hemisferio opuesto sobre el desempeño en la tarea s-REO. Prueba t pareada ($t = 4.338$) $p = 0.0074$, $n = 6$, $d = 7.383$. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

PARTE 2

Comparación entre los mecanismos moleculares implicados en la discriminación de memorias similares espaciales y no espaciales en el GD y la Prh.

Mecanismos específicos relacionados con la plasticidad sináptica podrían estar involucrados en el mantenimiento a largo plazo de las trazas de memoria "separadas", y hay estudios que sugieren el requerimiento de moléculas asociadas a plasticidad en el GD del HP específicamente durante la formación de memorias espaciales similares ^{247,249,540}. Estos mecanismos podrían ser compartidos entre estructuras que cumplen una función similar, como el GD del HP en la categoría de estímulos espaciales y la Prh en la categoría de estímulos de tipo objetos, o podrían ser completamente diferentes y depender de la composición celular y la organización de estas estructuras, sobre todo considerando las notables diferencias que existen entre ellas en cuanto a la arquitectura de sus circuitos y al hecho de que la neurogénesis adulta ocurre en el GD adulto pero no en la Prh.

Si bien los receptores de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (rNMDA) son fundamentales para al menos algunas formas de LTP y LTD ^{382,383,545}, se ha encontrado que los rNMDA en el GD no siempre son esenciales para el aprendizaje espacial y la memoria, lo que sugiere que podrían tener un papel más sutil a nivel cognitivo. En particular, el ratón knockout selectivo de la subunidad NR1 del rNMDA tiene afectada la capacidad de distinguir entre contextos similares, pero no la memoria de miedo contextual ^{249,412,413}. La participación de los rNMDA en el proceso de separación de patrones a nivel comportamental en el GD ²⁴⁹ sugiere que existen mecanismos de plasticidad específicos que permiten la separación de patrones, y estos mecanismos estudiados en GD podrían también estar involucrados en el mantenimiento de las trazas diferenciadas de memorias de objetos similares en la Prh. Además, se conoce muy poco respecto a la señalización intracelular y vías de expresión génica involucradas en la separación de patrones comportamental en memorias dependientes de Prh como las memorias de objetos (más allá de lo evaluado en la sección anterior de este capítulo), y tampoco se ha estudiado en detalle en memorias dependientes de HP como las memorias espaciales (exceptuando ^{247,249,540}), por lo que es de interés evaluar qué mecanismos específicos relacionados con la plasticidad sináptica son reclutados durante la discriminación en la memoria de

representaciones de objetos similares y de posiciones similares, y poder comparar estos mecanismos entre estructuras.

Resultados de esta tesis y resultados previos del laboratorio demuestran que BDNF en el GD y la Prh actúa como mediador de los mecanismos de plasticidad necesarios para la consolidación de memorias similares espaciales y no espaciales respectivamente, mientras que la expresión de BDNF no parece ser necesaria para la consolidación en estas estructuras si los elementos a discriminar en la memoria son fácilmente diferenciables ^{247,546}. Estudios previos demostraron que BDNF promueve la fosforilación de rNMDAs, lo que genera un aumento en la actividad de los rNMDA ^{472-474,547}. Este proceso podría ser un potencial mecanismo efector para las acciones plásticas del BDNF en la consolidación de memorias similares. Entonces, considerando la conexión entre BDNF y rNMDAs a nivel celular, y la función de ambas moléculas en la separación de patrones, decidimos evaluar el rol de la interacción entre rNMDAs y BDNF para la discriminación de representaciones mnemónicas similares, y comparar su rol en la Prh para memorias de objetos similares, y en el GD para memorias espaciales similares.

Resultados

La "desconexión molecular" sugiere que los rNMDA son efectores críticos de BDNF durante la desambiguación de memorias espaciales similares en el GD

Para explorar la participación de los rNMDA en los efectos del BDNF sobre la superposición de recuerdos espaciales, utilizamos la versión modificada de la tarea de reconocimiento de ubicación espontánea (REP) ²⁴⁷. En nuestra versión modificada del REP, manipulamos la similitud entre las ubicaciones de los objetos al cambiar la distancia entre ellos durante la codificación sin cambios en la fase de evaluación (Fig. M1). Trabajos previos utilizando esta tarea han demostrado que el bloqueo del BDNF en el GD afectaba a la memoria en la separación pequeña (similar) pero no a la condición de mayor separación (disímil), estableciendo un efecto dependiente de la separación ^{247,540}.

En primer lugar nos preguntamos si el BDNF estaba interactuando con rNMDA para ejercer sus efectos sobre la memoria espacial. Para responder a esta pregunta, llevamos a cabo un experimento de "desconexión molecular" ⁵⁴⁶. En este caso, bloqueamos en el GD del mismo hemisferio la expresión de BDNF -utilizando el oligonucleótido BDNF-ASO- y la actividad de los rNMDA -usando AP5-, o bloqueamos la expresión de BDNF en el GD

de un hemisferio y la actividad rNMDA en el GD del otro hemisferio (Fig. 10A). ODNs MSO para el caso del ASO y solución salina (Veh) para el caso de AP5 se infundieron en el hemisferio opuesto para cada inyección como control. Se inyectó BDNF-ASO 2 h antes de la fase de entrenamiento y AP5 15 min antes de la fase de entrenamiento, de la versión similar de la tarea (s-REP, Fig. 10A). Cuando se inyectaron en el mismo hemisferio (*mismo*), no se observaron efectos en la s-REP evaluada 24 h después, mientras que la inyección en diferentes hemisferios (*distinto*) redujo significativamente el rendimiento en la s-REP (Fig. 10C). Estas diferencias no se deben a efectos de las infusiones sobre el entrenamiento ya que las ratas pasaron la misma cantidad total de tiempo explorando durante las fases de entrenamiento, independientemente del tratamiento previo (data no mostrada, prueba t pareada $t=1.878$ $p = 0.093$) (Fig. 10B). Estos resultados sugieren que BDNF y los rNMDAs interactúan durante la adquisición /consolidación de memorias espaciales similares en el GD.

BDNF mejora la desambiguación de memorias espaciales similares en el GD a través de la actividad de los rNMDA

Considerando los resultados anteriores, nos preguntamos si los rNMDAs podrían ser efectores de la acción plástica del BDNFr. Trabajos previos del laboratorio mostraron que la inyección de BDNF recombinante (BDNFr) en el GD es capaz de mejorar la consolidación o la diferenciación de recuerdos espaciales ²⁴⁷. Razonamos que si la potenciación inducida por BDNF sobre memorias similares requiere de la activación de rNMDAs, la inhibición de la actividad de los rNMDAs debería evitar el efecto promotor del BDNF. Para probar esto, usamos la condición xs-REP de la tarea, donde las posiciones de los objetos durante la fase de entrenamiento son más cercanas y por lo tanto la discriminación es más difícil (Fig. M1), y combinamos infusiones de AP5 15 min pre-entrenamiento con infusiones de BDNFr en el GD inmediatamente luego del entrenamiento. Después de 24 h, las ratas inyectadas con Vehículo no pudieron reconocer la nueva ubicación como novedosa (Fig. 10D). Sin embargo, el BDNFr mejoró significativamente el rendimiento comparado con los animales infundidos con vehículo, mientras que el AP5 impidió este efecto (Fig. 10F). Las ratas pasaron la misma cantidad total de tiempo explorando durante las fases de entrenamiento, independientemente del tratamiento previo (Fig. 10E). Los resultados de este experimento muestran que la infusión previa al entrenamiento de AP5 en el GD puede bloquear el efecto de promotor

de BDNF, lo que sugiere que la activación de rNMDAs es parte del mecanismo implicado en la consolidación dependiente de BDNF de memorias espaciales similares.

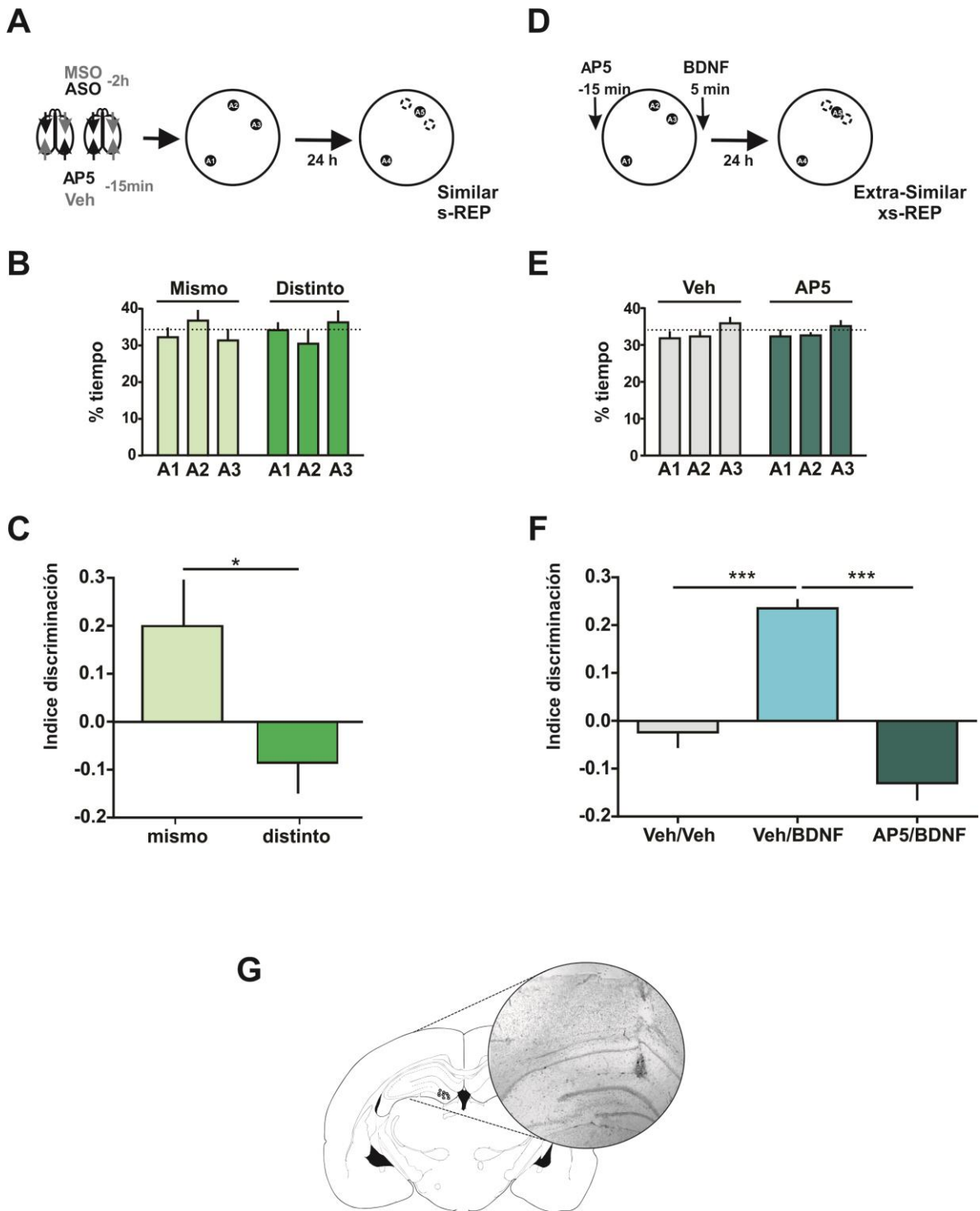


Figura 10. Los rNMDA son efectores de BDNF en el GD para la discriminación de memorias espaciales similares. (A) Ilustración esquemática de la configuración de la tarea s-REP que

representa el tiempo en el que BDNF ASO y AP5 se infundieron en el GD. **(B)** Porcentaje de tiempo dedicado a explorar cada uno de los objetos en la fase de entrenamiento en la s-REP después de la infusión de BDNF ASO y AP5 en el GD del mismo (color claro) o distintos hemisferios (color oscuro). No hubo diferencias significativas en el tiempo dedicado a explorar los objetos entre los grupos "mismo" y "distinto" ($F=2.331$, $p = 0.16$), ni en el tiempo dedicado a explorar cada una de las posiciones del objeto ($F=0.176$, $p = 0.840$). **(C)** Efecto de la coinfusión de BDNF ASO y AP5 en el GD del mismo o diferentes hemisferios en la tarea s-REP. Prueba t pareada $t = 3.116$ $p = 0.0124$; $n = 10$. **(D)** Ilustración esquemática de la configuración de la tarea xs-REP que representa el momento de la tarea en el que se infundieron BDNF y AP5. **(E)** Porcentaje de tiempo dedicado a explorar cada uno de los objetos en la fase de entrenamiento en el xs-REP después de la infusión de Veh (color claro) o de AP5 (color oscuro). No hubo diferencias significativas entre grupos en la cantidad de tiempo dedicado a explorar cada una de las posiciones durante la fase de entrenamiento. No hubo efecto del tratamiento ($F=0.794$, $p = 0.40$) o la posición ($F=3.46$, $p = 0.06$) sobre el porcentaje de exploración. **(F)** Efecto de la coinfusión de BDNF y AP5 en el GD en la tarea xs-REP. ANOVA MR de una vía $F = 35.32$ $p < 0.0001$; $n = 7$. **(G)** Sección coronal que muestra la trayectoria de la cánula e indica los sitios de infusión representativos en el GD. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. A1, A2 y A3 representan las posiciones de tres copias del mismo objeto.

BDNF también interactúa con rNMDAs para desambiguar las memorias de objetos similares en la Prh

Para investigar la interacción de BDNF y los rNMDAs durante la separación de memorias no espaciales, utilizamos el REO que tiene versiones análogas al REP similares (s-REO) y disímiles (d-REO) donde la similitud de los objetos está dada por la cantidad de características que un par de objetos comparte durante la fase de entrenamiento⁵⁴⁶. Esta tarea permite una comparación entre los mecanismos moleculares implicados en la discriminación de memorias similares entre la Prh y el GD. Llevamos a cabo un experimento de "desconexión molecular" en la Prh. Inyectamos AP5 y BDNF-ASO en la Prh del mismo hemisferio o la Prh de hemisferios distintos antes de la fase de entrenamiento en la versión s-REO de la tarea (Fig. 11A). La infusión de BDNF-ASO y AP5 en el mismo hemisferio no tuvo ningún efecto sobre la memoria, pero las ratas inyectadas en la Prh de hemisferios distintos mostraron un déficit en su capacidad para discriminar al objeto novedoso en el s-REO (Fig. 11C). Considerando que la cantidad total de tiempo dedicado a explorar durante la fase de entrenamiento no fue diferente entre los grupos (data no mostrada, prueba t pareada $t=1.13$ $p = 0.286$) (Fig. 11B), esto indica que la interacción de BDNF y rNMDA también es necesaria en la Prh para la separación de memorias de objeto similares.

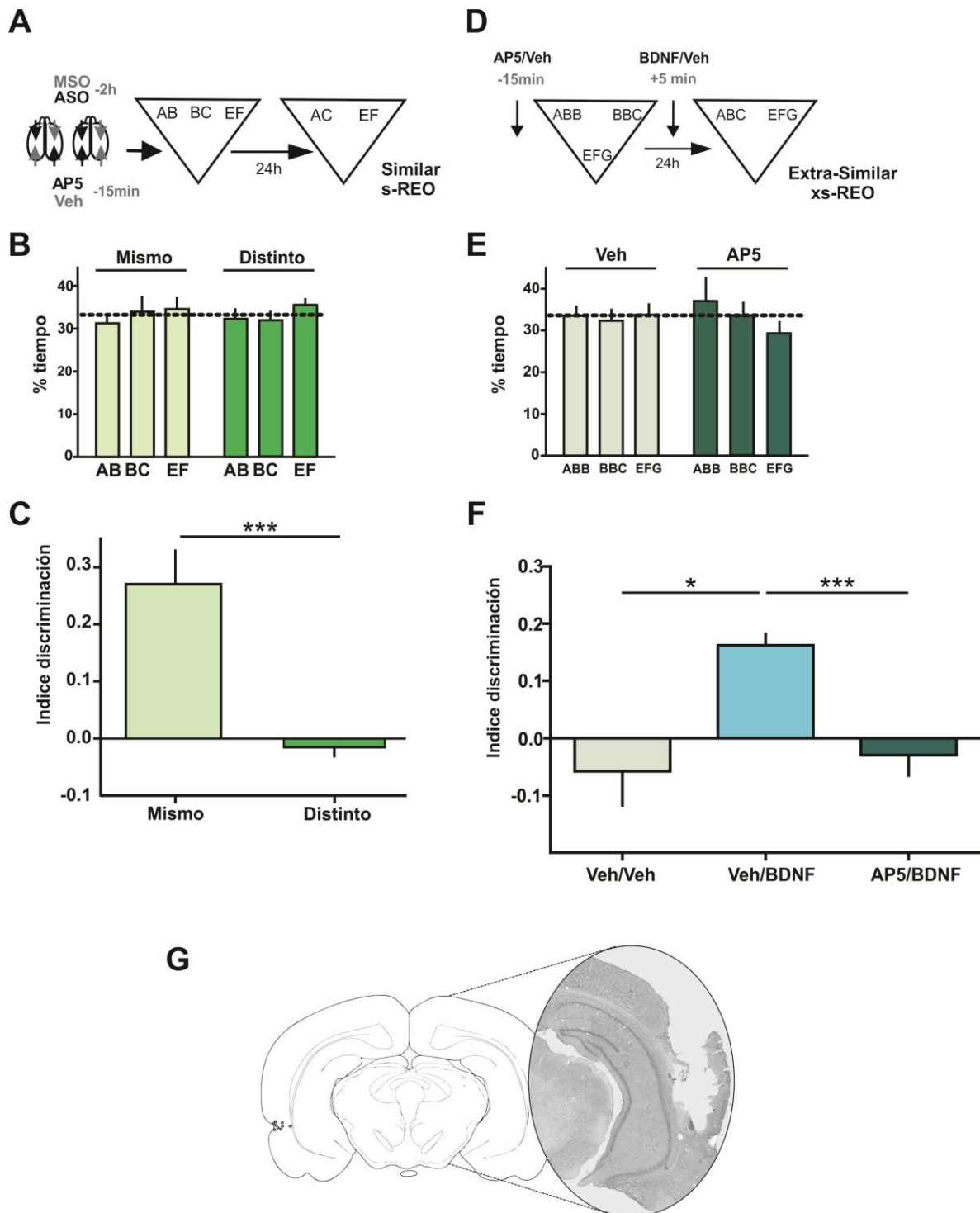


Figura 11. Los rNMDAs interactúan con BDNF en la Prh para la discriminación de memorias de objetos similares. (A) Ilustración esquemática de la configuración de la tarea s-REO que representa el tiempo en el que el BDNF ASO y AP5 se infundieron en la Prh. (B) Porcentaje de tiempo dedicado a explorar cada uno de los objetos en la fase de entrenamiento en el s-REO

después de que BDNF ASO y AP5 se infundieron en la Prh del mismo (color claro) o de diferentes hemisferios (color oscuro). No hubo ningún efecto del objeto ($F=0.893$, $p = 0.425$) ni del grupo ($F=2.813$, $p = 0.124$) en el tiempo dedicado a explorar cada objeto. **(C)** Efecto de la infusión de BDNF ASO y AP5 en la Prh de los mismos o diferentes hemisferios en la tarea s-REO. Prueba t pareada $t = 4.942$ $p = 0.0006$; $n = 11$. **(D)** Ilustración esquemática de la configuración de la tarea xs-REO que representa el tiempo en el que se infundieron BDNFr y AP5. **(E)** Porcentaje de tiempo dedicado a explorar cada uno de los objetos en la fase de entrenamiento en el xs-REP después de la infusión de Veh (color claro) o de AP5 (color oscuro). No hubo diferencias significativas en el tiempo de exploración durante la fase de entrenamiento entre los grupos ($F=0.134$, $p = 0.87$) o entre los objetos ($F=0.695$, $p = 0.512$). **(F)** Efecto de la coinfección de BDNFr y AP5 en la Prh en la versión xs-REP de la tarea. ANOVA RM de una vía $F = 9.288$ $p = 0.0058$; $n = 10$. **(G)** Sección coronal que muestra la trayectoria de la cánula e indica los sitios de infusión representativos en la Prh. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. AB, BC, EF, AC, ABB, BBC, EFG y ABC representan las diferentes composiciones de objeto usadas para la tarea.

BDNF mejora la desambiguación de memorias de objetos similares en la Prh a través de la actividad de rNMDA

De forma similar a lo que ocurre en GD para memorias espaciales, la inyección de BDNFr en la Prh mejora la consolidación y/o discriminación de memorias de objetos similares⁵⁴⁶. Los rNMDAs podrían ser necesarios para la mejora de la discriminación ejercida por el BDNFr sobre las memorias de objetos. Usamos el xs-REO para reducir el rendimiento a niveles aleatorios⁵⁴⁶ e inyectamos en la Prh AP5 15 min antes y BDNFr inmediatamente después de la fase de entrenamiento del xs-REP (Fig. 11D). Las ratas pasaron la misma cantidad total de tiempo explorando durante las fases del entrenamiento, independientemente del tratamiento previo (ANOVA de dos vías MR; $F=1.5$, $p = 0.25$) (Fig. 11E). Al evaluar la memoria al día siguiente, se observó que los animales inyectados con vehículo no fueron capaces de identificar al objeto novedoso a las 24 hs, mientras que los animales inyectados con BDNFr mostraron una mejoría significativa en su desempeño. Sin embargo, cuando el BDNFr se combinó con la inyección de AP5, se evitó esta mejora. Estos resultados sugieren un papel de rNMDAs como efectores del BDNF en la consolidación de memorias similares en forma independiente de la categoría del estímulo y en diferentes estructuras.

CAPÍTULO 2

Rol del giro dentado en la diferenciación de memorias de objetos similares

Como mencionamos previamente, un gran número de trabajos sugieren que la función cognitiva de separación de patrones requiere del GD del HP, pero se desconoce si el GD es necesario para la separación de patrones en forma independiente del tipo de estímulos que se codifican (es decir, para todo tipo de estímulos, independientemente de si poseen un componente espacial importante o no) o solamente es necesario para la diferenciación de memorias espaciales. La mayor parte de los trabajos que evalúan la separación de patrones lo hacen mediante tareas que involucran algún tipo de manipulación contextual o espacial que reclutan al HP en forma específica ^{217,244,248,249} (pero ver ⁵⁴⁸), con la excepción de estudios en humanos en los cuales controlar la participación de componentes espaciales en memorias de objetos es más complejo, lo que hace difícil la interpretación de los resultados ^{243,245,549-551}. Entonces, considerando que el HP se especializa en el procesamiento de información espacial, surge la pregunta de si el GD participa de la desambiguación de memorias similares aún si la naturaleza del estímulo a diferenciar no es de tipo espacial. Y si participara, qué mecanismos biológicos funcionan en esa estructura para permitir esta diferenciación; y en particular si son los mismos que en la Prh o no.

Resultados

El rol de la expresión de Arc en el GD en la consolidación de representaciones de objetos y de posiciones similares

Utilizando nuestra versión modificada del paradigma de REO, en el capítulo anterior observamos que la consolidación de memorias de objetos similares, pero no diferentes depende de la expresión en la Prh de Arc, un gen temprano que regula la plasticidad sináptica y media la formación de memorias. Teniendo en cuenta el rol crucial de la

expresión de Arc en la Prh para la desambiguación de memorias de objetos similares, decidimos evaluar el efecto de inhibir la expresión de Arc en GD durante la adquisición/consolidación de memorias de objetos y memorias espaciales similares como una primera aproximación para evaluar el rol del GD en el procesamiento y aprendizaje de distintos tipos de estímulos y poder compararlo con nuestros resultados previos en la Prh. Con este fin se infundieron animales canulados en el GD del HP con los oligonucleótidos Arc-ASO o MSO 2 horas antes del entrenamiento en las tareas de REO y REP, y se evaluó el desempeño en la tarea en una sesión de evaluación 24 horas más tarde. Estudios previos, tanto nuestros como de otros laboratorios, han demostrado que los ODNs ASO de Arc reducen al 50-60% respecto a los controles la síntesis de Arc ^{371,546}. Tanto los animales infundidos con Arc-MSO como los infundidos con Arc-ASO presentaron niveles similares de exploración de cada uno de los objetos presentes durante el entrenamiento, tanto en la versión similar como la disímil y tanto para la tarea de REO como la de REP (Fig. 12B, 12E). Sin embargo, mientras que los animales infundidos con Arc-MSO pudieron resolver exitosamente ambas versiones de la tarea de REO tal como evidencian las pruebas t de muestra única, los animales infundidos con Arc-ASO presentaron fallas en la resolución de la versión similar pero no en la versión disímil del REO (Fig.12C; prueba t de muestra única: MSO $p_{\text{similar}} < 0.001$, $t = 7.946$; ASO $p_{\text{similar}} = 0.235$, $t = 1.274$; MSO $p_{\text{disímil}} = 0.012$, $t = 3.132$; ASO $p_{\text{disímil}} = 0.002$, $t = 4.397$). Por otra parte, cuando la infusión de Arc ASO en GD se realizó previamente al entrenamiento en el s-REP y d-REP, se observó un patrón de resultados similar, es decir un déficit específico en la versión similar de la tarea REP y no la disímil (Fig. 12G). Las pruebas t de muestra única indican que los animales infundidos con Arc-MSO pudieron aprender la tarea s-REP y d-REP, pero los infundidos con Arc-ASO no pudieron resolver la versión s-REP de la tarea (prueba t de muestra única: MSO $p_{\text{similar}} = 0.001$, $t = 4.389$; ASO $p_{\text{similar}} = 0.368$, $t = 0.944$; MSO $p_{\text{disímil}} = 0.0004$, $t = 5.776$; ASO $p_{\text{disímil}} = 0.0004$, $t = 5.891$).

Como las intervenciones previas al entrenamiento podrían afectar la adquisición de la memoria además de la consolidación temprana, para estudiar el efecto de los ODNs específicamente en la fase de consolidación independientemente de posibles efectos en la adquisición, se infundieron animales canulados en GD con los oligonucleótidos Arc-ASO o MSO inmediatamente después del entrenamiento. En la evaluación en la versión similar del REO o del REP 24 horas más tarde, se observó que el Arc-ASO no modificó significativamente el índice de discriminación respecto al grupo de animales infundidos con Arc-MSO en ninguna de las dos tareas (Fig. 12D, H).

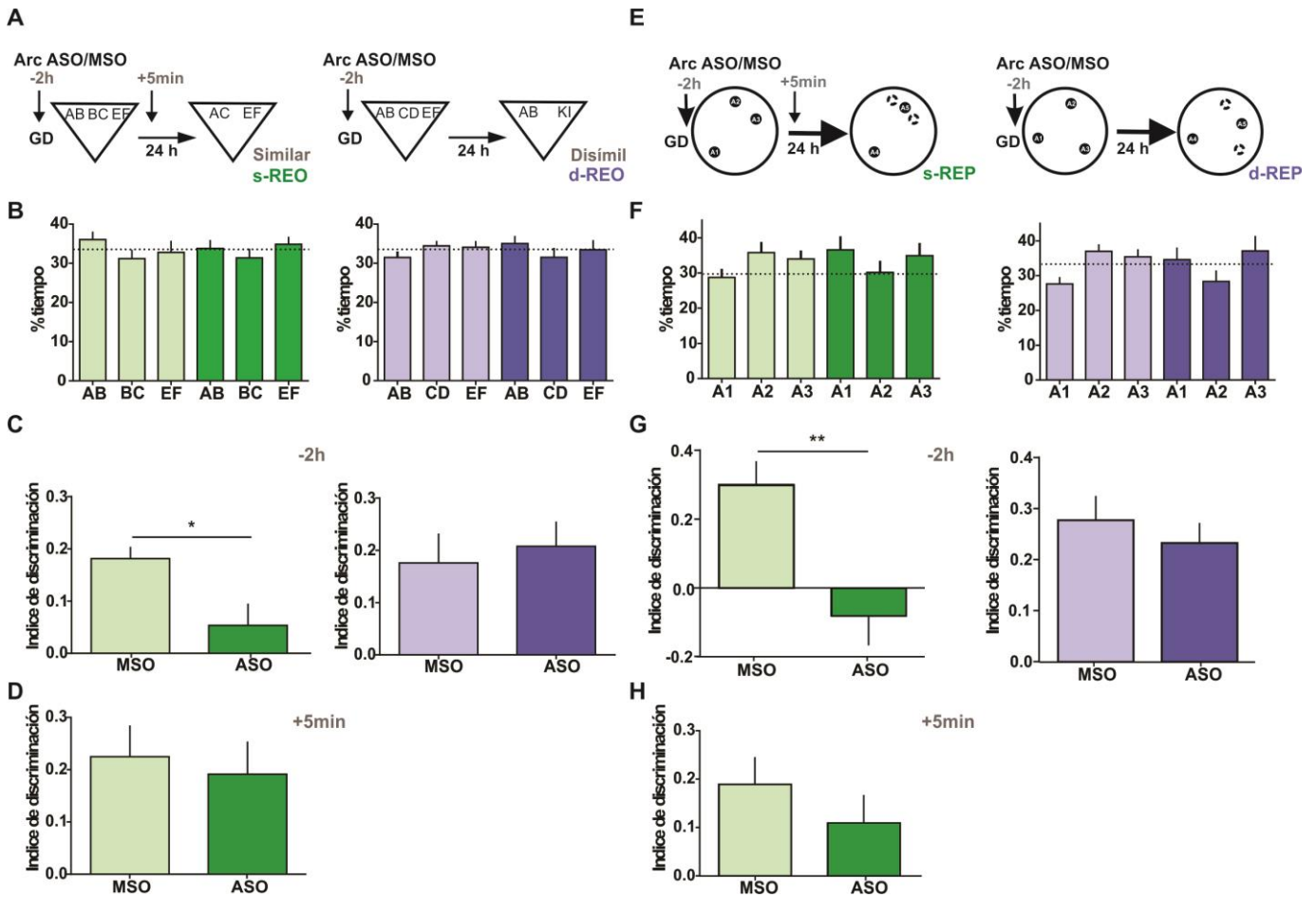


Figura 12. La expresión de Arc en el GD se requiere en una ventana temporal restringida para la consolidación de representaciones en la memoria tanto de objetos como de posiciones similares. (A) Ilustración esquemática de las configuraciones de la versión similar (s-REO, izquierda) o disímil (d-REO derecha) de la tarea que representan los tiempos en los que se infundió Arc MSO o ASO. (B) Porcentaje de tiempo dedicado a explorar cada uno de los objetos en la fase de entrenamiento en s-REO (izquierda) y d-REO (derecha), 2 h después de la infusión de Arc ASO (oscuro) o Arc MSO (claro). Similar: ANOVA de dos vías MR; $F = 3.197$ p (fármaco) = 0.084, $F = 0.391$ p (objeto) = 0.680, $F = 0.384$ p (interacción) = 0.684. Disímil: ANOVA de dos vías MR $F = 0.352$ p (droga) = 0.567, $F = 0.056$ p (objeto) = 0.945, $F = 0.956$ p (interacción) = 0.403. (C) Efecto de la inyección de Arc ASO o Arc MSO en el GD 2 horas antes de la fase de entrenamiento sobre la versión s-REO (izquierda) o la d-REO (derecha) de la tarea evaluada en una fase de elección 24 h después. Prueba t pareada (disímil) $t = 0.420$ $p = 0.684$, $n = 10$; prueba t pareada (similar) $t = 3.08$ $p = 0.011$, $n = 10$. (D) Efecto de la inyección de Arc ASO o Arc MSO en el GD 5 minutos después de la fase de entrenamiento sobre la versión s-REO (izquierda) o la d-REO (derecha) de la tarea evaluada en una fase de elección 24 h después. Prueba t pareada $t = 0.816$, $p = 0.452$, $n = 6$. (E) Representación esquemática de la configuración similar (s-REP, izquierda) y configuración disímil de la tarea de reconocimiento espontáneo de posición (d-REP, derecha) que muestra el tiempo de infusión de Arc ASO o MSO. (F) Porcentaje de tiempo dedicado a explorar cada uno de los objetos en la fase de entrenamiento en s-REO (izquierda) y d-REO (derecha), 2 h después de la infusión de Arc ASO (oscuro) o Arc MSO (claro). Similar: ANOVA de dos vías MR; $F = 0.252$ p (fármaco) = 0.627, $F = 0.945$ p (objeto) = 0.405, $F = 2.547$ p (interacción) = 0.103. Disímil: ANOVA de dos vías MR $F = 1$ p (droga) = 0.347, $F = 0.096$ p (objeto) = 0.909, $F = 2.301$ p (interacción) = 0.132. (G)

*Efecto de la infusión de Arc ASO o Arc MSO en el GD 2 horas antes del entrenamiento en las distintas versiones de la tarea REP. Prueba t pareada (s-REP, $t=3.351$) $p = 0.007$, $n = 11$; prueba t pareada (d-REP, $t = 0.557$) $p = 0.593$, $n = 9$. (H) Efecto de la infusión de Arc ASO o Arc MSO en el GD 5 minutos después de la fase de entrenamiento sobre la versión s-REP (izquierda) o la d-REP (derecha) de la tarea evaluada en una fase de elección 24 h después. Prueba t pareada $t=0.937$ $p = 0.361$, $n = 20$. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.*

Estos resultados indican que el GD del HP participa en los mecanismos plásticos desencadenados por la presentación de estímulos tanto espaciales como no espaciales similares (objetos con características superpuestas) que permiten su diferenciación en la memoria. Además, evidencian que Arc es parte de los mecanismos plásticos necesarios para la diferenciación de memorias similares independientemente del tipo de estímulo (espacial o no espacial) o la región del cerebro involucrada, ya que la participación de Arc en la desambiguación de memorias se presenta en forma independiente del tipo de información codificada. A pesar de esto, la dinámica temporal del requerimiento de Arc en el GD difiere de la que se presenta en la Prh durante la formación de memorias de objetos, en la que la infusión de Arc ASO inmediatamente luego del entrenamiento continúa afectando el desempeño en la evaluación al día siguiente (ver Fig. 6B).

La expresión de Arc en el GD no es necesaria para memoria de corto plazo ni para la codificación incidental de información espacial en la tarea de s-REO

No observamos ningún deterioro de la memoria en el s-REO cuando se evaluó el desempeño 1,5 horas después de la fase de entrenamiento en animales infundidos con Arc-ASO respecto a los infundidos con Arc-MSO (Fig. 13B), lo que indica que la expresión de Arc es únicamente necesaria para la formación de memorias diferenciadas de largo término y descarta cualquier posible efecto de la infusión previa al entrenamiento de ODNs sobre la adquisición de memorias de objetos similares. Además, las pruebas t de muestra única indicaron que tanto los animales inyectados con Arc-MSO como Arc-ASO pudieron resolver la fase de evaluación del s-REO 1,5 horas luego del entrenamiento (prueba t de muestra única: MSO $p= 0.001$, $t = 4.638$; ASO $p= 0.038$, $t = 2.436$). Este resultado, sumado al efecto acotado en el tiempo del Arc-ASO, sugiere que Arc es parte de los mecanismos moleculares reclutados en GD para la consolidación de memorias de objetos similares.

Existe un amplio debate sobre la contribución del HP en tareas de reconocimiento de objetos. Muchos autores sugieren que el HP puede cobrar relevancia en el reconocimiento de objetos cuando factores contextuales o espaciales se vuelven importantes ^{22,552-555}. Contextos reducidos y sin claves contextuales han sido utilizados para reducir la contribución de la codificación de información espacial en la tarea de REO, y varios autores observaron que cuando esta tarea es realizada en contextos de tamaño reducido el desempeño en la tarea no se ve afectado por lesiones hipocampales ^{18,538}. Podría suceder que durante el entrenamiento en la tarea de REO ocurra una codificación incidental de información espacial (ej. posición de los objetos). Esta sería una explicación para la contribución hipocampal que observamos en el s-REO, si bien no explicaría porque motivo los efectos se ven en forma específica en el s-REO y no en el d-REO que comparte estas contribuciones espaciales. Una posible codificación incidental de información espacial, aunque en ninguno de los dos casos pueda contribuir a la resolución de la tarea, podría generar un reclutamiento hipocampal en el REO. Si bien el contexto que utilizamos es de un tamaño pequeño para minimizar el efecto de la codificación espacial durante la tarea, para evaluar si la codificación espacial contribuía al efecto que observamos con el ODN Arc-ASO en GD llevamos a cabo la tarea en un contexto en forma de corbata de dimensiones aún más reducidas. Los animales infundidos en el GD con Arc-ASO o Arc-MSO fueron entrenados en la versión similar de la tarea utilizando este contexto (Fig. 13D). Cuando se evaluó a estos animales 24 horas después, el grupo infundido con Arc-ASO presentó un índice de discriminación significativamente menor que el infundido con Arc-MSO (Fig. 13E). De acuerdo a los test de t de muestra única, mientras que el grupo infundido con Arc-MSO resolvió la tarea exitosamente, los infundidos con Arc-ASO no lograron discriminar el objeto novedoso en la fase de elección (prueba t de muestra única: MSO $p= 0.0001$, $t = 6.511$; ASO $p= 0.648$, $t =0.472$). Este resultado sugiere que el componente espacial de la tarea no es una causa determinante de la dependencia de Arc en la tarea de s-REO.

Para descartar que la canulación pudiera generar alguna alteración en la integridad de la estructura hipocampal, se realizó una tinción con safranina de cortes coronales del cerebro de animales canulados en GD previamente sometidos a dos ensayos en los que recibieron infusión de oligonucleótidos. Esta tinción no reveló ningún daño en la estructura del GD ni necrosis en el HP en general (Fig. 13C), por lo cual los resultados no pueden ser atribuidos a lesiones inespecíficas de los ODNs sobre el GD.

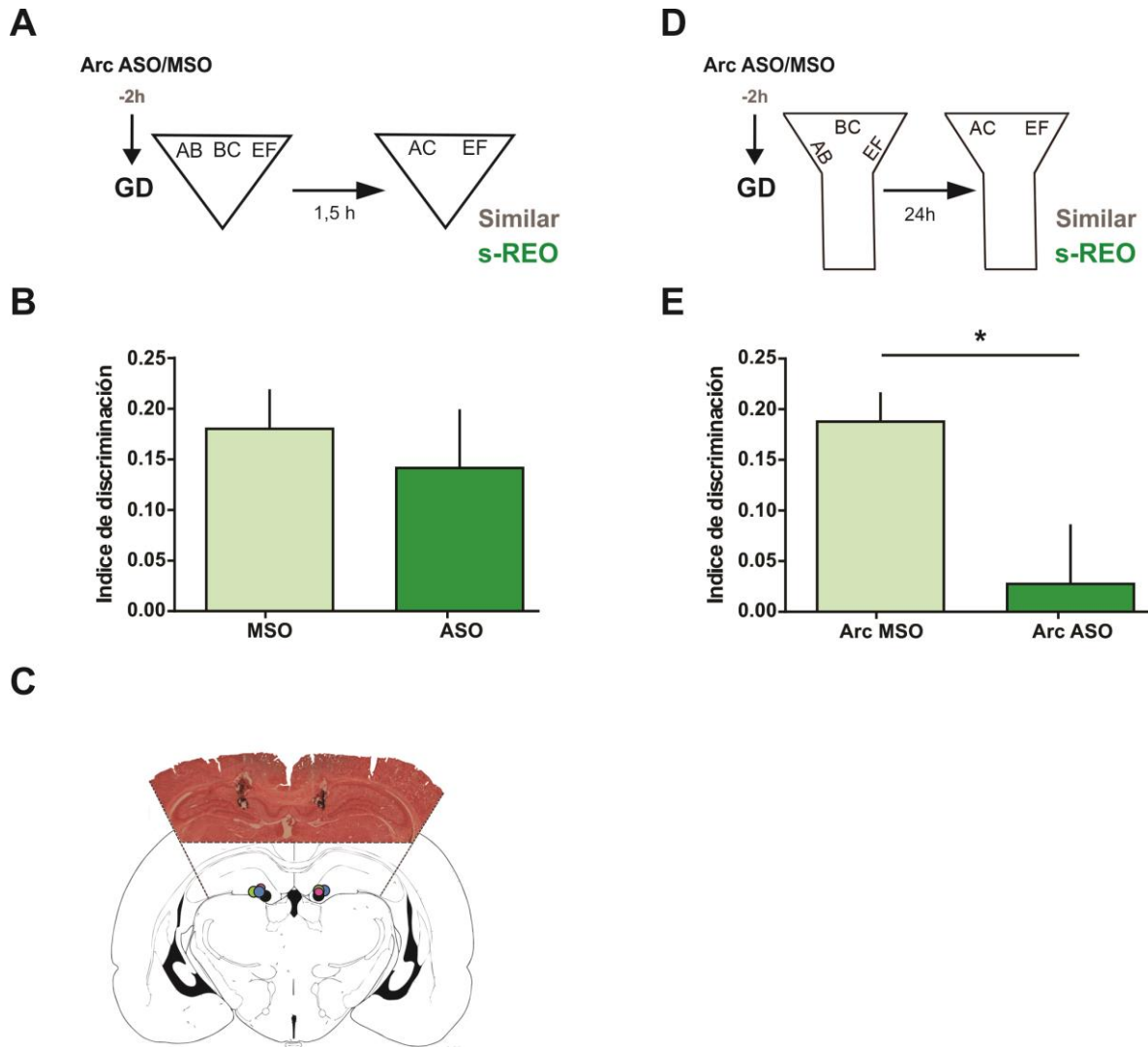


Figura 13. La expresión de Arc en el GD es necesaria para la diferenciación de representaciones mnemónicas de objetos similares en la tarea de s-REO aún en un contexto espacial más reducido, mientras que no es necesaria para la memoria de corto plazo en esta tarea. **(A)** Ilustración esquemática de las configuraciones de la versión similar (s-REO) de la tarea que representan los tiempos en los que se infundió Arc-MSO o ASO. **(B)** Efecto de la inyección de Arc-ASO o Arc-MSO en el GD 2hs antes de la fase de entrenamiento en la versión s-REO de la tarea evaluada 1,5 horas después. Prueba *t* pareada $t = 0.576$, $p = 0.579$, $n = 10$. **(C)** Representación esquemática de secciones coronales del cerebro de rata en el plano rostrocaudal de -3.80 tomadas del Atlas Paxinos y Watson. Los círculos en color representan áreas de infusión representativas. En superposición se encuentra la imagen de tinción con safranina de un corte coronal de cerebro de una rata canulada en el GD del HP. **(D)** Ilustración esquemática de la versión similar de la tarea en un contexto reducido en forma de corbata que representan los tiempos en los que se infundió Arc-MSO o ASO. **(E)** Efecto de la inyección de Arc-ASO o Arc-MSO en el GD 2hs antes de la fase de entrenamiento en un contexto reducido en forma de corbata de la versión s-REO de la tarea evaluada en una fase de elección 24 h después. Prueba *t* pareada $t = 2.525$, $p = 0.033$, $n = 10$.

Rol de la expresión de BDNF en el GD durante la diferenciación de representaciones mnemónicas de objetos similares

Otra proteína relacionada con plasticidad que además es capaz de inducir la expresión de Arc es BDNF. Dado que, como vimos en el primer capítulo, la interacción de BDNF con Arc es necesaria para la desambiguación de memorias de objetos similares, decidimos analizar si el factor neurotrófico BDNF es parte de los mecanismos moleculares involucrados en el GD en discriminar objetos similares en la memoria. Para esto, infundimos animales canulados en GD con BDNF-ASO o MSO 2 horas antes de la sesión de entrenamiento y luego fueron sometidos a una sesión de evaluación 24 horas más tarde (Fig. 14A). Los porcentajes de exploración de cada uno de los objetos presentados en el entrenamiento no difieren significativamente entre sí, ni entre animales infundidos con BDNF-MSO y BDNF-ASO en ninguna de las versiones de la tarea (Fig. 14B). Cuando se evaluó a animales infundidos con BDNF-ASO inmediatamente luego del entrenamiento en la versión similar del REO, estos presentaron un índice de discriminación significativamente menor que el grupo de animales infundidos con BDNF-MSO pero no se observaron diferencias entre grupos en la versión disímil de la tarea (Fig. 14C). Las pruebas t de muestra única indican que los animales infundidos con BDNF-MSO son capaces de discriminar en forma efectiva al objeto novedoso del s-REO y d-REO, mientras que animales infundidos con BDNF-ASO sólo pudieron resolver la versión d-REO de la tarea (prueba t de muestra única: MSO $p_{\text{similar}} = 0.020$, $t = 3.343$; ASO $p_{\text{similar}} = 0.082$, $t = 2.173$; MSO $p_{\text{disímil}} = 0.0007$, $t = 6.440$; ASO $p_{\text{disímil}} = 0.0134$, $t = 3.464$).

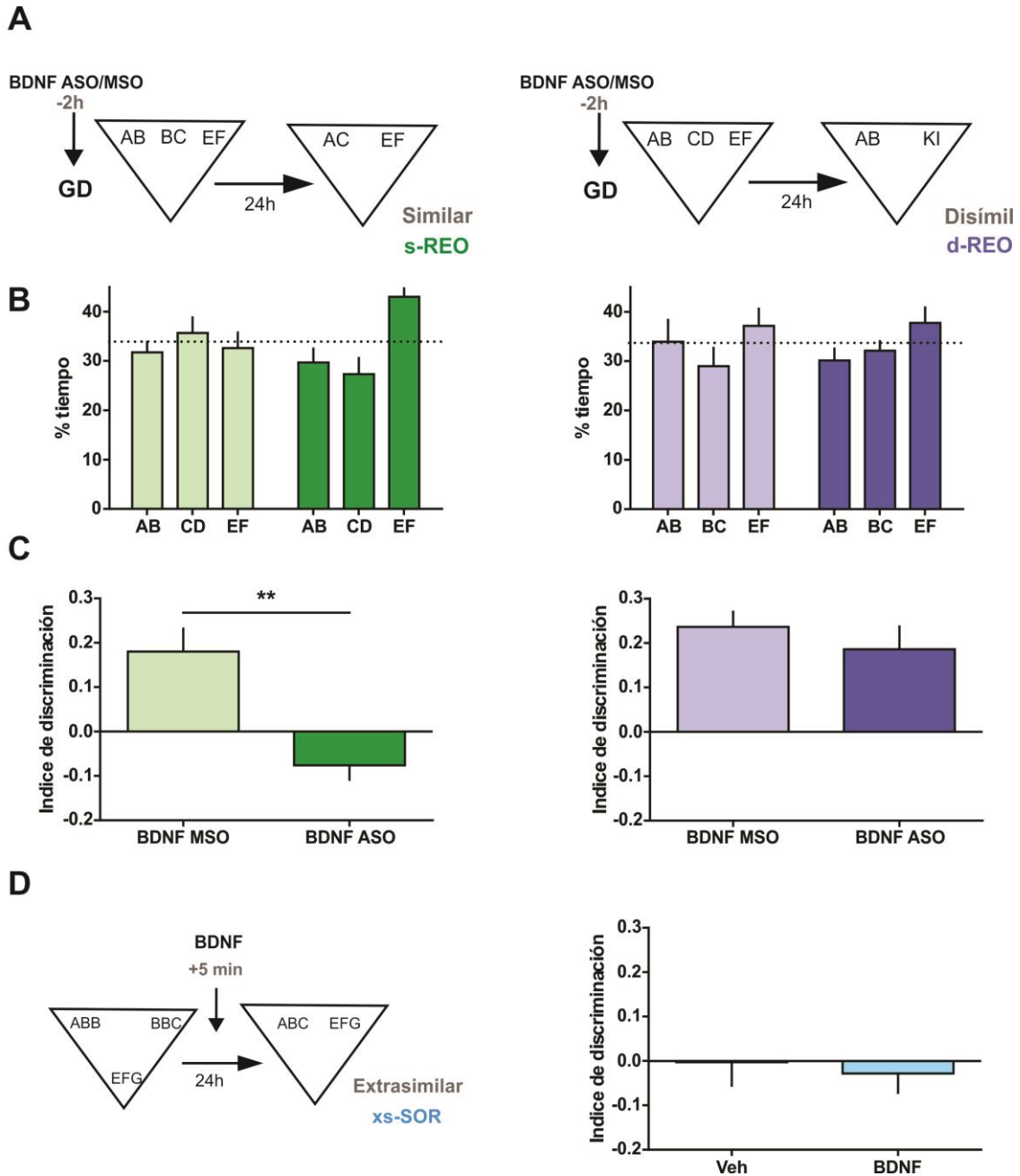


Figura 14. La expresión de BDNF en el GD es necesaria para la formación de representaciones de objetos similares, pero el BDNF exógeno en el GD no es capaz de promover la diferenciación/consolidación de memorias de objetos similares. (A) Ilustración esquemática de las configuraciones de la versión similar (s-REO, izquierda) o disímil (d-REO derecha) de la tarea que representan los tiempos en los que se infundió BDNF-MSO o ASO. (B) Porcentaje de tiempo dedicado a explorar cada uno de los objetos en la fase de entrenamiento en s-REO (izquierda) y d-REO (derecha), 2 h después de la infusión de BDNF-ASO (oscuro) o BDNF-MSO (claro). Similar: ANOVA de dos vías MR; Similar: $F = 0.004$ p (fármaco) = 0.954, $F = 1.32$ p (objeto) = 0.298, $F = 0.365$ p (interacción) = 0.701. Disímil: ANOVA de dos vías MR $F = 0.329$ p (droga) = 0.587, $F = 1.611$ p (objeto) = 0.2400, $F = 2.507$ p (interacción) = 0.123. (C) Efecto de la inyección de BDNF ASO o BDNF MSO en el GD 2hs antes de la fase de entrenamiento sobre la

versión s-REO (izquierda) o la d-REO (derecha) de la tarea evaluada en una fase de elección 24 h después. Prueba t pareada (similar) $t = -6.049$ $p = 0.002$, $n = 6$; prueba t pareada (disímil) $t = 1.679$ $p = 0.144$, $n = 7$. **(D)**(Panel izquierdo) Ilustración esquemática de las configuraciones de la versión extrasimilar (xs-REO) de la tarea que representa el tiempo en los cual se infundió BDNFr o Veh en el GD. (Panel derecho) Efecto de la inyección de BDNFrh o Veh en el GD 5 minutos después de la fase de entrenamiento en la versión s-REO (izquierda) o la d-REO (derecha) de la tarea evaluado en una fase de elección 24 h después. Prueba t pareada $t = -0.338$ $p = 0.740$, $n = 7-9$. Los datos se expresan como la media \pm EE; ** $p < 0.01$.

Posteriormente, buscamos comparar el rol de BDNF en el GD con su rol en la Prh. En el capítulo anterior observamos que la infusión de BDNFr exógeno en la Prh es capaz de mejorar la consolidación y/o diferenciación de memorias de objetos similares, como pudimos evidenciar a través de una mejora en el desempeño en la tarea de xs-REO (ver Fig. 8B). Teniendo esto en cuenta, nos preguntamos si la infusión de BDNFrh en el GD tendría un efecto análogo al de la infusión en Prh. Para responder esto, infundimos BDNFrh en el GD inmediatamente después del entrenamiento en el xs-REO. Cuando evaluamos a los animales 24 hs después, encontramos que los animales infudidos con BDNFr no presentaban diferencias significativas en su desempeño en el xs-REO con respecto a los infudidos con Veh (Fig. 14D). Las pruebas t de muestra única indican que tanto los animales infudidos con BDNFrh como los infudidos con Veh son incapaces de discriminar en forma efectiva al objeto novedoso del xs-REO (prueba t de muestra única: Veh $p = 0.963$, $t = 0.048$; BDNFr $p = 0.566$, $t = 0.607$). En conclusión, el BDNFr es incapaz de mejorar la consolidación/discriminación de memorias de objetos similares cuando es infundido en el GD, lo marca una segunda distinción entre el rol del GD y el de la Prh en la desambiguación de memorias similares de objetos.

La interacción de la Prh y el GD en la discriminación de memorias de objetos similares

El hecho de que el GD del HP sea necesario, junto con la Prh, para la discriminación en la memoria de objetos similares, lleva a preguntarse si es que estas estructuras interactúan durante la formación de memorias diferenciadas a partir de estos objetos, o si es que ambas estructuras cumplen funciones cruciales pero independientes. Las técnicas de desconexión entre estructuras permiten evaluar el problema de la conectividad funcional entre regiones cerebrales durante la resolución de una tarea. Estas técnicas han sido utilizadas previamente para evaluar sistemas funcionales de estructuras que trabajan en

forma interrelacionada y son necesarios para el desempeño en tareas tal como el Morris Water Maze ^{556,557}. La lógica de estos experimentos radica en que si un área A es fuente de información de un área B, un experimento en el que se afecte el funcionamiento en forma combinada y unilateral en el área A y en el área B contralateral va a generar una desconexión en el área B no afectada porque esta ya no recibe información del área A. La consecuencia de esta doble afección unilateral debería ser equivalente a afectar el funcionamiento del área B (o área A) en forma bilateral. Entonces, si se asume que las conexiones ipsilaterales son predominantes sobre las contralaterales, afectar el funcionamiento de estas regiones en forma ipsilateral (en el mismo hemisferio) debería tener un efecto más leve sobre la conducta evaluada ya que en este caso un hemisferio permanece funcional.

Entonces, para evaluar si la interacción entre Prh y GD es necesaria para resolver la versión similar de la tarea, realizamos un experimento de desconexión. Como previamente demostramos que la expresión de Arc en GD, así como también la de BDNF en Prh, es fundamental para resolver la tarea de s-REO y generar representaciones mnemónicas diferenciables (como fue evidenciado por infusiones bilaterales de ODNs antisentido de Arc y BDNF respectivamente), realizamos un experimento de desconexión en el cual los animales se infundieron en forma unilateral con Arc ASO en GD (y Arc-MSO en el GD del hemisferio contrario), y a su vez BDNF ASO en la Prh (y BDNF-MSO en la Prh del hemisferio contrario) 2 horas antes de la sesión de entrenamiento en la versión similar de la tarea (Fig. 15A). El grupo contralateral (*contra*) recibió infusiones de Arc-ASO y BDNF-ASO en GD y Prh respectivamente de hemisferios contrarios, mientras que el grupo ipsilateral (*ipsi*) recibió las mismas infusiones de Arc-ASO y BDNF-ASO pero estas fueron realizadas en GD y Prh del mismo hemisferio. El grupo de animales infundidos en forma ipsilateral presentó índices de discriminación significativamente mayores a cero mientras que los infundidos en forma contralateral fueron significativamente menores que cero (prueba t de muestra única: ipsi $t=7.722$ $p=0.0001$, contra $t=4.140$ $p=0.003$). El grupo que recibió infusiones en forma contralateral muestra una disminución significativa en el índice de discriminación respecto a los que recibieron infusiones en forma ipsilateral en Prh y GD (Fig. 15A). Este resultado evidencia que GD y Prh interactúan durante la consolidación de representaciones de objetos diferenciadas (y más específicamente mecanismos de plasticidad asociados con Arc y BDNF en GD y Prh respectivamente), y la interacción del GD y la Prh es necesaria para la desambiguación de estas representaciones.

Si la Prh es el sitio clave para el almacenamiento de representaciones de objetos, entonces es posible que la infusión de BDNFr en la Prh luego del entrenamiento, que como vimos antes produce una mejoría en la consolidación/diferenciación de memorias de objetos extremadamente similares, sea capaz de rescatar el efecto de la infusión de Arc-ASO en GD al bypassar su requerimiento. Para evaluar si esto era así, infundimos Arc-ASO o MSO en GD 2 horas antes del entrenamiento en la versión similar de la tarea, y luego infundimos BDNFr o Vehículo en la Prh inmediatamente después del entrenamiento (Fig. 15B). Cuando los animales fueron evaluados al día siguiente, mientras que los grupos infundidos con Arc-MSO y Vehículo o BDNF presentaron índices de discriminación significativamente mayores a cero, los infundidos con Arc-ASO y Vehículo presentaron índices de discriminación negativos (prueba t de muestra única: Veh MSO $t=2.593$ $p=0.041$, BDNF MSO $t=2.738$ $p=0.041$, Veh ASO $t= 3.249$ $p=0.023$, BDNF ASO $t=4.807$ $p=0.003$). Sin embargo, el índice de discriminación del grupo infundido con Arc-ASO en el GD y BDNF en Prh no difirió del de los grupos control, indicando que el BDNFr en Prh es capaz de revertir el efecto del Arc-ASO en GD sobre memorias de objetos similares.

Teniendo en cuenta el resultado anterior, un efecto que podría tener a nivel molecular la inhibición de la expresión de Arc en GD sobre la Prh es disminuir los niveles de expresión de BDNF en la Prh en forma indirecta. Este efecto explicaría tanto el déficit generado por el Arc-ASO en GD como la capacidad del BDNFr de rescatar ese déficit. Para examinar si la inhibición de la expresión de Arc en GD durante la formación de memorias separadas de objetos similares afecta los niveles de expresión de BDNF en la Prh, un grupo de animales fueron infundidos con Arc-ASO o MSO en el GD y 2 horas después fueron expuestos a dos objetos similares (Fig. 15C). Estos grupos fueron sacrificados 1 hora luego de la exposición, se disecaron y homogeneizaron muestras enriquecidas en Prh, y los niveles de BDNF en estas muestras fueron evaluados por western blot y comparados con los niveles de BDNF en animales no expuestos al contexto con objetos (*naive*). Aunque la expresión de BDNF no fue significativamente mayor en Prh en ratas expuestas a objetos similares infundidos con Arc-MSO respecto a animales *naive* (aunque se observa una marcada tendencia al aumento), los animales que recibieron la infusión de Arc-ASO en GD presentaron niveles significativamente menores de BDNF en Prh respecto a los infundidos con Arc-MSO (Fig. 15C). Este resultado sugiere que la expresión de Arc en GD es necesaria para la expresión de BDNF en Prh, si bien no es

posible determinar con estos resultados si lo que se afecta es la expresión basal de BDNF o la inducida específicamente por la exposición a objetos similares.

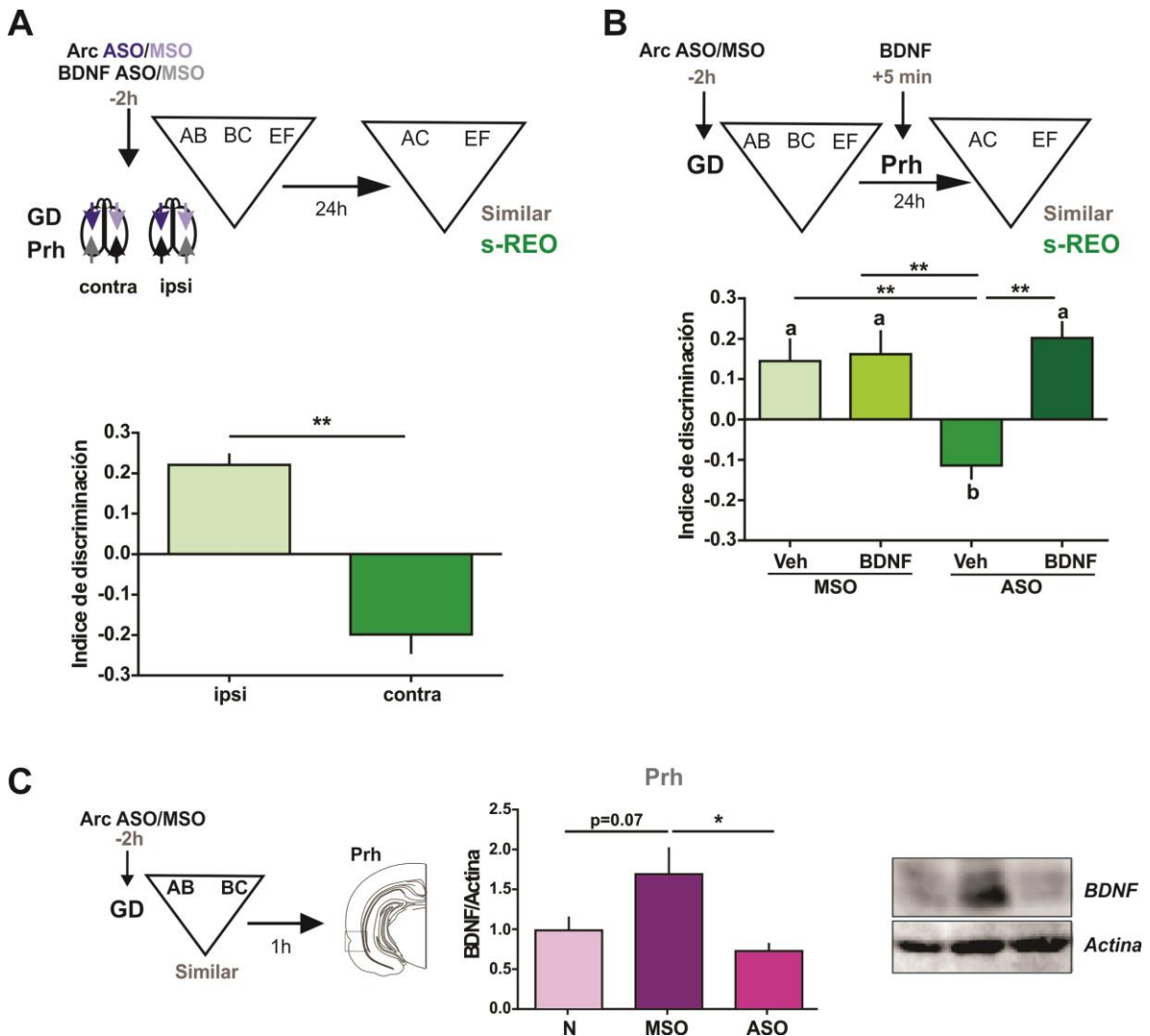


Figura 15. La Prh y el GD interactúan en la discriminación de memorias de objetos similares.

(A) (Panel superior) Ilustración esquemática de la configuración de la versión similar (s-REO) de la tarea que representa los tiempos en los que se infundió Arc-MSO o ASO en el GD del HP, y por otro lado BDNF-MSO o ASO en la Prh 2 horas antes del entrenamiento. El grupo contra recibió infusiones de Arc-ASO y BDNF-ASO en GD y Prh respectivamente de hemisferios contrarios (y sus controles correspondientes, Arc-MSO y BDNF-MSO en el otro hemisferio), mientras que el grupo ipsi recibió las mismas infusiones pero las de Arc-ASO y BDNF-ASO fueron realizadas en GD y Prh del mismo hemisferio. (Panel inferior) Efecto de la infusión de Arc-ASO y BDNF-ASO en GD y Prh del mismo hemisferio (ipsi) o de hemisferios contrarios (contra) en animales evaluados 24 horas después. Test de Wilcoxon pareado $W=-55$, $p=0.002$ $n=10$. (B) (Panel superior) Ilustración esquemática de la configuración de la versión similar (s-REO) de la tarea que representan los tiempos en los que se infundió Arc-MSO o ASO en el GD del HP 2 horas antes del entrenamiento, y luego BDNF humano inmediatamente después del entrenamiento en la Prh. (Panel inferior) Efecto de la infusión de Arc-ASO en GD y BDNF en Prh en animales evaluados 24 horas después.

Mientras que los animales infundidos con Arc-ASO en GD no logran resolver la versión similar de la tarea, animales que reciben una infusión de BDNF en Prh 5min luego del entrenamiento presentan un desempeño significativamente mayor. ANOVA de dos vías $F_{interacción}=9.145$ $p=0.006$, $F_{Arc\ MSO-ASO}=4.931$ $p=0.037$, $F_{Veh/BDNF}=11.33$ $p=0.003$ $n=6-7$. **(C)** (Panel izquierdo) Esquema del procedimiento utilizado para el experimento. Las ratas fueron inyectadas con un oligonucleótido Arc-MSO (barra oscura) o Arc-ASO (barra clara) en el GD y sacrificados 1 hora luego de la exposición a dos objetos similares. Una región enriquecida en Prh fue disecada y homogeneizada para realizar un análisis de western blot de los niveles de BDNF. (Panel derecho) Los animales infundidos con Arc-ASO presentan niveles de BDNF significativamente menores que los infundidos con Arc-MSO. Las barras muestran el porcentaje de cambio normalizado respecto al grupo naïve (N). ANOVA de 1 vía $F=4.854$, $p=0.018$ $n=8$. Los datos se expresan como la media \pm EE; ** $p < 0.01$.

El rol diferencial del GD y la Prh durante la evocación de memorias de objetos similares

Es ampliamente aceptado en el campo de la memoria que las memorias se almacenan en patrones de conectividad distribuidos entre neuronas del cerebro que se establecen durante la codificación de la memoria y luego se fortalecen en la consolidación de la memoria, y que son este mismo grupo de neuronas las que al reactivarse permiten la evocación de la memoria ²⁶⁸⁻²⁷¹. El resultado de que BDNF en el GD no es capaz de mejorar la consolidación de memorias de objetos similares (como sí lo hace la infusión en la Prh) lleva a pensar que si bien el GD participa de la consolidación de memorias de objetos superpuestos, este no parece ser parte indispensable de las trazas de objetos ya que no es posible modular la estabilidad o diferenciación de las mismas mediante manipulaciones que en otra estructura si tienen efecto. Si el GD no es parte de la traza mnemónica, entonces la evocación de estas representaciones similares no debería ser afectada si se inactiva al GD durante la evocación. Para evaluar si el GD es necesario para la evocación de memorias diferenciadas de objetos similares, infundimos DNQX, un antagonista competitivo específico de receptores AMPA-kainato, antes de la fase de evaluación en la versión similar de la tarea, con el fin de bloquear transitoriamente la transmisión excitatoria en esta estructura (Fig. 16A). Realizamos esta manipulación farmacológica tanto en GD como en la Prh, y observamos que la inactivación transitoria del GD previa a la sesión de evocación no afectó el desempeño en la tarea, pero la inactivación en la Prh produjo una disminución significativa en la capacidad de discriminación (Fig. 16A (1) y (2)). Mientras que los animales infundidos con Veh o DNQX en GD presentaron índices de discriminación significativamente distintos de cero, en los animales infundidos con DNQX en Prh no se evidencia una discriminación de la

composición novedosa durante la evaluación a diferencia de los infundidos con Veh (prueba t de muestra única: Veh $p_{GD} = 0.002$, $t = 4.792$; DNQX $p_{GD} = 0.022$, $t = 2.907$; Veh $p_{Prh} = 0.029$, $t = 2.537$; DNQX $p_{Prh} = 0.547$, $t = 0.623$). Estos resultados sugieren que la capacidad de evocar representaciones mnemónicas de objetos similares depende de la transmisión excitatoria en Prh y no en GD.

A

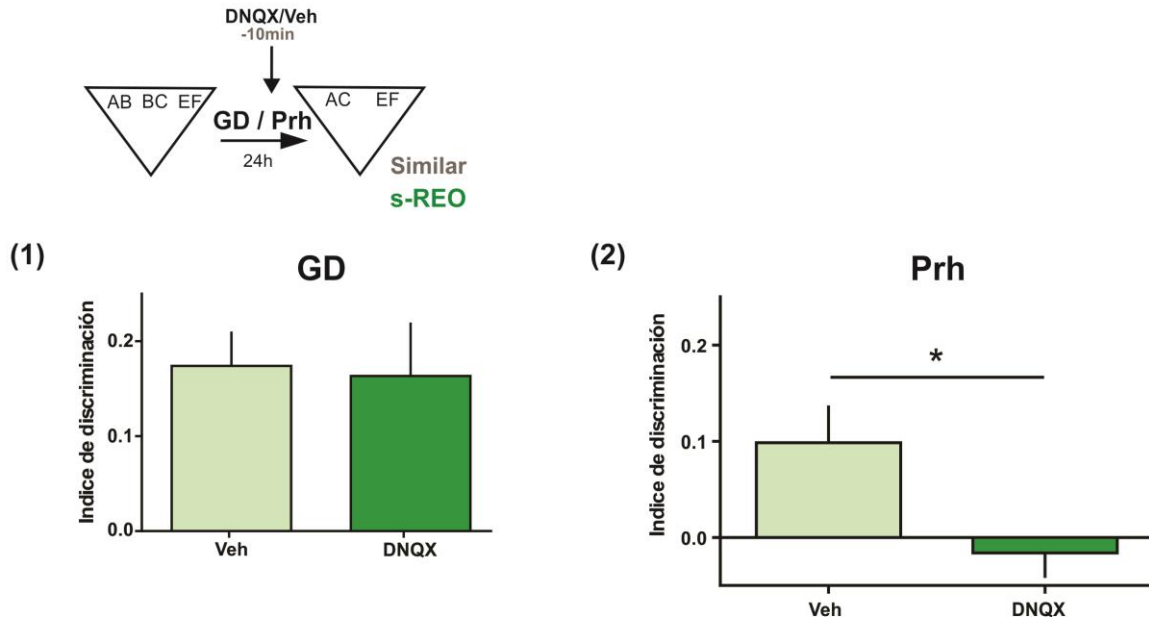


Figura 16. La evocación de memorias separadas de objetos similares depende de la Prh, pero no del GD. (A) (Panel superior) Ilustración esquemática de la configuración de la versión similar (s-REO) de la tarea que representan los tiempos en los que se infundió DNQX o Veh 10 min antes de la sesión de evaluación en el GD del HP (1) (izquierda), o en la Prh (2) (derecha). (1) Efecto de la infusión de DNQX en GD 10 minutos antes de la sesión de evaluación de la versión similar de la tarea realizada a las 24 horas del entrenamiento. (2) Efecto de la infusión de DNQX o Vehículo en Prh previa a la sesión de evaluación de la versión similar de la tarea realizada a las 24 horas del entrenamiento. Mientras que los animales infundidos con Vehículo en el GD lograron resolver la versión similar de la tarea, animales que reciben una infusión de DNQX en la Prh 10 min antes de la evaluación mostraron un desempeño significativamente afectado. Test de t pareado $t_{GD} = 0.140$ $p = 0.893$ $n = 8$, $t_{Prh} = 3.106$ $p = 0.011$ $n = 11$. Test t pareado $t_{Prh} = 3.106$, $p = 0.011$, $n = 10$. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$.

Contribución de la actividad de rNMDAs hipocampales para la consolidación de memorias de objetos

Por otra parte, BDNF interactúa con los rNMDA a través de una gran cantidad de mecanismos incluyendo la regulación del tráfico de receptores y los niveles de expresión o fosforilación de sus subunidades, y estos efectos son necesarios para los cambios

plásticos inducidos por BDNF^{439,447,473-475}. Del mismo modo, la actividad de rNMDAs es necesaria para el reclutamiento de Arc en forma específica a sitios sinápticos donde hubo actividad fuerte⁴⁹⁵ y se ha encontrado que Arc interactúa con los complejos de rNMDAs⁵⁵⁸. Además, hay evidencias de que los rNMDAs en GD son necesarios para la separación de patrones de memorias espaciales²⁴⁹. El rol asociado con la inducción de procesos plásticos necesarios para la separación de patrones de los rNMDAs y su relación con Arc y BDNF, nos llevó a preguntarnos si la actividad de estos receptores en GD es necesaria para la discriminación de objetos similares en representaciones mnemónicas diferenciadas. Con este fin, realizamos infusiones en GD de un antagonista competitivo específico de rNMDAs, AP5 o Vehículo inmediatamente después del entrenamiento en la versión similar y disímil de la tarea (Fig.17A). Encontramos que el ensayo en el que los animales fueron infundidos con AP5 luego del entrenamiento al ser evaluados en el s-REO 24 horas después presentaron índices de discriminación significativamente menores respecto al ensayo en que fueron infundidos con Vehículo, y el mismo patrón de resultados se observó en animales entrenados en la versión d-REO en los que la infusión de AP5 también tuvo efecto (si bien más pequeño) sobre el desempeño en la tarea (Fig. 17B). Además, de acuerdo a los test de t de muestra única, los animales infundidos con Vehículo tanto en el s-REO como en el d-REO mostraron índices de discriminación significativamente mayores a cero, indicando que pudieron resolver la tarea, mientras que los animales infundidos con AP5 sólo presentaron índices mayores a cero en el caso de la versión disímil de la tarea, sugiriendo que si bien el AP5 afecta la discriminación en la versión disímil no es capaz de impedirla completamente (prueba t de muestra única: MSO $p_{\text{similar}} = 0.005$, $t = 4.314$; ASO $p_{\text{similar}} = 0.612$, $t = 0.535$; MSO $p_{\text{disímil}} = 0.0008$, $t = 5.658$; ASO $p_{\text{disímil}} = 0.0075$, $t = 3.719$). Los resultados indican que la actividad de los rNMDAs es necesaria en el GD luego de la adquisición de memorias de objetos similares para su diferenciación en la memoria, pero también lo es parcialmente cuando estos objetos son claramente diferenciables. Esto sugiere un rol de los rNMDAs en GD en la formación de memorias de objetos en forma independiente de la similitud de las representaciones, evidenciando que el GD no se recluta en forma específica durante la consolidación de memorias diferenciadas de objetos similares sino que también participa de la consolidación de representaciones de objetos fácilmente distinguibles. En la versión d-REO, el tamaño del efecto del AP5 sobre la tarea y el hecho de que aún en presencia de AP5 el índice de discriminación continúa siendo significativamente mayor a cero sugieren

que su rol puede no ser tan crucial en este caso para la discriminación del objeto novedoso.

Considerando el rol fundamental del GD durante la consolidación de memorias de objetos similares y disímiles, nos volcamos a examinar qué interacciones dentro del circuito hipocampo-parahipocampal podían intervenir en la consolidación de representaciones mnemónicas de objetos. Si bien el GD y la Prh no presentan conexiones directas, nuestros resultados indican que manipulaciones en el GD pueden tener un efecto sobre los niveles de expresión de proteínas asociadas a plasticidad en Prh sugiriendo que existen conexiones indirectas por las cuales el GD se comunica con la Prh y ejerce sus efectos. Esto evidencia que otras estructuras más allá del GD y la Prh deben formar parte del circuito que se activa y modifica en forma específica durante la consolidación de memorias similares.

Estudios previos han explorado la interacción entre el HP y la Prh durante la discriminación de objetos. Si bien estas estructuras pueden funcionar en forma independiente en tareas de RO, al evaluar la actividad neuronal mediante c-fos durante la discriminación de objetos se ha encontrado que el HP provee evidencia convergente de la novedad de objetos que se observa aún en ausencia de input de la Prh ⁵⁵⁹. Dentro del hipocampo, CA1 en particular es sensible a cambios de configuración en repeticiones de eventos ^{560,561}. De hecho, varios estudios asocian el circuito que incluye a la región de CA1 anterior y la Prh con la detección de novedad ^{180,185}. Este proceso de detección de novedad en CA1 podría reclutarse automáticamente en la tarea de SOR por la presencia de objetos novedosos durante el entrenamiento. Como la región de CA1 del HP presenta conexiones aferentes y eferentes directas con la Prh consideramos que sería un excelente candidato a integrante del circuito que se activa durante la consolidación de memorias de objetos que incluye a la Prh y el GD ^{130,562-564}. Para evaluar el rol de la región de CA1 del HP durante la consolidación de memorias de objetos similares y disímiles, entrenamos animales en la versión similar y disímil de la tarea de REO, e inmediatamente después del entrenamiento infundimos AP5 en la región de CA1 (Fig. 17C). La infusión con AP5 no lesionó el tejido en CA1, como se evidencia en las tinciones con safranina del tracto de la cánula (Fig. 17D).

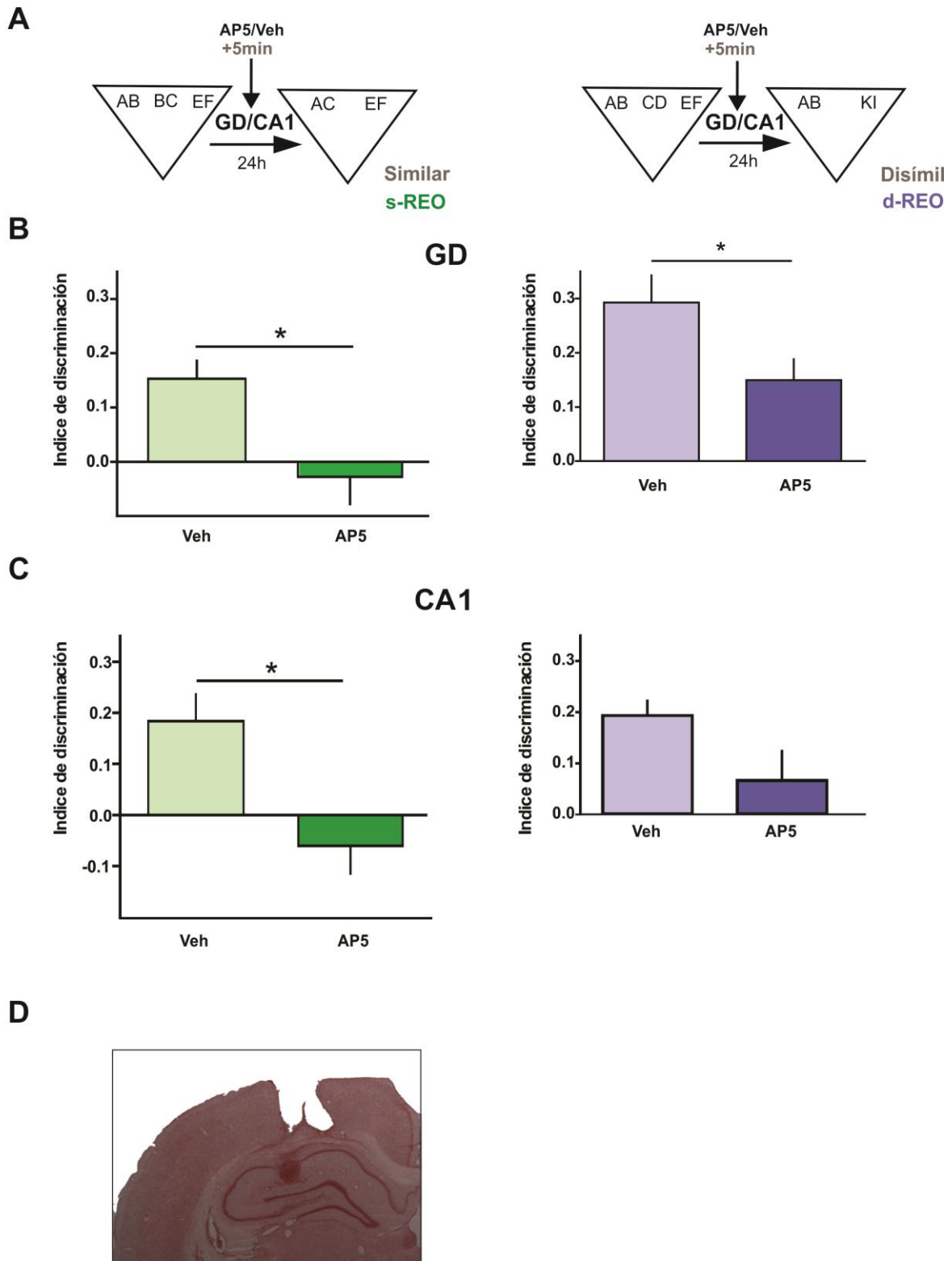


Figura 17. La actividad de rNMDAs en el GD y en la región de CA1 es necesaria durante la consolidación de memorias diferenciadas de objetos similares. (A) Ilustración esquemática de la configuración de la versión similar (s-REO, izquierda) y disímil (d-REO, derecha) de la tarea que representan los tiempos en los que se infundió AP5 o Veh 5 min después de la sesión de

entrenamiento en el GD o CA1 del HP. **(B)** Efecto de la infusión de AP5 o Vehículo en el GD inmediatamente luego de la sesión de entrenamiento de la versión similar (izquierda) o disímil (derecha) de la tarea evaluada a las 24 horas del entrenamiento. Test de t pareado $t_{similar}=2.818$ $p=0.030$ $n=7$ $t_{disimil}=2.617$ $p=0.034$ $n=8$. **(C)** Efecto de la infusión de AP5 o Vehículo en CA1 inmediatamente luego de la sesión de entrenamiento de la versión similar (izquierda) o disímil (derecha) de la tarea evaluada en una sesión de evaluación 24 horas después. Test de t pareado $t_{similar}=2.376$ $p=0.0448$ $n=9$, Test de t pareado con transformación X^2 de los datos $t_{disimil}=1.317$, $p=0.236$ $n=7$. **(D)** Imagen de tinción con safranina de un corte coronal de cerebro de una rata canulada en la región de CA1 del HP. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$.

Mientras que los animales infundidos con Veh en CA1 luego del entrenamiento en la versión similar de la tarea presentaron índices de discriminación significativamente distintos de cero, los índices de animales infundidos con AP5 no difirieron de cero (prueba t de muestra única: Veh $t=3.189$ $p=0.0129$, AP5 $t=0.231$ $p=0.823$). El grupo AP5 tuvo un desempeño significativamente más bajo que el grupo Veh en el s-SOR (Fig. 17C). Por otro lado, a pesar de que hubo una tendencia a menores niveles de discriminación en el grupo AP5 (lo que se manifiesta en índices de discriminación que no difieren significativamente de cero en el grupo AP5 pero sí en el grupo Veh; $t_{veh}=6.155$ $p=0.001$, $t_{AP5}=1.095$ $p=0.315$), los índices de discriminación del grupo AP5 no difirieron significativamente del Veh (Fig. 17C). Este resultado sugiere que cambios plásticos en la región de CA1 del HP son necesarios durante la consolidación de memorias de objetos similares, lo que sugiere que esta podría ser la estructura a través de la cual la Prh y el GD se comunican durante la consolidación de representaciones de objetos.

CAPÍTULO 3

El rol de los rNMDAs y BDNF en el balance entre separación de patrones y compleción de patrones a nivel conductual

De acuerdo a modelos computacionales, mientras que el GD parecería tener un rol crucial para el proceso de separación de patrones, el circuito autoasociativo de CA3 por sus conexiones vía colaterales recurrentes permitiría el proceso de compleción de patrones de forma tal que sea posible evocar una representación de la memoria aún a partir de información degradada respecto a la memoria original. De esta forma, la teoría computacional sugiere que el circuito DG-CA3 del hipocampo media la competencia dinámica entre los procesos de separación de patrones y compleción de patrones que cumplen funciones complementarias e interdependientes. Se postula que CA3 es capaz de mostrar compleción de patrones cuando el cambio en el input sensorial es pequeño, y separación de patrones cuando es mayor. Sin embargo, aún no se sabe si la distinción entre separación de patrones y compleción de patrones es binaria, si es una función que se modifica a medida que se transforma el input o si la interdependencia que se postula entre separación y compleción de patrones realmente no existe. En este capítulo buscamos estudiar dinámica de la interacción entre estos procesos, y el rol de proteínas asociadas a plasticidad en CA3 y GD sobre esta dinámica.

Resultados

La tarea de evocación asociativa

Para evaluar la capacidad de los animales de evocar memorias en presencia de un contexto degradado, utilizamos la tarea espontánea de evocación asociativa (EA). Durante la fase de entrenamiento, las ratas fueron expuestas a un objeto novedoso en presencia de todas las claves distales en una arena circular, y a las 24 horas fueron sometidas a una sesión de evaluación en la que una copia idéntica del objeto se presentó en el mismo contexto ya sea en presencia de todas las claves (TC), en presencia de sólo

3 de las claves presentadas en el entrenamiento (CP) o en ausencia de claves (SC) (Fig. 18A). Esta tarea busca evaluar la capacidad de los animales de evocar la memoria original del objeto en su contexto en presencia de un contexto degradado. En la tarea de EA, consideramos una medida de la memoria del objeto en contexto a la disminución del tiempo que pasaron los animales explorando el objeto durante la sesión de evaluación (respecto al entrenamiento), que se evidencia como un porcentaje de tiempo de exploración en la evaluación respecto al entrenamiento significativamente menor al 100%. La lógica de la tarea es que si los animales en una condición donde el contexto se encuentra degradado (CP) son capaces de evocar la memoria original, entonces deberían mostrar un porcentaje de tiempo de exploración equivalente al que se encuentra en los animales evaluados con el objeto en presencia del contexto original (TC) ya que en ambos casos habría memoria del objeto en contexto, mientras que si en la sesión de evaluación no son capaces de evocar la memoria en condiciones de degradación del contexto deberían pasar un porcentaje de tiempo equivalente al del entrenamiento explorando el objeto al no ser capaces de reconocer ese episodio de objeto en contexto como familiar. En cambio, en la condición de ausencia de claves (SC), al no existir claves capaces de guiar la evocación de la memoria del objeto en contexto, esperaríamos que el animal no sea capaz de evocar la memoria original de objeto en contexto y por lo tanto que pase un porcentaje de tiempo mayor explorando el objeto que en las otras condiciones. Los resultados utilizando la tarea de EA indican que si bien *a priori* los tiempos de exploración durante el entrenamiento no difirieron significativamente entre grupos (Fig. 18B), hubo un efecto significativo en la sesión de evaluación de la condición sobre los porcentajes de exploración respecto al entrenamiento (ANOVA de una vía MR, $F=8.271$, $p=0.006$). Los test de t de una muestra indican que los porcentajes de exploración fueron significativamente menores al 100% para las condiciones TC y CP, pero no para la SC (prueba t de muestra única: TC $t=9.385$, $p<0.0001$; CP $t=5.184$, $p=0.0008$; SC $t=1.830$, $p=0.105$). Los animales evaluados en ausencia de claves tuvieron un porcentaje de exploración significativamente mayor durante la evaluación que el resto de las condiciones, pero no hubo diferencias significativas entre ratas evaluadas en un contexto con todas las claves respecto a un contexto con claves parciales (Fig. 18C). Suponiendo que la remoción de algunas claves utilizadas durante la adquisición para codificar una posición y un objeto aumenta la necesidad de compleción de patrones para la evocación del objeto guiada por el contexto, la ausencia de diferencias frente a la remoción de parte de las claves sugiere que las ratas son capaces de realizar compleción

de patrones en estas condiciones. Sin embargo, en completa ausencia de claves espaciales, los animales parecen ser incapaces de recuperar la memoria del objeto, lo que evidencia por un lado que el animal utiliza el contexto para guiar la evocación de la memoria del objeto y por otro que no alcanza con la presencia de claves proximales en el contexto para recuperar la memoria del objeto.

El comportamiento de alzadas (rearings) es considerado una medida de conducta exploratoria del animal^{565,566}. Como una medida de la novedad del ambiente alternativa a la exploración de un objeto familiar que utilizamos, evaluamos el número de alzadas en el contexto durante la fase de entrenamiento y evaluación bajo las distintas condiciones experimentales. Los animales presentaron un número de alzadas que no difirió significativamente entre grupos en el entrenamiento, indicando que no existen diferencias preexistentes entre grupos (Fig. 18D). Sin embargo, se encontró un efecto significativo de la condición en el porcentaje de alzadas durante la evaluación respecto al entrenamiento (Fig. 18E). Comparaciones múltiples indican una muy fuerte tendencia de aumento en el porcentaje de alzadas para la condición SC en comparación con las condiciones TC y CP, si bien esta no alcanzó la significancia (Fig. 18E).

Rol de los rNMDAs en la evocación asociativa de la memoria de objeto en un contexto degradado

Estudios recientes muestran que, si bien los rNMDAs no son necesarios para la evocación de la tarea del laberinto de Morris (MWM, del inglés *Morris Water Maze*) cuando la evocación se realiza en el contexto original, si se observa un requerimiento de la actividad de rNMDAs cuando la evocación ocurre en presencia de sólo algunas de las claves contextuales originales, lo que sugiere que los rNMDAs toman particular relevancia cuando para poder recuperar la memoria se debe completar toda la representación mnemónica a partir de sólo una parte^{213,250,567}. Esto es consistente con lo que postulan modelos teóricos respecto a los estados atractores presentes en CA3, y el requerimiento de modificaciones sinápticas basadas en la activación de rNMDAs para modificar estos estados atractores y así mantener patrones de actividad neuronal reproducibles en CA3⁵⁶⁸ que permitan la correcta evocación de la memoria.

Considerando estos resultados, decidimos estudiar el requerimiento de rNMDAs en la región de CA3 para la recuperación de la memoria en presencia de claves parciales como

una primera aproximación para validar nuestra tarea como una forma de evaluar la compleción de patrones en roedores.

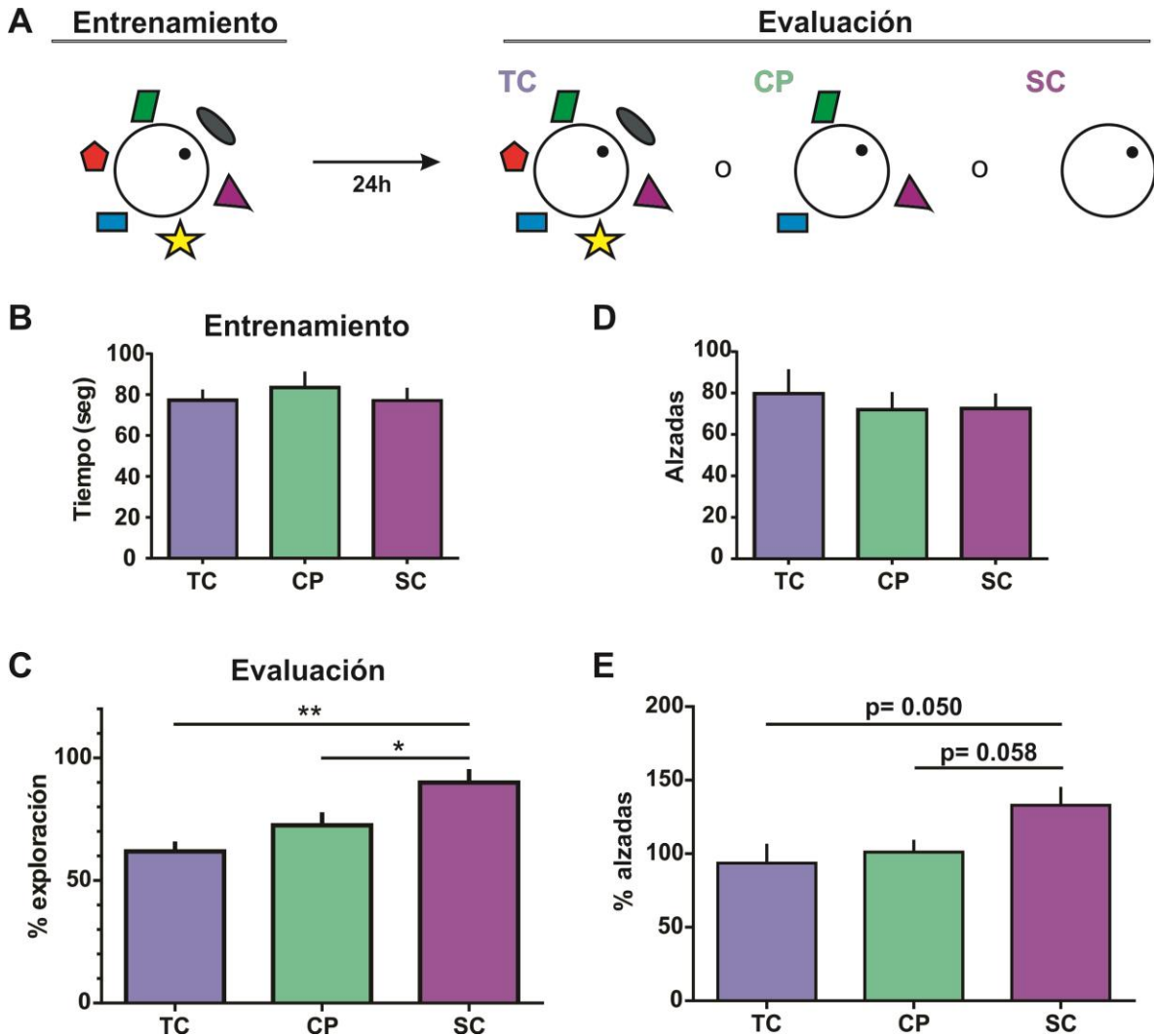


Figura 18. Descripción de la tarea de evocación asociativa. (A) Ilustración esquemática de la condición “todas las claves” (TC, azul), “claves parciales” (CP, verde) y “sin claves” (SC, violeta) de la tarea de EA. (B) Tiempos totales de exploración del objeto presentado en el contexto en presencia de las 6 claves durante la sesión de entrenamiento para los grupos de TC, CP y SC. ANOVA de una vía MR $F=0.7386$, $p=0.453$ $n=9$. (C) Porcentaje de exploración del objeto presentado en presencia de cantidades variables de claves contextuales de acuerdo a las tres condiciones (TC, SC y CP) en la sesión de evaluación respecto al tiempo de exploración en el entrenamiento 24 horas antes. (D) Número total de alzadas realizadas en 10 minutos de entrenamiento en el contexto en presencia de las 6 claves para los grupos de TC, CP y SC. (E) Porcentaje de alzadas en el contexto en presencia de cantidades variables de claves contextuales de acuerdo a las tres condiciones (TC, SC y CP) en la sesión de evaluación respecto al tiempo de exploración en el entrenamiento 24 horas antes. ANOVA de una vía MR $F=4.260$, $p=0.048$ $n=9$. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Para esto, animales entrenados en el contexto con todas las claves fueron evaluados en el mismo contexto con las 6 claves con las que fue entrenado (TC) o con sólo 3 de las claves presentadas en el entrenamiento (CP) y recibieron una infusión del antagonista de rNMDAs AP5 o de Vehículo en la región de CA3 del hipocampo 15 minutos antes de la sesión de evaluación (Fig. 19A). Los animales infundidos con Vehículo pasaron significativamente menos tiempo explorando el objeto previamente presentado, independientemente de si se los evaluó en un contexto con todas las claves o sólo 3 (Fig. 19B *panel superior*). Sin embargo, el análisis de ANOVA de dos factores con MR indicó que existen interacciones significativas entre el tratamiento farmacológico y la condición de la tarea, tal que los animales infundidos con AP5 previo a la evaluación en la condición CP presentaron porcentajes de discriminación significativamente mayores que los infundidos con Vehículo mientras que esto no ocurre en la condición TC (Fig. 19B *panel superior*). Por otra parte, mientras que el porcentaje de exploración en animales infundidos con AP5 en CA3 previo a la presentación del objeto en un contexto TC fue menor al 100%, en animales evaluados en el contexto CP el tiempo de exploración no difirió significativamente del entrenamiento (test de Wilcoxon %exploración TC-Veh $W=-48$, $p=0.032$; CP-Veh $W=-66$, $p=0.001$; TC-AP5 $W=-55$, $p=0.002$; CP-AP5 $t=-7$, $p=0.769$). Además, evaluamos el efecto de infundir AP5 o Veh en el GD (en lugar de CA3) previo a la evaluación en las condiciones CP y TC. El ANOVA de 2 vías indica que no hubo efecto del fármaco o la condición sobre el porcentaje de exploración ($F_{\text{interacción}}=0.418$ $p=0.528$; $F_{\text{condición}}=1.926$ $p=0.186$; $F_{\text{fármaco}}=0.651$ $p=0.433$) (Fig. 19B *panel inferior*). Estos resultados sugieren que la actividad de rNMDAs en la región CA3 (aunque no en el GD) está involucrada en la recuperación de la memoria específicamente a partir de claves incompletas y no en presencia de las claves espaciales originales. Además, los resultados permiten descartar efectos región-independientes sobre la tarea de EA, indicando que el efecto del AP5 no se debe simplemente a la interrupción de la plasticidad dentro de la vía de procesamiento trisináptica hipocampal.

Como se discutió en la introducción, las teorías computacionales postulan que la separación de patrones y compleción de patrones son dos procesos opuestos que se dan en conjunto como parte del procesamiento hipocampal que permiten que el almacenamiento y la evocación de memorias ocurran en forma coordinada. Un gran número de estudios muestra que las neuronas piramidales de CA3 pueden mostrar actividad más concordante con compleción de patrones o separación de patrones de acuerdo al grado de similitud de los estímulos que ingresan al hipocampo ^{217,230,569,570}. De

acuerdo con esta hipótesis, las neuronas piramidales del circuito atractor de CA3, en presencia de un contexto ambiguo deberían caer en un estado atractor que represente o el ambiente familiar o uno novedoso, pero no una mezcla entre los dos; y efectivamente, hay evidencias de que esto es lo que ocurre ^{571,572}.

Una predicción que surge de estas teorías es que afectar a un proceso debería tener un efecto sobre el otro, ya que ambos son procesos mutuamente excluyentes. Para evaluar esta predicción, decidimos utilizar una manipulación que sabemos tiene un efecto sobre la capacidad de realizar separación de patrones a nivel comportamental. Trabajos anteriores encontraron que ratones deficientes en GD para la subunidad NR1 del los rNMDAs tienen problemas para distinguir contextos similares en una tarea de miedo contextual ²⁴⁹. Dado que los rNMDAs del GD parecen ser parte de los mecanismos plásticos relacionados con el almacenamiento de memorias espaciales diferenciadas, esperamos que interferir con los rNMDAs dificulte la separación de patrones y por lo tanto favorezca la compleción de patrones. Para poder ver este efecto de mejora de la compleción de patrones a nivel comportamental, utilizamos una versión de la tarea de EA en la cual el contexto presentado en la sesión de evaluación tiene 2 claves contextuales en lugar de 3 (CP2), y por lo tanto es necesario un nivel mayor de compleción para poder recuperar la memoria original a partir del contexto. Entonces, infundimos AP5 o Vehículo en el GD 15 minutos antes de la fase de evaluación en un contexto con sólo 2 claves distales (CP2) en animales entrenados 24 horas antes (Fig. 19C). Encontramos que los animales infundidos con Vehículo muestran porcentajes de exploración similares a los del entrenamiento, mientras que los infundidos con AP5 eran significativamente menores. En particular, los animales infundidos con AP5 tienen un porcentaje de exploración significativamente menor que los infundidos con Vehículo durante la sesión de evaluación con dos claves contextuales (Fig. 19D). Si bien el AP5 en el GD no tuvo ningún efecto sobre ratas evaluadas en las condiciones TC y CP, cuando se las evaluó con sólo 2 claves distales el AP5 en GD favoreció la capacidad de recuperar memorias en presencia de un contexto muy degradado, en el cual ratas control no demostraron memoria del objeto. La ausencia de efecto en la condición TC y CP descarta un efecto inespecífico del AP5 sobre los niveles de exploración.

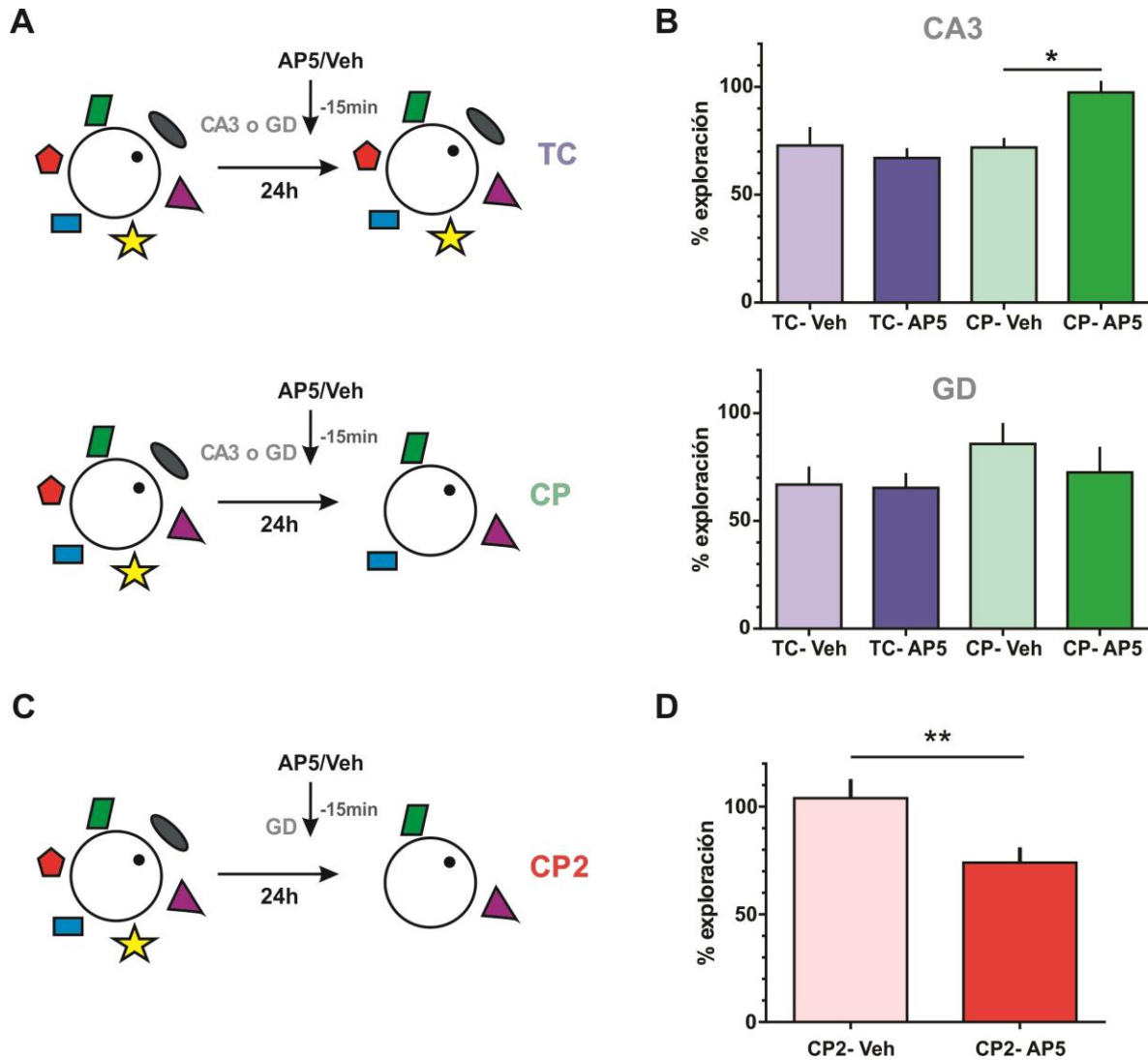


Figura 19. Requerimiento de rNMDAs para la recuperación asociativa de la memoria del objeto en un contexto degradado. (A) Ilustración esquemática de la tarea de EA indicando la infusión de AP5 o Vehículo (Veh) en la región de CA3 del HP 15 minutos antes de la sesión de evaluación en la condición “todas las claves” (TC) o “claves parciales” (CP) de la tarea. (B) Porcentaje de exploración del objeto presentado en presencia de todas las claves (TC) o 3 claves (CP) en la sesión de evaluación respecto al tiempo de exploración en el entrenamiento 24 horas antes en animales infundidos con Vehículo (claro) o AP5 (oscuro) en CA3 (Panel superior) o GD (Panel inferior). ANOVA de dos vías CA3: transformación logarítmica $n=10-11$, $F_{interacción}=4.498$, $p=0.047$, Test Sidak comparaciones múltiples $p_{corregido}=0.042$; ANOVA de dos vías GD: $n=8-9$, $F_{interacción}=0.418$, $p=0.527$, $F_{condición}=1.926$, $p=0.185$, $F_{fármaco}=0.651$, $p=0.432$. (C) Ilustración esquemática de la tarea de evocación asociativa indicando la infusión del antagonista de rNMDAs AP5 o Vehículo en la región de GD del HP 15 minutos antes de la sesión de evaluación en la condición de 2 claves parciales (CP2) de la tarea. (D) Porcentaje de exploración en el contexto en presencia de 2 claves contextuales en la sesión de evaluación respecto al tiempo de exploración en el entrenamiento 24 horas antes en animales infundidos con Veh (claro) o AP5 (oscuro). Test de t pareado $t=3.262$, $p=0.010$, $n=10$. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Las claves contextuales son utilizadas para guiar la evocación de la traza de memoria del objeto en la Prh

Una característica importante de la compleción de patrones es que esta debe permitir evocar toda la memoria a partir de cualquiera de sus partes. Sabemos gracias a la vasta literatura previa en el tema que la evocación puede llevar a la reactivación de la memoria, y esta puede desencadenar un proceso de re-estabilización de la memoria dependiente de síntesis de proteínas que se conoce como reconsolidación ^{167,169,177,573}.

Si la evocación puede llevar a un proceso de labilización de la memoria, en el cual esta es susceptible a inhibidores de la síntesis de proteínas, entonces es posible usar a este proceso como una herramienta para evidenciar la evocación de una memoria. Siguiendo este razonamiento, si inhibimos la síntesis de proteínas luego de la evocación en nuestra sesión de evaluación, podríamos interferir con la reconsolidación de las memorias evocadas durante esta sesión. Entonces, si la información contextual actúa como una clave importante para la reactivación de la memoria del objeto en la Prh, deberíamos ver cambios en el patrón de reconsolidación de las memorias de objetos en la Prh si modificamos la presencia de claves en el contexto durante esta sesión de evaluación ⁵⁷⁴.

Específicamente, esperamos que la traza mnemónica del objeto en la Prh sea sensible a inhibidores de la síntesis de proteínas únicamente si las claves espaciales contextuales presentes son suficientes como para reactivar la traza del objeto. Con este fin, animales entrenados en la tarea de EA (E1) fueron expuestos durante una sesión de evaluación 1 (Ev1) al contexto en el que fueron entrenados 24 horas antes con todas las claves o sin claves pero vacío, es decir en ausencia del objeto al que previamente se había asociado. Inmediatamente después de esta evaluación, se los infundió con Vehículo o el inhibidor de la síntesis de proteínas Emetina. Para evaluar si la memoria del objeto se vió afectada por la Emetina, se realizó una sesión de evaluación 2 (Ev2) en la cual se evaluó la memoria del objeto del entrenamiento contra un objeto novedoso en un contexto familiar pero distinto del contexto de entrenamiento (Fig. 20A). Se evaluaron los índices de discriminación para la sesión de evaluación 2 (Ev2). Los animales infundidos con Vehículo presentaron índices de discriminación significativamente mayores a cero, evidencia de que un entrenamiento de 10 minutos es suficiente para generar memoria del objeto a las 48 hs. Si bien los animales infundidos con Emetina luego de la exposición al contexto SC vacío pudieron discriminar al objeto familiar al día siguiente, los que recibieron Emetina luego de la exposición al contexto TC mostraron índices de discriminación que no difieren

de cero de acuerdo a los test de t de muestra única (SC-Veh $t=4.771$ $p=0.003$, SC-Eme $t=4.216$ $p=0.008$, TC-Veh $t=4.375$ $p=0.005$, TC-Eme $t=1.296$ $p=0.252$). La infusión de Emetina en la Prh luego de la Ev1 en presencia de todas las claves disminuyó significativamente el índice de discriminación respecto a la infusión con Vehículo, pero esta deficiencia no se observó si el contexto de la Ev1 carecía de claves distales (Fig.20B). Estos resultados indican que sólo en presencia de claves distales el contexto es suficiente para guiar la evocación de la memoria y así lograr la reactivación y labilización de la traza del objeto en la Prh.

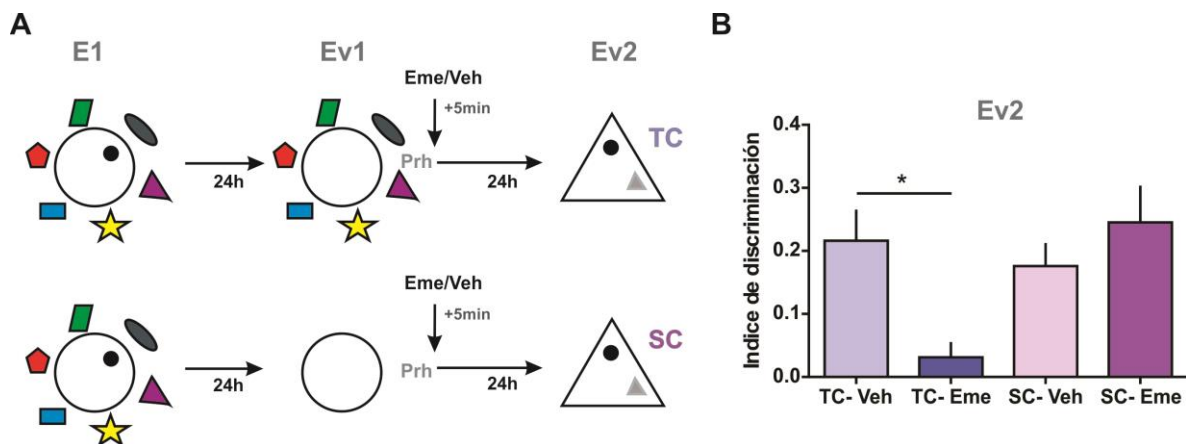


Figura 20. Las claves contextuales son utilizadas para guiar la evocación de la traza de memoria del objeto en la Prh. (A) Ilustración esquemática indicando cómo los animales fueron entrenados en la tarea de EA y a las 24 horas recibieron una sesión de evaluación 1 (Ev1) en donde los animales fueron expuestos a un contexto vacío con "todas las claves" (TC) o "sin claves" (SC) y 5 minutos después recibieron la infusión de Emetina (Eme) o Vehículo (Veh) en la Prh, para finalmente evaluar la memoria del objeto original en la sesión de evaluación 2 (Ev2) que se realizó 24 horas después. (B) Índice de discriminación obtenido durante la Ev2, 24 horas después de la exposición a un contexto vacío con "todas las claves" (TC) o "sin claves" (SC) seguida de la infusión de Emetina (oscuro) o Vehículo (claro). ANOVA de dos vías MR: $F_{interacción}=6.249$, $p=0.029$, $n=6-7$. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$.

Para descartar que la Emetina tenga efectos que no sean dependientes del contexto, durante el entrenamiento expusimos a las ratas a un objeto A en el contexto TC y luego de 2 horas a un objeto C en el contexto SC (E1). Después de 24 horas, los animales fueron expuestos al contexto SC vacío o al contexto TC vacío (Ev1) y recibieron una infusión de Emetina o Vehículo inmediatamente después de la exposición. A las 24 horas de esta primera evaluación, se realizó una sesión de elección o evaluación (Ev2) donde se les presentó el objeto C junto a uno novedoso, o al objeto A frente a otro objeto novedoso en dos ensayos separados por 2 horas (Fig. 21A). El tiempo que las ratas pasaron explorando el objeto A en el contexto TC y el objeto C en el contexto SC durante

la E1 no difirió significativamente (Fig. 21B Panel izquierdo). Sin embargo, cuando se evaluaron los tiempos de exploración de cada objeto en la Ev2, encontramos que únicamente los animales infundidos con Eme luego del contexto SC presentaron amnesia para el objeto C, mientras que la infusión de Eme luego de la exposición al contexto TC no tuvo efecto sobre la retención del objeto C. De la misma forma, sólo los animales infundidos con Eme luego del contexto TC presentaron amnesia para el objeto A, mientras que en los infundidos con Eme luego de la exposición al contexto SC la memoria del objeto A no se vió afectada (Fig. 21B Panel derecho). Esto indica que el efecto de la Emetina sobre la memoria del objeto es específico de la asociación objeto-contexto, porque sólo la traza del objeto que previamente se asoció al contexto presentado durante la Ev1 es sensible a la Emetina. Esto sugiere que el contexto es capaz de guiar la evocación de la memoria del objeto relevante, es decir la asociada con ese contexto, mientras que las memorias de objetos no evocados no son susceptibles a la acción de los inhibidores de la síntesis de proteínas. Esto también descarta la posibilidad de que el contexto SC no posea suficiente información contextual como para ser capaz de reactivar una memoria.

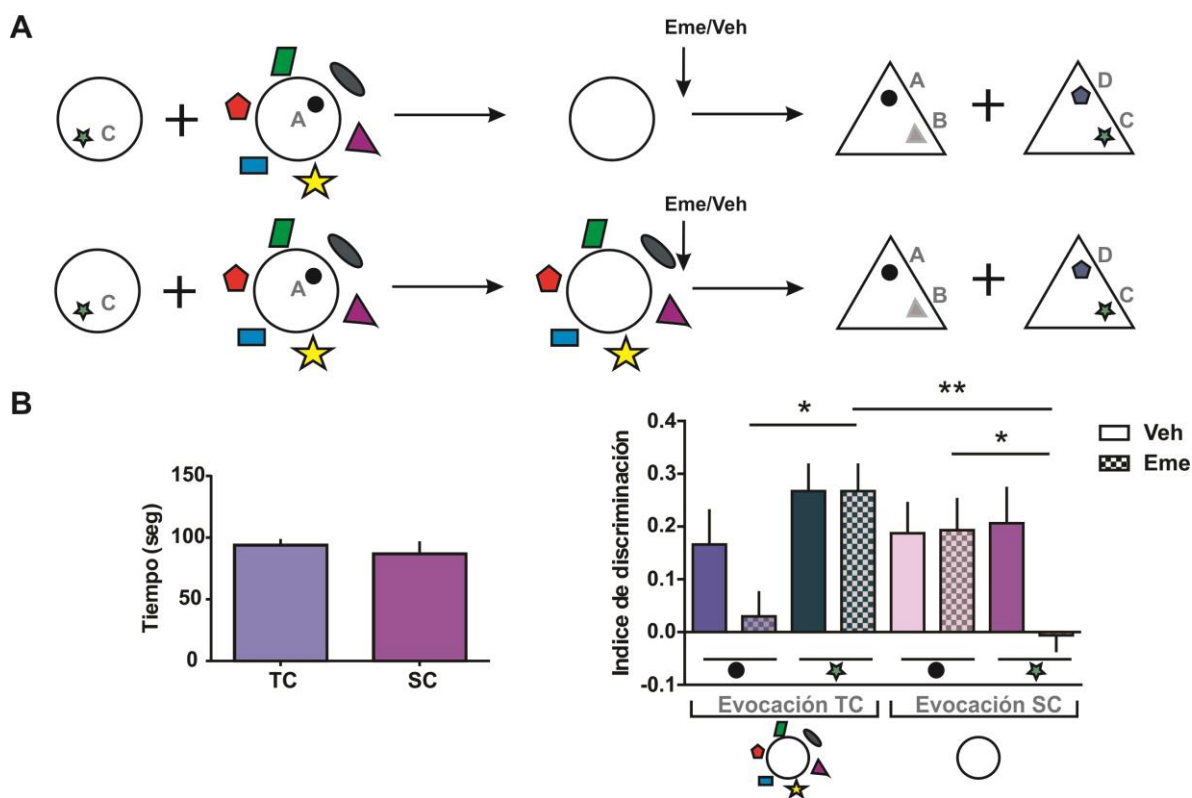


Figura 21. El contexto como guía para la reactivación de la traza de objeto relevante en Prh. (A) Ilustración esquemática indicando el protocolo experimental. Durante el entrenamiento, los animales fueron expuestos al objeto A (círculo) en el contexto TC, y al objeto C (estrella) en el

contexto SC. Luego, recibieron una sesión de evaluación 1 (Ev1) 24 horas más tarde en donde los animales fueron expuestos a un contexto vacío con “todas las claves” (TC) o “sin claves” (SC) y 5 minutos después recibieron la infusión de Emetina (Eme) o Vehículo (Veh) en la Prh. Finalmente, en una sesión de evaluación 2 (Ev2) la memoria de ambos objetos entrenados fue evaluada contra objetos novedosos en un contexto familiar diferente 24 horas más tarde. **(B)** (Panel izquierdo) Tiempo de exploración del objeto durante el entrenamiento en el contexto TC o SC. Test de *t* con datos transformados $t=1.658$ $p=0.121$ $n=6-7$. (Panel derecho) Índice de discriminación obtenido para el objeto A (círculo) y el objeto C (estrella) frente a un objeto novedoso durante la Ev2, 24 horas después de la exposición a un contexto vacío con “todas las claves” (TC) o “sin claves” (SC) seguida de la infusión de Emetina (oscuro) o Vehículo (claro) en la Prh. ANOVA de dos vías MR: $F_{interacción}=2.079$ $p=0.132$, $F_{condición}=4.047$, $p=0.020$, $F_{Eme-Veh}=4.769$, $p=0.039$, $n=6-7$. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Rol de rNMDAs en la recuperación de la traza mnemónica del objeto por compleción a partir de un contexto degradado

Luego nos preguntamos si la evocación de la memoria del objeto se puede dar en presencia de un contexto degradado (como es el de la condición claves parciales). Nuestra predicción de acuerdo a las teorías computacionales de compleción de patrones es que la presentación de un contexto o ciertas claves familiares puede llevar a la activación de la memoria hipocampal relevante de objeto en contexto a través de un proceso de “compleción de patrones”, y así generar la reactivación de la representación del ítem asociado a ese contexto en la Prh. Si en la condición de CP las ratas logran evocar toda la memoria partiendo de un contexto degradado, deberíamos ver el mismo patrón de resultados que en la condición TC. Más aún, si en la condición CP los animales realizan compleción de patrones y los rNMDAs son necesarios para este proceso, entonces antagonistas de rNMDAs previos a la Ev1 deberían interferir con la capacidad de recuperar la memoria frente a un contexto degradado (y no así frente al contexto original), y esto debería evidenciarse como la ausencia de labilización de la memoria del objeto en Prh específicamente en la condición CP (y no TC) frente a la infusión de AP5 en CA3. Con el fin de evidenciar si la presencia de 3 claves contextuales es suficiente como para generar la reactivación de la memoria del objeto en la Prh, evaluamos animales en la versión CP y TC de la tarea de EA e inmediatamente después infundimos Emetina en Prh. Además, para ver si el AP5 en CA3 es capaz de interferir con la capacidad de compleción de patrones y de esta forma afectar el patrón de labilización observado durante la evocación en presencia de CP infundimos AP5 o Vehículo 15 minutos antes de la sesión de evaluación en el contexto TC o CP (Fig. 22A).

La infusión de Emetina en la Prh inmediatamente después de la exposición al contexto con claves parciales y vacío fue suficiente para generar amnesia del objeto previamente visto en ese contexto, lo que sugiere que las ratas pueden evocar la totalidad la memoria original del objeto en contexto partiendo de un contexto degradado (Fig. 22B (1)). Sin embargo, en animales infundidos con AP5 en la región de CA3 del HP previo a la Ev1 la infusión posterior de Emetina en la Prh no tuvo efecto sobre la retención de la memoria (test de t de muestra única: Veh-Veh $t=5.829$ $p=0.0003$, Veh-Veh $t=3.234$ $p=0.010$, AP5-Veh $t=1.437$ $p=0.181$, Eme-Veh $t=3.896$ $p=0.0030$; Eme-AP5 $t=0.8898$ $p=0.3996$).

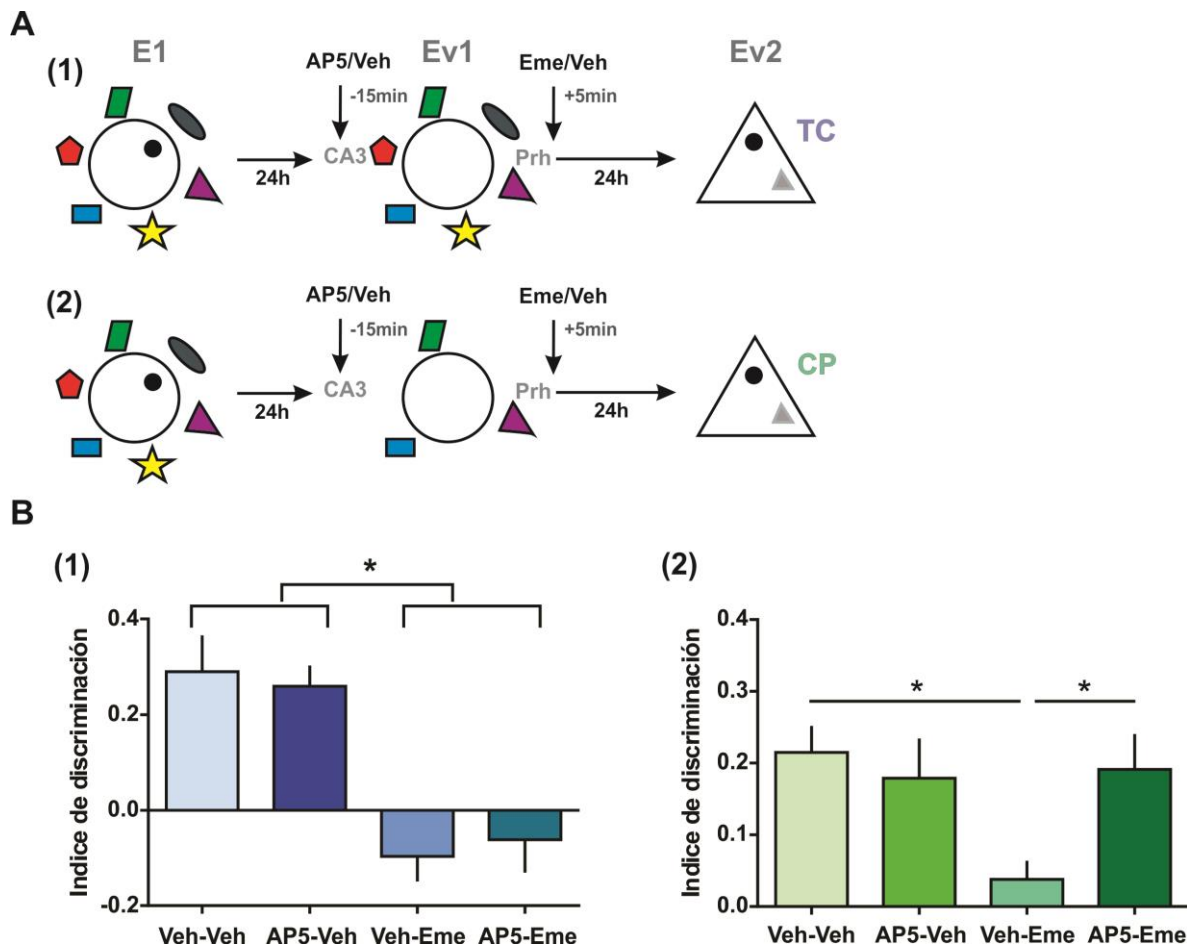


Figura 22. Rol de rNMDAs en la recuperación de la traza mnemática del objeto por completación a partir de un contexto degradado. (A) Ilustración esquemática indicando el protocolo experimental utilizado. Los animales fueron entrenados en la tarea de EA, y a las 24 horas recibieron una sesión de evaluación 1 (Ev1) en donde recibieron una infusión de Veh o AP5 en CA3 y 15 minutos más tarde fueron expuestos a un contexto vacío con “todas las claves” (TC)(1) o “claves parciales” (CP)(2), e inmediatamente después recibieron una infusión de Emetina o Vehículo en la Prh. Finalmente, 24 horas más tarde se evaluó la memoria del objeto original en la sesión de evaluación 2 (Ev2). (B) (1) Índice de discriminación durante la Ev2, 24 horas después de la exposición a un contexto vacío con “todas las claves” (TC) seguida de la infusión de Emetina o Vehículo, en animales que recibieron AP5 o Veh previo a la exposición contextual. ANOVA de dos

vías: $F_{interacción}=0.260$ $p=0.618$, $F_{Veh-Eme}=35.93$ $p<0.0001$, $F_{Veh-AP5}=0.001$ $p=0.970$, $n=8-9$. (2) Índice de discriminación durante la Ev2, 24 horas después de la exposición a un contexto vacío con “claves parciales” (CP) seguida de la infusión de Emetina o Vehículo, en animales que recibieron AP5 o Veh previo a la exposición contextual. ANOVA de dos vías: $F_{interacción}=4.420$ $p=0.049$, $n=10-11$. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$.

Por otro lado, cuando la infusión de AP5 se realizó luego de la exposición al contexto en presencia de todas las claves espaciales, la infusión de Emetina en Prh provocó amnesia del objeto evaluado 24 horas más tarde independientemente de si los animales fueron infundidos con AP5 o Vehículo previo a la exposición al contexto en la Ev1, indicando que el AP5 no tiene efecto sobre la reactivación de la memoria y consecuente labilización de la memoria del objeto en Prh cuando el contexto utilizado para guiar la evocación es el original con todas las claves (Fig. 22B (2)). Este resultado, sumado a que el número de alzadas en el grupo infundido con AP5 previo al Ev1 no presentó diferencias significativas respecto al infundido con Veh (test de t pareado: $t=0.843$, $p=0.409$), permite descartar que el efecto de AP5 se deba a cambios en la labilización de la memoria inducidos por el AP5 o a cambios inespecíficos en los niveles de exploración en la arena durante la Ev1.

Ambos grupos infundidos con Vehículo en la Prh (independientemente de si recibieron o no AP5 previo a la exposición al contexto TC en la Ev1) lograron discriminar al objeto novedoso 48hs después del entrenamiento original, pero la Emetina provocó amnesia del objeto tanto el grupo Veh-Eme como el grupo AP5-Eme, que presentaron índices de discriminación que no difirieron de cero en la Ev2 (Veh-Veh $t=3.812$ $p=0.007$, Veh-Veh $t=3.812$ $p=0.007$, AP5-Veh $t=5.975$ $p=0.0006$, Eme-Veh $t=1.852$ $p=0.101$; Eme-AP5 $t=0.8898$ $p=0.3996$).

Estos resultados reafirman que la tarea de EA en roedores es un modelo adecuado para el estudio del proceso de compleción de patrones, ya que en esta tarea las ratas consiguen recuperar toda la memoria (tanto del contexto original como del objeto) a partir de sólo algunas de las claves espaciales presentes en el evento original. Además, demuestran que los rNMDAs en la región de CA3 son necesarios para la reactivación de de la memoria del objeto en la Prh a partir de un contexto degradado, pero no cuando la reactivación es guiada por el contexto original, lo que es consistente con un rol de los rNMDAs en el proceso de compleción de patrones.

Modulación bidireccional de rNMDAs en el circuito GD/CA3 sobre la capacidad de recuperar la memoria original en presencia de claves parciales

A partir de los resultados anteriores, parece razonable hipotetizar que si la actividad de los rNMDAs en el GD es importante para la separación de patrones, deberíamos poder aumentar la capacidad de separación de patrones del sistema hipocampal si aumentamos la actividad de los rNMDAs en el GD. En un contexto lo suficientemente similar al original como para que en el procesamiento hipocampal domine la vía que lleva a la compleción de patrones y evocación de la memoria original, deberíamos entonces poder ver fortalecida la adquisición de una nueva memoria por sobre la evocación de una anterior si favorecemos el procesamiento asociado con la separación de patrones utilizando agonistas de rNMDAs en el GD.

Con este fin, evaluamos animales entrenados en la tarea EA e infundidos con el agonista parcial del sitio de glicina de los rNMDAs D-Cicloserina (D-Cic) o Veh en el GD 15 minutos antes de exponerlos al contexto CP, en el que sabemos los animales son capaces de realizar compleción de patrones a nivel conductual, es decir evocar la memoria del objeto en contexto. De acuerdo con lo esperado, el grupo de animales infundidos con D-Cic en GD previo a la evaluación presentó porcentajes de exploración significativamente mayores que los del grupo Veh (Fig. 23B). Test de t de muestra única evidencian que las ratas infundidas con Veh presentan una disminución en el tiempo de exploración respecto al entrenamiento pero en los infundidos con D-Cic no se ve esta disminución (test de t de muestra única: Veh $t=4.518$ $p=0.002$; D-Cic $t=0.5448$ $p=0.601$). Estos resultados evidencian que la actividad de rNMDAs en GD disminuye la capacidad de realizar compleción de patrones en un contexto degradado, sugiriendo que potenciar cambios plásticos en el GD podría favorecer un procesamiento de tipo separación de patrones sobre el procesamiento de tipo compleción de patrones en el circuito hipocampal y así dar como resultado una disminución en la evocación de memorias en presencia de claves parciales.

Siguiendo la misma línea de razonamiento, si los rNMDAs en la región de CA3 del HP son importantes para la función de compleción de patrones de esta región, entonces deberíamos poder aumentar la capacidad de compleción del sistema si aumentamos la actividad de los rNMDAs en CA3. Entonces, si utilizamos un contexto lo suficientemente distinto al original de forma tal que en el procesamiento hipocampal dominen los procesos de ortogonalización de las representaciones y consecuente adquisición de una nueva

memoria, agonistas de rNMDAs en CA3 deberían favorecer un proceso de tipo completación de patrones a nivel hipocampal, lo que a nivel conductual debería observarse como un aumento en la evocación en una condición de claves parciales.

Para poder evidenciar este aumento, usamos una versión de la tarea en la cual el contexto en la fase de evaluación sólo tiene 2 claves (CP2) que, como ya vimos en experimentos anteriores, no es suficiente para generar la evocación de la memoria original del objeto en contexto (Fig. 19D). Las ratas fueron entrenadas a la tarea de EA, y durante la fase de evaluación se las infundió con D-Cic o Vehículo en la región de CA3 del HP y 15 minutos después de la infusión se las expuso al objeto en un contexto con sólo 2 claves espaciales (CP2) (Fig. 23C). Si bien durante la evaluación, el grupo Veh mostró un porcentaje de exploración que no fue significativamente distinto del 100% (de acuerdo a los test de t de muestra única) sugiriendo que el contexto CP2 no fue lo suficientemente similar al original como para desencadenar la evocación de la memoria, el grupo D-Cic presentó un porcentaje de exploración significativamente distinto del 100% indicando memoria para el objeto en el contexto (test de t de muestra única: Veh $t=0.308$, $p=0.767$; D-Cic $t=4.145$, $p=0.003$). Efectivamente, la infusión D-Cic en CA3 previa a la evaluación en el contexto CP2 disminuyó significativamente el porcentaje de exploración en este contexto respecto a la infusión de Veh (Fig. 23D).

Estos resultados no pueden explicarse por un daño hipocampal inespecífico de la droga porque la tinción con safranina no reveló ninguna lesión en los sitios de la infusión, es decir la región de CA3 o el GD (Fig. 23F). Estos resultados tampoco se deben a un efecto inespecífico de la D-Cic sobre la exploración o la motivación ya que la infusión de D-Cic no modificó significativamente el porcentaje de exploración respecto al grupo Veh cuando se lo infundió 15 minutos antes de una sesión de exposición a un objeto en el ambiente en presencia de todas las claves espaciales, ya sea en GD o en CA3 (Fig. 23E). Los resultados sugieren que manipulando mecanismos plásticos en las regiones de CA3/GD podríamos estar afectando el balance a nivel de procesamiento hipocampal de los procesos de separación de patrones y completación de patrones, cuyo rol podría ser crucial para controlar la coordinación entre la evocación de memorias preexistentes y la formación de nuevas memorias.

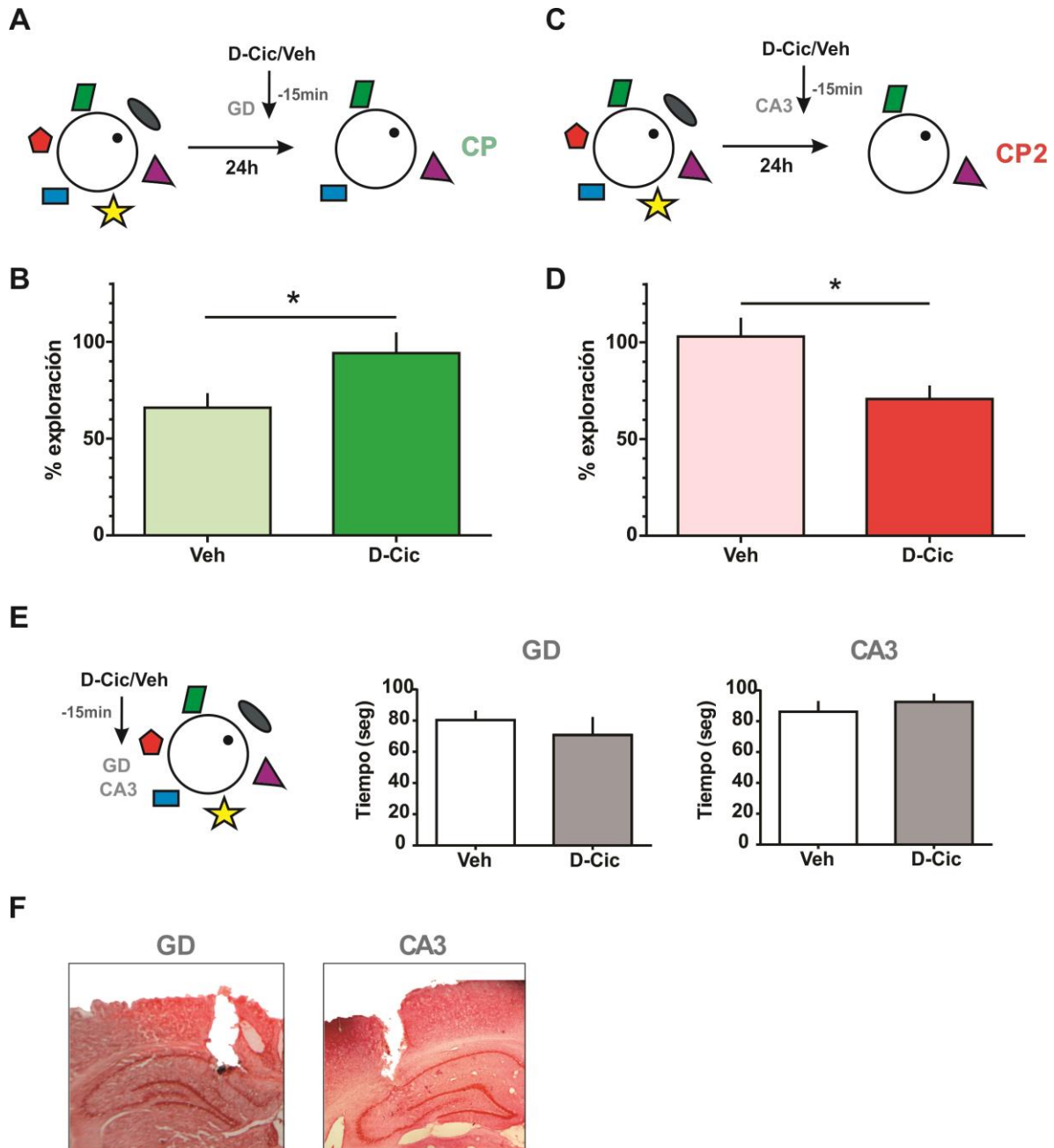


Figura 23. Agonistas de rNMDAs en el GD disminuyen la capacidad de recuperación de la memoria en presencia de claves parciales, mientras que en CA3 promueven la recuperación de la memoria. (A) Ilustración esquemática de la tarea de EA indicando la infusión del agonista de rNMDAs D-Cicloserina (D-Cic) o Vehículo (Veh) en el GD del HP 15 minutos antes de la sesión de evaluación en la condición “claves parciales” (CP, verde) de la tarea. **(B)** Porcentaje de exploración del objeto presentado en presencia de 3 claves (CP) en la sesión de evaluación respecto al tiempo de exploración en el entrenamiento 24 horas antes en animales infundidos con Vehículo (claro) o D-Cic (oscuro) en el GD. Test de t pareado: $t=2.309$ $p=0.0498$, $n=9$. **(C)** Ilustración esquemática de la tarea de EA indicando la infusión de D-Cic o Veh en la región de CA3 (derecha) del HP 15 minutos antes de la sesión de evaluación en la condición de “2 claves parciales” (CP2, rojo) de la

tarea. **(D)** Porcentaje de exploración del objeto presentado en presencia de 2 claves (CP2) en la sesión de evaluación respecto al tiempo de exploración en el entrenamiento 24 horas antes en animales infundidos con Vehículo (claro) o D-Cic (oscuro) en CA3. Test de t pareado: $t=3.032$ $p=0.016$, $n=9$. **(E)** (Panel izquierdo) Ilustración esquemática indicando la infusión de D-Cic o Veh en la región de GD o CA3 del HP 15 minutos antes de la exposición al contexto de EA en presencia de todas las claves. (Panel derecho) Tiempo de exploración del objeto durante la sesión de exposición 15 minutos después de la infusión de D-Cic o Veh en el GD (izquierda) o CA3 (derecha). Test de t pareado: $t_{GD}=0.670$ $p=0.528$ $n=7$; $t_{CA3}=0.677$ $p=0.524$, $n=7$. **(F)** Imagen de tinción con safranina de un corte coronal de cerebro de una rata canulada en el GD del HP (izquierda) o en CA3 (derecha). Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$.

BDNF actúa como modulador bidireccional en el circuito GD/CA3 favoreciendo la adquisición de una nueva memoria o la evocación de una preexistente

Por otra parte, trabajos recientes del laboratorio indican que el factor neurotrófico BDNF en el GD es necesario durante la consolidación de memorias espaciales similares y que el BDNF actúa a través de neuronas inmaduras del GD en este proceso de diferenciación, sugiriendo un rol del BDNF en la separación de patrones de las representaciones neuronales que subyacen a estas memorias ^{247,540}.

Además, como vimos en el capítulo anterior, el BDNF interactúa con los rNMDAs para mediar esta función de separación de patrones comportamental ⁵⁷⁵, lo cual lo hace un candidato ideal para el estudio de los mecanismos moleculares que regulan el balance de separación de patrones/compleción de patrones en el procesamiento hipocampal. Teniendo esto en cuenta, decidimos evaluar si BDNF puede actuar modulando el balance adquisición/evocación en la tarea de EA. Nuestra predicción era que si BDNF es capaz de promover la diferenciación de memorias, entonces deberíamos observar una disminución en la evocación en condiciones contextuales degradadas.

Para evaluar este efecto, ratas entrenadas en la tarea de EA fueron infundidas con BDNF recombinante humano o Vehículo en el GD 10 minutos antes de la fase de evaluación en un contexto CP (Fig. 24A y C). Encontramos que los animales infundidos con BDNF previo a la evaluación en el contexto CP presentaron porcentajes de discriminación significativamente mayores que los infundidos con Veh. Mientras que el grupo Veh BDNF exploró significativamente menos que en el entrenamiento indicando memoria del objeto en el contexto, el grupo BDNF exploró al objeto un tiempo equivalente al del entrenamiento (test de t de muestra única: Veh $t=5.105$, $p=0.0006$; BDNF $t=0.009$, $p=0.993$) (Fig. 24B). En contraste, la infusión de BDNF en la región de CA3 previo a la evaluación en el contexto CP2 provocó una disminución significativa en el porcentaje de

exploración. De acuerdo a test de t de muestra única, ratas infundidas con Veh demostraron indicios de memoria en la evaluación, pero las infundidas con BDNF no presentan memoria del objeto en contexto (Veh $t=1.841$, $p=0.108$; BDNF $t=2.825$, $p=0.026$) (Fig. 24D). Además, estos resultados no se explican por efectos inespecíficos del BDNF sobre la exploración dado que la infusión de BDNF en GD y en CA3 10 minutos antes de la exposición al contexto original no tuvo ningún efecto sobre el tiempo de exploración en relación a los valores obtenidos para el grupo Veh (Fig.24E). Estos resultados sugieren un efecto diferencial del BDNF en forma dependiente de la subregión hipocampal: mientras que en el GD el BDNF disminuye en la evocación de la memoria del contexto en presencia de claves incompletas (consistente con un rol del BDNF en GD en la adquisición y separación de patrones), en la región de CA3 promueve la evocación en un contexto degradado (consistente con un rol promotor de la compleción de patrones).

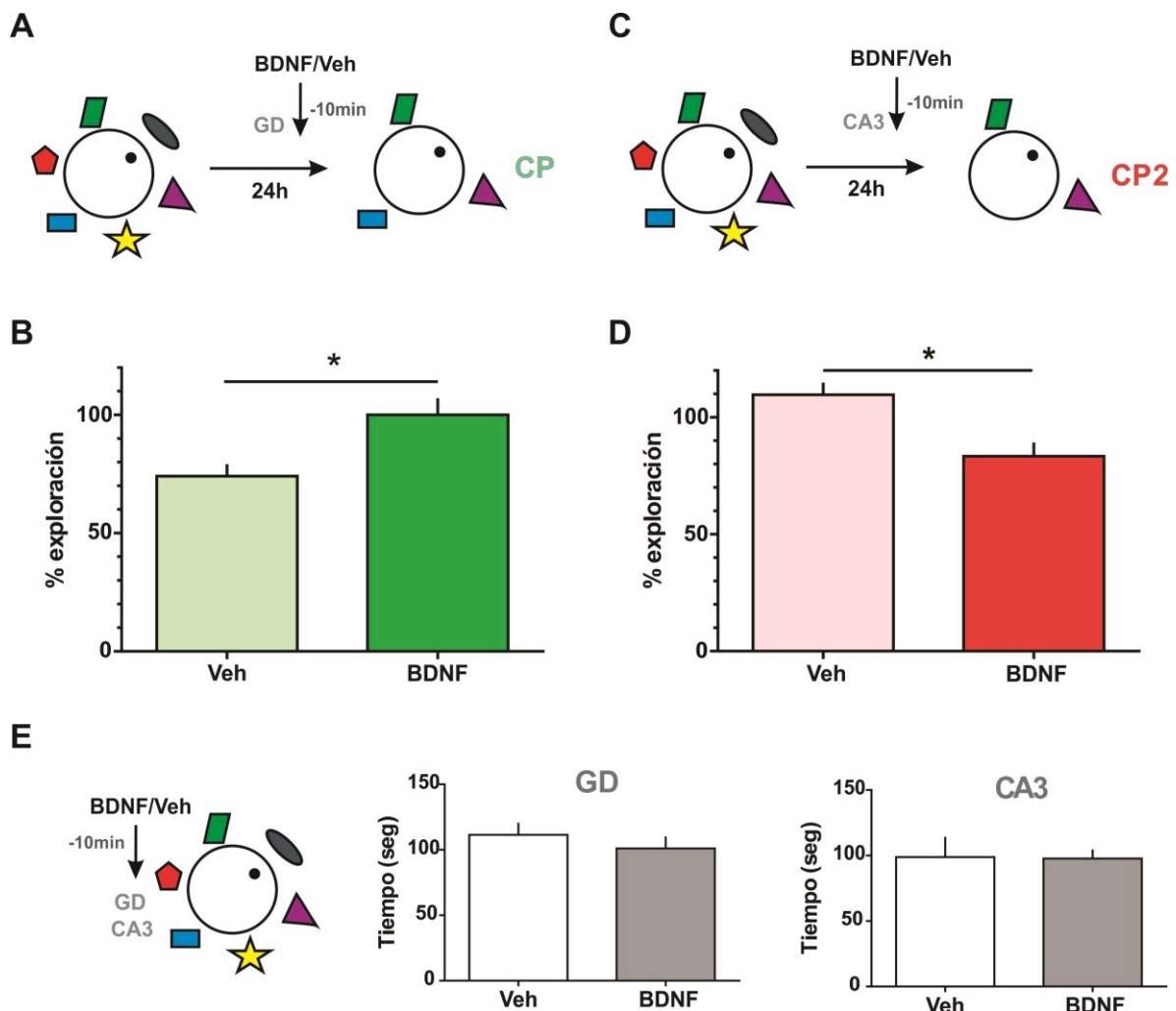


Figura 24. BDNF actúa como modulador en el GD y CA3 favoreciendo procesamiento para la adquisición de una nueva memoria o la evocación de una preexistente. (A) Ilustración

esquemática de la tarea de EA indicando la infusión de BDNF recombinante humano (BDNF) o Vehículo (Veh) en el GD del HP 10 minutos antes de la sesión de evaluación en la condición “claves parciales” (CP, verde) de la tarea. **(B)** Porcentaje de exploración del objeto presentado en presencia de 3 claves (CP) en la sesión de evaluación respecto al tiempo de exploración en el entrenamiento 24 horas antes en animales infundidos con Vehículo (claro) o BDNF (oscuro) en el GD. Test de *t* pareado: $t=2.484$ $p=0.035$, $n=10$. **(C)** Ilustración esquemática de la tarea de EA indicando la infusión de BDNF (BDNF) o Vehículo (Veh) en la región de CA3 (derecha) del HP 10 minutos antes de la sesión de evaluación en la condición de “2 claves parciales” (CP2, rojo) de la tarea. **(D)** Porcentaje de exploración del objeto presentado en presencia de 2 claves (CP2) en la sesión de evaluación respecto al tiempo de exploración en el entrenamiento 24 horas antes en animales infundidos con Vehículo (claro) o BDNF (oscuro) en CA3. Test de *t* pareado: $t=3.239$ $p=0.014$, $n=8$. **(E)** (Panel izquierdo) Ilustración esquemática indicando la infusión BDNF recombinante humano (BDNF) o Vehículo (Veh) en la región de GD o CA3 del HP 10 minutos antes de la exposición al contexto de EA en presencia de todas las claves. (Panel derecho) Tiempo de exploración del objeto durante la sesión de exposición 10 minutos después de la infusión de BDNF o Veh en el GD (izquierda) o CA3 (derecha). Test de *t* pareado: GD $t=0.090$ $p=0.934$ $n=8$; CA3 GD $t=0.571$ $p=0.598$ $n=5$. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$.

Gran parte de los efectos de BDNF están mediados por la activación del receptor TrkB, cuya fosforilación entre otras cosas activa la vía de Erk ^{576,577}. Para evaluar si el BDNF endógeno presente en las regiones de GD/CA3 participa modulando el balance entre evocación/adquisición a través de acciones mediadas por su receptor TrkB, infundimos a animales 15 minutos antes de la tarea de EA con el antagonista no competitivo de TrkB ANA-12 o Veh en CA3 o GD (Fig. 25A y B). Cuando se infundió ANA-12 en CA3 previamente a la sesión de evaluación en la condición CP de la tarea no se encontraron diferencias significativas entre el grupo ANA-12 y el grupo Veh en el porcentaje de exploración respecto al entrenamiento (Fig. 25B). Sin embargo, cuando se lo infundió en GD previamente a la sesión de evaluación en la condición CP2 de la tarea, se observó que el ANA-12 disminuyó significativamente el porcentaje de exploración respecto al Veh (Fig. 25D). ANA-12 no tuvo efecto sobre el tiempo de exploración cuando fue infundido en el GD previo a la exposición a un objeto en el contexto con todas las claves (Fig. 25E), indicando que este efecto no está causado por cambios inespecíficos inducidos por ANA-12 sobre los niveles de exploración. Estos resultados parecen indicar que la acción de BDNF vía receptores TrkB en el GD favorece la adquisición de nueva información por sobre la evocación de la memoria original en una condición de claves contextuales altamente degradadas (consistente con el rol previamente descrito de BDNF en GD para la separación de patrones comportamental), y que la inactivación de la vía por ANA-12 al afectar este proceso favorece la evocación de la memoria original en condiciones en las que esta normalmente no sucedía. Por otra parte, la ausencia de efecto del ANA-12 en la

región de CA3 sugiere que el BDNF endógeno en esta región no cumple un rol en la capacidad de evocar en presencia de claves parciales o lo hace a través de otro receptor distinto de TrkB. Estos resultados, sumados a los anteriores, son un fuerte indicio de que en condiciones normales el BDNF endógeno tiene un efecto región-específico a nivel hipocampal sobre el balance adquisición/evocación, actuando preferencialmente en el GD y favoreciendo un procesamiento de adquisición de información novedosa por sobre la evocación.

Por otra parte, para confirmar el efecto de alterar mecanismos moleculares en GD involucrados en la diferenciación de memorias similares (como es el caso de BDNF) sobre la capacidad de evocar la memoria del objeto en presencia de un contexto degradado, estudiamos cómo se ve afectado el patrón de reconsolidación en un contexto altamente degradado (CP2) al inhibir la vía de señalización dependiente de TrkB en GD. La predicción es que si la acción de BDNF en GD es necesaria para la separación de patrones, afectar esta vía podría llevar el balance (que en condiciones normales en un contexto CP2 implica el reconocimiento del contexto como novedoso) hacia un procesamiento que favorezca la evocación de la memoria del objeto en contexto. Para esto, realizamos infusiones de ANA-12 en GD 15 minutos antes de una sesión de evaluación Ev1 en presencia del contexto con 2 claves pero en ausencia del objeto, y Emetina en Prh inmediatamente después del Ev1 (Fig. 25F *panel izquierdo*). Lo que observamos en la evaluación Ev2 es que, mientras que los animales infundidos con Veh en Prh mostraron memoria del objeto independientemente de lo infundido en GD, los animales infundidos con Eme en Prh y Veh en GD preservaron la memoria del objeto original. Esto sugiere que la presencia de un contexto con 2 claves no es suficiente como para guiar la evocación del objeto visto durante el entrenamiento. Sin embargo, cuando se infundió ANA-12 en GD y Eme en Prh no se observó memoria del objeto en la Ev2, indicando que el ANA-12 en GD es capaz de favorecer la evocación de la memoria original del objeto en contexto en un contexto altamente degradado, que normalmente es incapaz de guiar esta evocación.

Los resultados enumerados en este capítulo evidencian que las funciones de ortogonalización y de compleción compiten por el control cognitivo de la estrategia mnemónica a utilizar en condiciones de claves espaciales parciales. El compromiso diferencial de las distintas subregiones del sistema hipocampal para la implementación de cada una de estas funciones cognitivas nos permitió estudiar su interacción. Los resultados de este estudio sugieren que el desenlace conductual en una condición de

claves espaciales parciales va a depender del balance entre estas dos funciones, que de acuerdo con nuestros resultados parece ser regulado en última instancia por cambios plásticos en las regiones de CA3 y GD.

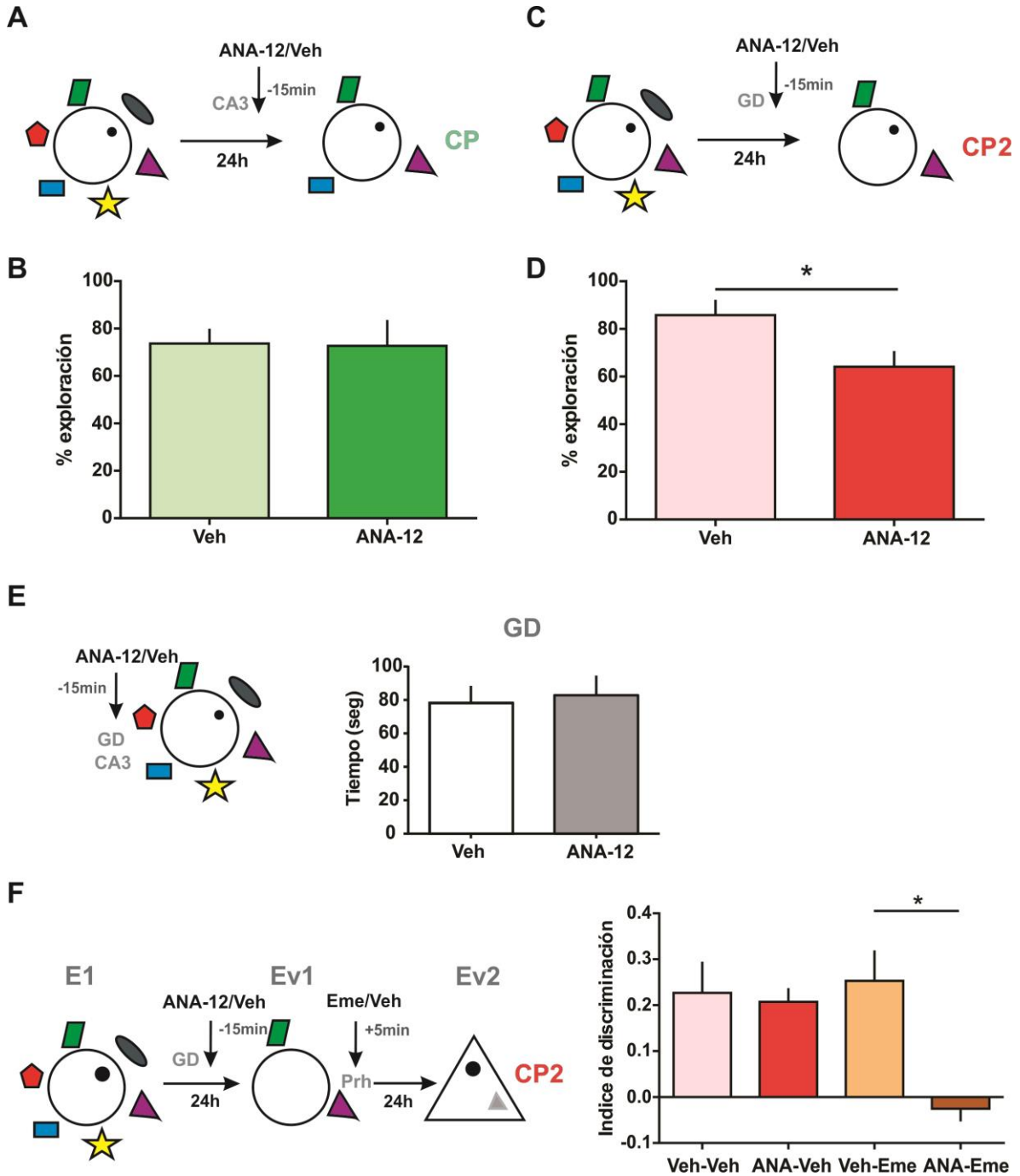


Figura 25. BDNF actúa a través de los receptores TrkB como modulador en el GD de la capacidad de evocar memorias en presencia de claves parciales. (A) Ilustración esquemática de la tarea de EA indicando la infusión de ANA-12 o Vehículo (Veh) en la región de CA3 del HP 15

minutos antes de la sesión de evaluación en la condición “claves parciales” (CP, verde) de la tarea. **(B)** Porcentaje de exploración del objeto presentado en presencia de 3 claves (CP) en la sesión de evaluación respecto al tiempo de exploración en el entrenamiento 24 horas antes en animales infundidos con Vehículo (claro) o ANA-12 (oscuro) en CA3. Test de t pareado: $t=0.106$ $p=0.919$, $n=7$. **(C)** Ilustración esquemática de la tarea de EA indicando la infusión de ANA-12 o Veh en el GD del HP 15 minutos antes de la sesión de evaluación en la condición de “2 claves parciales” (CP2, rojo) de la tarea. **(D)** Porcentaje de exploración del objeto presentado en presencia de 2 claves (CP2) en la sesión de evaluación respecto al tiempo de exploración en el entrenamiento 24 horas antes en animales infundidos con Vehículo (claro) o ANA-12 (oscuro) en el GD. Test de t pareado: $t=2.489$ $p=0.047$, $n=7$. **(E)** (Panel izquierdo) Ilustración esquemática indicando la infusión de ANA-12 o Veh en la región de GD o CA3 del HP 10 minutos antes de la exposición al contexto de EA en presencia de todas las claves. (Panel derecho) Tiempo de exploración del objeto durante la sesión de exposición 15 minutos después de la infusión de ANA-12 o Veh en el GD (izquierda) o CA3 (derecha). Test de t pareado: GD $t=0.372$ $p=0.725$ $n=6$. **(F)** Índice de discriminación durante la Ev2, 24 horas después de la exposición a un contexto vacío con “2 claves parciales” (CP2) seguida de la infusión de Emetina o Vehículo, en animales que recibieron ANA-12 o Veh previo a la exposición contextual. ANOVA de dos vías: $F_{interacción}=6.211$ $p=0.034$, $n=5-6$. Los datos se expresan como la media \pm EE; * $p < 0.05$.

En particular, los resultados indican un rol de mecanismos moleculares como la acción de BDNF y la activación de rNMDAs en la regulación de estos dos procesos, ya que manipulaciones bidireccionales y región–selectivas de estos mecanismos modulan las funciones cognitivas mencionadas, llevando a un desplazamiento de la performance hacia manifestaciones más compatibles con la adquisición de una nueva memoria o la evocación de la memoria original, según el caso.

Discusión

En esta tesis, nos propusimos comprender que mecanismos biológicos regulan los procesos de separación de patrones y compleción de patrones a nivel comportamental, entendidos como funciones cognitivas que permiten un correcto funcionamiento de la adquisición y evocación de memorias. Se buscó evaluar tanto los mecanismos moleculares como las regiones del cerebro que participan de estos procesos, y entender cómo se da el balance entre la adquisición de nuevas memorias y la evocación de memorias previas en presencia de estímulos similares.

La función mnemónica de separación de patrones es muy importante para la codificación diferenciada de información episódica, que permite la correcta evocación de la memoria. Sin embargo, se sabe muy poco sobre la señalización intracelular y las vías de expresión génica implicadas en esta función. Además, muy pocos estudios han evaluado la función de separación de patrones en memorias no espaciales ^{578,579}. En particular, dado el rol crucial de la Prh para la adquisición y almacenamiento de memorias de objetos, la hipótesis de este trabajo era que la Prh podría actuar como separador de patrones para las representaciones de objetos, y así permitir diferenciar representaciones de objetos similares. En el trabajo describimos un rol crucial de las proteínas asociadas a plasticidad sináptica BDNF, Arc y los rNMDAs como posibles mediadores de cambios plásticos en el proceso de separación de patrones relacionado con la formación y consolidación de representaciones mnemónicas diferenciables de estímulos similares, tanto en memorias espaciales como no espaciales. Usando una tarea de REO que nos permite evaluar el uso a nivel comportamental de las representaciones diferenciadas y en la que es posible manipular el nivel de similitud de los objetos a codificar, encontramos fallas en el desempeño que son dependientes de la carga de separación de patrones de la tarea tanto realizando manipulaciones en GD como en Prh. En la Prh, estos cambios son necesarios únicamente para la diferenciación de memorias de objetos similares, pero no memorias espaciales similares. En cambio, en el GD del HP estas proteínas también participan de la consolidación de memorias similares, pero en este caso tienen un rol que es independiente del tipo de estímulo (espacial/no espacial). Los resultados de este trabajo son consistentes con la idea de que mecanismos moleculares específicos como el aumento de expresión de Arc y BDNF en GD son requeridos durante la consolidación de memorias similares para el almacenamiento en forma diferenciada de sus

representaciones mnemónicas. Sin embargo, los resultados sugieren que el GD tendría un rol transitorio, y podría no ser una estructura crucial para la evocación de estas memorias diferenciadas, implicando que las células granulares del GD podrían no formar parte de la traza de estas memorias diferenciadas, a diferencia de la Prh. Además, en esta tesis postulamos a Arc y a los rNMDAs como posibles efectores de los cambios plásticos inducidos por BDNF para el almacenamiento de representaciones diferenciadas. Como conclusión, nuestros resultados hablan de una interacción compleja entre Prh y GD para la separación de representaciones de objetos, asignándole un rol clave a la Prh como una estructura en la que estas representaciones se almacenan en forma diferenciada.

Por otra parte, nuestros resultados evidencian la presencia de un balance en el procesamiento en la región de CA3 y el GD del HP que es capaz de regular el compromiso presente entre la adquisición de memorias nuevas y la evocación de memorias anteriores, y postulan a los rNMDAs en CA3 y GD, y al BDNF en el GD como factores clave en este balance.

Mecanismos moleculares en la corteza perirrinal y giro dentado selectivamente necesarios para la diferenciación en la memoria de trazas de objetos y espaciales.

Si bien es posible que el GD sea un separador de patrones general para todo tipo de representaciones (independiente de la categoría), teóricamente también otras regiones podrían realizar la computación necesaria para actuar como separadores de patrones. Teniendo en cuenta los estudios de los últimos años que abogan por una disociación funcional de estructuras basada en categorías o dominios, es posible que distintas regiones contribuyan diferencialmente a este proceso dependiendo de la naturaleza del estímulo a diferenciar ^{7,26,580}. En el primer capítulo, evaluamos los mecanismos moleculares que subyacen a la capacidad de separar experiencias similares en representaciones mnemónicas distintas (que se cree que resultan del mecanismo computacional de separación de patrones), y comparamos el reclutamiento de estos mecanismos moleculares en memorias espaciales y no espaciales. Encontramos que mecanismos moleculares asociados con cambios plásticos, como BDNF y Arc, se reclutan en la Prh durante la formación de memorias de objetos en forma dependiente de la similitud de las memorias a discriminar, y algo análogo ocurre en el GD en memorias

espaciales (ver Bekinschtein et al.²⁴⁷ y Fig. 12). Sin embargo, la expresión de Arc en la Prh no es necesaria para la discriminación de memorias espaciales similares, lo que indica que los procesos moleculares que son reclutados en esta estructura dependen del tipo de representaciones que son necesarias para resolver la tarea.

Por otra parte, en este trabajo exploramos los eventos moleculares críticos subyacentes al proceso de separación de patrones. Evaluamos la posibilidad de que la separación de patrones comportamental ocurra en una escala de tiempo concordante con la consolidación de la memoria (y no la adquisición), y por lo tanto reclute mecanismos particularmente asociados con esta etapa de la memoria. Varios resultados nos permiten hablar de efectos selectivos de Arc sobre la consolidación de la memoria: 1) el efecto de Arc-ASO está restringido en el tiempo ya que la infusión del ODN Arc-ASO a 3 h ya no tiene efecto, 2) la amnesia causada por Arc-ASO depende del intervalo de tiempo entre "entrenamiento" y "test", ya que a intervalos breves como a las 3h no afecta a la memoria, pero a las 24 h causa amnesia; 4) Arc aumenta su expresión a la hora luego de encontrar objetos similares y no frente a objetos disímiles, es decir de acuerdo a la necesidad de separación de patrones del sistema. Aunque los mecanismos moleculares necesarios para la consolidación de memorias en Prh se han evaluado previamente ^{319,581}, los estudios previos se han enfocado en efectos dependientes del tiempo de retención, que sugieren el rol de estos mecanismos en la persistencia de la memoria pero no indican un efecto específico de estas moléculas sobre la separación de patrones estudiada a nivel comportamental, es decir un reclutamiento de estas moléculas en forma dependiente del grado de similitud de las memorias a discriminar. Por primera vez, encontramos que, para un mismo intervalo de tiempo, moléculas asociadas a plasticidad como Arc y BDNF son necesarias en la Prh únicamente en tareas con una alta carga de separación de patrones indicando que estas participan de mecanismos que se reclutan en la Prh en forma dependientes de grado de similitud pero independiente del intervalo de tiempo. Estos mecanismos se encuentran probablemente relacionados con el control de la interferencia necesario para mantener las representaciones mnemónicas distinguibles para poder diferenciarlas y con evitar la sobreescritura de cambios sinápticos en presencia de estímulos similares, y no con el decaimiento temporal asociado con no mantener la información almacenada en el tiempo.

Nuestros resultados indican que BDNF y Arc en la Prh participan en un mecanismo dependiente de la síntesis de proteínas importante para la consolidación de memorias de objetos similares. Esto es notablemente similar a hallazgos previos del laboratorio en el

GD del HP para memorias espaciales²⁴⁷. Nuestros resultados también sugieren que existe una interacción entre BDNF y Arc en la Prh durante la consolidación de memorias de objetos similares, lo que indica que Arc es probablemente un efector de la plasticidad inducida por BDNF. Hasta donde sabemos, este estudio es el primero en proporcionar evidencia sobre las vías moleculares involucradas en la desambiguación de representaciones de memoria fuera del GD. Varios experimentos apuntan a la vía BDNF-Arc como un jugador importante que contribuye a la desambiguación de representaciones de objetos superpuestos: 1) La memoria se ve afectada en la condición similar de la tarea tanto con el BDNF-ASO como con el Arc-ASO; 2) la mejora de la memoria inducida por BDNF es abolida completamente por Arc-ASO, lo que sugiere que Arc es una de las moléculas necesarias para el efecto de BDNF; y finalmente 3) las vías moleculares de BDNF y Arc interactúan durante la adquisición/consolidación de memorias de objeto similares como se muestra en el experimento de "desconexión molecular".

Además, encontramos que, a pesar de las profundas diferencias anatómicas entre la Prh y el GD, la desambiguación de recuerdos de objetos o posiciones similares, respectivamente, en estas regiones se basa en mecanismos moleculares similares. Identificamos a los rNMDAs como posibles efectores de la acción de BDNF en la consolidación de memorias diferenciadas tanto en el dominio del objeto como en el dominio espacial. Nuestros resultados apuntan a la vía BDNF-rNMDAs como un elemento importante en los mecanismos subyacentes a la desambiguación de representaciones similares, independientemente del tipo de estímulo. Los rNMDAs interactúan con BDNF durante la desambiguación de las memorias espaciales y de objeto en el GD y la Prh, respectivamente. Además, el BDNF exógeno potencia la desambiguación de representaciones similares a través de un mecanismo dependiente de rNMDAs tanto en la Prh como en el GD. Estos hallazgos son consistentes con la evidencia que demuestra que se requieren rNMDAs para la separación de patrones en ciertas circunstancias²⁴⁹, y se ajustan a la literatura más amplia que sugiere que los rNMDAs como mediadores de los cambios plásticos inducidos por BDNF. Además, encontramos que la expresión de Arc también es necesaria para la consolidación de memorias similares tanto de objetos como espaciales, en la Prh y GD respectivamente. Nuestros resultados también apuntan hacia Arc como otro posible efector de los cambios plásticos inducidos por BDNF, lo que es consistente con estudios electrofisiológicos previos en los que se vió que durante el LTP BDNF-dependiente la proteína Arc aumenta y su síntesis es necesaria tanto para la formación como para la consolidación en el tiempo del LTP^{453,454,531}. Todos estos

hallazgos señalan una aparente convergencia en los mecanismos de plasticidad molecular intracelular que dirigen la consolidación de las memorias similares, que parecen ser idénticos en diferentes regiones del cerebro y para diferentes tipos de estímulos.

Hemos demostrado que las manipulaciones farmacológicas del GD perjudican la retención de memoria solo en el caso en que las representaciones espaciales necesitan separarse (es decir, las condiciones de separación espacial similar y extrasimilar) pero no si estas son claramente diferenciables y, en concordancia con esto, las manipulaciones de Prh solo alteran la retención de memoria cuando son representaciones de objetos las que necesitan separarse. Esto proporciona una fuerte evidencia de que nuestras variaciones de la tarea REP y REO son adecuadas y confiables para estudiar la separación de patrones de representaciones espaciales y de objetos, respectivamente ^{247,546}. La naturaleza de estas tareas proporciona varias ventajas sobre otras tareas utilizadas para estudiar la separación de patrones. En estas tareas se evalúa la capacidad de formar representaciones distintas de información similar presentada en forma concurrente (si bien su uso es estudiado durante una fase de evaluación), a diferencia de tareas previamente utilizadas en las que se evalúa por comparación con representaciones mnemónicas anteriores ^{224,249,260}. Además, el hecho de que las pruebas son de un solo ensayo, que no requieren recompensas y que las fases de evaluación son idénticas entre ambas condiciones, junto con la capacidad de manipular la similitud de los objetos/posiciones en forma paramétrica, son todas cualidades deseables de las tareas diseñadas. Por otro lado, el uso de ODNs, además de un mayor control temporal respecto a otras técnicas como el uso de transgénicos, permite un bloqueo de la expresión suficientemente específico como para descartar efectos inespecíficos o tóxicos que se le han atribuido a inhibidores de síntesis de proteínas como la activación de kinasas y la apoptosis ⁵⁸².

Sin embargo, nuestro diseño no está libre de críticas. Como usamos una tarea de exploración espontánea combinada con manipulaciones farmacológicas podría haber una preocupación con respecto a cambios en la motivación o la preferencia por la novedad generados por la droga que puedan afectar los niveles de exploración de los objetos. Sin embargo, en nuestros experimentos este factor no puede explicar las diferencias en las proporciones de discriminación, porque eso significaría que nuestras manipulaciones de la Prh de alguna manera afectaron la motivación solo en la condición similar pero no en la condición disímil. Además, el hecho de que la infusión del Arc-ASO 3 h después de la fase de entrenamiento no afectara la preferencia de novedad en la condición REO similar

descarta de forma efectiva la posibilidad de que un cambio en la motivación explique estos resultados. Sumado a esto, la infusión de ODNs en Prh no modificó la exploración ni provocó un deterioro de la memoria espacial en una tarea de exploración de objetos. Del mismo modo, el efecto restringido temporalmente de los Arc-ASO ODNs en GD sobre la tarea de REP y la ausencia de efecto del Arc-ASO y BDNF-ASO sobre la versión disímil de la tarea descartan un posible efecto motivacional del ODN sobre la tarea de REP. En conclusión, no hay razón para creer que las manipulaciones afecten diferencialmente procesos no mnemónicos en la condición similar más que en la condición disímil.

Existe evidencia convincente para indicar que la Prh, en lugar de almacenar características simples de los objetos, almacena representaciones conjuntas que luego pueden usarse para eliminar la ambigüedad entre objetos particulares durante la evocación de la memoria. Se ha sugerido que esta estructura se encuentra en la parte superior de una red jerárquica de procesamiento de objetos ya que recibe aferentes prominentes de la vía visual ventral (la vía del "qué")⁵³⁴. Esta hipótesis ha sido evaluada previamente al examinar el papel de Prh durante la discriminación de objetos que comparten características similares^{100,111}. En este sentido, se podría pensar que la Prh es una estructura que actúa como un "separador de patrones" para las representaciones de los objetos, eliminando la ambigüedad de la información superpuesta en representaciones separadas y menos confundibles. Nuestros experimentos sugieren que BDNF y Arc son esenciales para la consolidación de memorias de objetos separadas. Este requerimiento sería parte de un mecanismo de estabilización de la memoria dependiente de la síntesis de proteínas en Prh. Nuestros experimentos apoyan fuertemente la idea de la Prh como una estructura capaz de realizar separación de patrones. Además, nuestros resultados plantean a la diferenciación mnemónica como un proceso que se extiende más allá de la codificación inicial de la información y que requiere mecanismos plásticos clásicamente asociados a la consolidación de la memoria. Además, estos resultados son consistentes con la vasta literatura previa que postula a la Prh como una región clave para la formación de memorias de reconocimiento de objetos, y que en líneas generales sugiere que las estructuras en el lóbulo temporal medial están especializadas en el procesamiento de diferentes tipos de representaciones.

Las evidencias obtenidas en este trabajo evalúan la función de separación de patrones en forma indirecta, ya que utilizan tareas comportamentales para tratar de evaluar las representaciones neuronales subyacentes. Para evaluar en forma rigurosa la función de separación de patrones, sería necesario medir las representaciones tanto de la

información que ingresa a la Prh como de la que sale de esta estructura para entender si la información saliente de la Prh es menos similar que la entrante, por lo que en este estudio no podemos asegurar si este efecto es inherente a la región, o sólo un reflejo de lo que ocurre en etapas anteriores. Más aún, en este estudio tampoco se evaluó la diferenciación a nivel de engramas celulares o en la activación neuronal en la Prh relacionada con la familiaridad/novedad del objeto. Resultados previos sugieren que la separación de patrones puede ocurrir a nivel de poblaciones neuronales en la Prh ya que encontraron poblaciones de neuronas capaces de mostrar respuestas ortogonales a un estímulo a medida que este atraviesa un proceso de *morphing* (transformación gradual de una imagen a otra) ¹²⁸. Esta población de neuronas representa un sustrato neuronal que podría apoyar la consolidación de representaciones de objetos en forma no superpuesta en nuestro paradigma conductual. Sería de interés en el futuro poder evaluar la información que ingresa a la Prh vía áreas sensoriales y ver si la superposición de esta información se encuentra reducida en las proyecciones de la Prh para poder demostrar que la Prh efectivamente es capaz de realizar esta computación neuronal.

Se cree ampliamente que los cambios en la fuerza sináptica permiten el almacenamiento de memoria a largo plazo en el cerebro ¹⁴³. De hecho, las modificaciones dependientes de la experiencia subyacentes al almacenamiento de memoria comparten muchos mecanismos moleculares con procesos de plasticidad sináptica dependientes de la actividad como potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD) ^{265,278}. Por lo tanto, mecanismos relacionados con la plasticidad podrían estar involucrados en el mantenimiento a largo plazo de las trazas de memoria de objetos en la Prh y de memoria espacial en el HP. La mayor parte del trabajo que ha demostrado que los procesos relacionados con la plasticidad subyacen en la memoria a largo plazo se ha llevado a cabo en el HP ³¹⁵, y solo recientemente esta pregunta comenzó a abordarse en la Prh ^{85,105,106,583}. Los estudios *in vitro* han encontrado que las neuronas de la Prh pueden desarrollar tanto la potenciación a largo plazo (LTP) como la depresión a largo plazo (LTD) ^{410,411,584,585}. Además, los experimentos *in vivo* han encontrado que la memoria de reconocimiento de objetos se encuentra fuertemente asociada con la inducción y el mantenimiento del LTD en la Prh ³¹⁹. Se ha encontrado que este tipo de plasticidad depende de la internalización de los rAMPA en la Prh. En este sentido, los ratones Arc KO tienen déficits en muchas tareas de aprendizaje, incluido el reconocimiento de objetos, y en estos animales la LTD se encuentra disminuida en el hipocampo ⁵⁰². Arc ha sido implicado en el tráfico de rAMPA en las sinapsis ^{503,504,586}, por lo que parece lógico que

este podría ser un posible mecanismo de almacenamiento de las memorias de objetos diferenciadas en la Prh.

Más aún, por su estrecho vínculo con la actividad neuronal y su reclutamiento a sinapsis específicas, Arc podría tener un rol específico en el refinamiento de las fuerzas sinápticas para mantener las memorias pero también evitar la interferencia entre memorias similares. De hecho, Nakayama ⁵³² encontró que la expresión tardía de Arc en el HP es necesaria para el podado de espinas y para la correcta reactivación neuronal durante la evocación de los ensambles activados por el aprendizaje original, sugiriendo el rol de Arc en la estabilización de los ensambles neuronales formados en el aprendizaje por refinamiento de los circuitos mnemónicos mediante la eliminación de las espinas redundantes. Otro estudio vió que la inducción de Arc luego de una experiencia novedosa prepara a las neuronas de CA1 para el LTD en respuesta a la subsiguiente activación de los rmGlus, probablemente promoviendo su expresión y transporte a las dendritas para su posterior traducción inducida por la activación de rmGlus ⁵⁸⁷. Esto marca un posible rol de la supresión mediada por Arc de un subgrupo de las neuronas previamente activadas por una experiencia que permitiría la formación de una representación a nivel de circuito más específica de esta experiencia, lo que podría contribuir al desarrollo de representaciones diferenciadas a partir de estímulos similares. Es posible que mecanismos similares estén involucrados en la desambiguación dependiente de Arc de memorias de objetos similares en nuestro paradigma comportamental.

Un estudio previo utilizó BDNF ASO para bloquear la expresión de BDNF en Prh en un paradigma de reconocimiento espontáneo de objetos ⁵⁸¹. En este caso, el BDNF-ASO inyectado 1 h antes o inmediatamente después de la adquisición de la tarea afectó la capacidad de discriminación de familiaridad de los animales a las 24 h, pero no 20 min después de la adquisición. La infusión de ASO 6 h después de la adquisición no afectó la memoria 24 horas después. Sin embargo, creemos que los resultados de nuestro estudio no se generalizan a los mecanismos moleculares de la memoria de reconocimiento sino a los mecanismos subyacentes al almacenamiento de representaciones únicas de objetos en Prh. En nuestros experimentos, solo encontramos una alteración de la memoria causada por BDNF-ASO en condiciones similares, pero no en las diferentes. Nuestros resultados son consistentes con un papel de Prh en el almacenamiento de representaciones de objetos no confundibles. Es posible que en el trabajo de Seoane⁵⁸¹ el

requerimiento de BDNF se relacione con la presencia de dos objetos idénticos durante la fase de entrenamiento, y que sea esta exposición la que reclute al BDNF en la Prh. Al no estar controlada la variable de similitud de los objetos en experimentos de REO previos, el rol de esta similitud en la resolución de la tarea no se ha contemplado previamente en la literatura de REO, y puede haberse subestimado su impacto.

Por otro lado, nuestro trabajo y otros también proporcionaron evidencia convincente de que el BDNF tanto en el GD como en la Prh está críticamente involucrado en los mecanismos moleculares que subyacen a la separación de patrones a nivel comportamental en memorias de objetos y espaciales, respectivamente ^{247,546}. Bekinschtein et al.²⁴⁷ mostró que la expresión de BDNF en el GD aumenta espontáneamente después de que las ratas se exponen a ubicaciones espaciales similares, pero no a ubicaciones espaciales diferentes. Más aún, las representaciones espaciales y de objetos atraviesan una fase de consolidación restringida en el tiempo en la que la expresión de esta proteína es necesaria en la Prh y el GD, y solo en la versión similar de las tareas REP y REO respectivamente pero no en la versión disímil ^{247,546}. Además, el BDNF recombinante en el GD es capaz de mejorar el rendimiento en una versión extrasimilar de la tarea REP, y, en concordancia con esto, el BDNF recombinante en la Prh es capaz de mejorar el rendimiento en una tarea REO análoga similar. Estos hallazgos parecen sugerir que las ratas participan en un proceso de separación de patrones dependiente de BDNF cuando se enfrentan con información ambigua específicamente en la estructura donde se procesa esta información. Demostramos que las representaciones espaciales y de objetos pasan por un proceso de separación de patrones dependiente de BDNF durante la etapa de consolidación de la memoria. Y fuimos un paso más allá y demostramos que BDNF está actuando a través de un mecanismo dependiente de rNMDAs para mediar la consolidación de memorias separadas tanto en la Prh como en el GD. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la consolidación de representaciones espaciales similares dentro del GD requiere la acción de BDNF en las células granulares inmaduras de forma aguda ⁵⁴⁰. Sin embargo, queda por responder sobre qué población de neuronas dentro de la Prh actúa el BDNF.

Tanto la Prh como el GD parecen usar mecanismos moleculares análogos para desambiguar representaciones similares, y estos son los mismos mecanismos que se sabe median la plasticidad sináptica a largo plazo. Es posible imaginar un escenario en el que para que las representaciones similares se almacenen en conjuntos únicos de

neuronas, el patrón de conectividad o engrama que las almacena tendría que pasar por un período de estabilización en el que los cambios plásticos y estructurales fortalezcan estas conexiones. En este escenario, BDNF actuaría como un mediador de estos cambios plásticos, al favorecer la activación de un programa de expresión génica que eventualmente permitiría que estas conexiones sean más estables ⁵⁸⁸. Se necesita más trabajo para dilucidar el mecanismo exacto por el cual el BDNF actúa a través de los receptores NMDA en el GD y la Prh para regular la separación de patrones de las representaciones espaciales y de objetos. Trabajos previos han demostrado que el BDNF puede modular vías glutamatérgicas tanto pre como postsinápticas ⁴²⁸. BDNF mejora rápidamente la transmisión sináptica modulando selectivamente la probabilidad de apertura de rNMDA postsinápticos a través de la fosforilación de la subunidad moduladora NR2B rNMDAs ^{472-474,476}. En la presinápsis, por otro lado, BDNF mejora la liberación de glutamato en sinaptosomas y aumenta la frecuencia de corrientes postsinápticas excitadoras miniatura (mEPSC) en cortes cerebrales y preparaciones de cultivo ^{589,590}, y este efecto también depende de rNMDAs. Además de estos efectos rápidos sobre la actividad, BDNF aumenta la traducción de ARNm de rNMDAs ⁴⁷¹. Mediante sus acciones sobre el funcionamiento y expresión de los rNMDAs, BDNF puede modular el LTP tanto cooperando con la liberación sináptica de glutamato como reduciendo el umbral de inducción de LTP mediante el aumento del flujo de Ca²⁺ en espinas dendríticas mediado por rNMDAs ⁴⁴⁷. De hecho, los efectos de BDNF sobre la memoria y plasticidad sináptica se han relacionado con la activación del rNMDAs en el hipocampo ^{474,547,591}. Una hipótesis es que la molécula clave que permite la interacción entre BDNF y rNMDAs es la tirosina quinasa Fyn. Fyn se une a rNMDA y TrkB, media la fosforilación de NR2B en Tyr-1472 ⁵⁹² y es necesaria para el LTP hipocampal y el aprendizaje espacial ⁵⁴⁷. El BDNF estimula a los receptores TrkB, lo que resulta en su asociación con Fyn, y el Fyn activado se une a NR2A y NR2B a través de dominios SH2 ⁵⁹³. Mizuno et al. ⁵⁴⁷ mostró que el grado de interacción de las proteínas TrkB-Fyn-NR2B aumentó en las pruebas conductuales de aprendizaje espacial, mientras que la fosforilación de otras tirosin quinazas no se vio afectada. Alternativamente, otras Src tirosin quinazas podrían estar involucradas en este proceso. En este sentido, Nakai et al. ⁵⁹¹ mostró que la activación de PI3-K / Akt llevada a cabo por BDNF a través de TrkB puede conducir a la fosforilación de Girdina. Luego, la Girdina fosforilada puede interactuar con Src y NR2B para aumentar la fosforilación de NR2B mediada por Src. En este escenario, la activación de los receptores NMDA que contienen NR2B podrían conducir finalmente a mayores niveles de LTP entre otras cosas

a través del aumento del tamaño de la densidad post-sináptica y el aumento de la relación NMDA / AMPA en espinas delgadas, que han sido previamente descritos ⁵⁹⁴.

Los mecanismos sinápticos para la consolidación de la memoria se conservan ampliamente en todas las especies a pesar de las diferencias en la anatomía cerebral. Moléculas como la proteína CREB son esenciales para la consolidación de muchos tipos de aprendizaje en invertebrados y vertebrados ^{276,595-597} y compuestos como BDNF son partes importantes de la maquinaria involucrada en muchos tipos de plasticidad, desde plasticidad sináptica y memoria, hasta desarrollo y dolor ^{417,419,598-600}. Sin embargo, dado que la neurogénesis adulta en el GD ha sido implicada en la expresión conductual de la separación de patrones espacial ^{244,251,259,533}, y este tipo de neurogénesis está ausente en Prh, está claro que los mecanismos celulares subyacentes de la separación de patrones son diferentes entre las estructuras del GD y Prh. A pesar de estas diferencias anatómicas, varios mecanismos moleculares que influyen en los cambios plásticos en las sinapsis parecen ser similares entre regiones, y comunes a los procesos de almacenamiento de memoria. Si bien las diferentes regiones del cerebro están especializadas para procesar tipos particulares de representaciones, conservar los mismos mecanismos de plasticidad podría ser lo más adecuado desde una perspectiva de economía de recursos. De hecho, teniendo en cuenta que todo el cerebro es plástico, es posible que las mismas reglas de plasticidad rijan para todas las regiones del cerebro, independientemente de su disociación funcional y sus conexiones y características anatómicas. Sin embargo, existen muchas diferencias en los mecanismos de plasticidad que sugieren que la respuesta puede no ser tan sencilla. Por ejemplo, el LTD en Prh requiere rNMDA y rGlu, mientras que en el hipocampo el LTD es o NMDA o mGluR-dependiente en forma excluyente ^{410,601}. Además, los principales actores en los mecanismos de plasticidad intracelular que impulsan la consolidación no siempre se conservan en todas las regiones. Por ejemplo, *zif268*, otro gen temprano, parece estar involucrado en la consolidación del condicionamiento de miedo en la amígdala ⁶⁰² y en la memoria de reconocimiento de objetos ³¹⁶, pero no en el condicionamiento contextual del miedo en el hipocampo ¹⁷². En el GD, los modelos computacionales han demostrado que una capa responsable de la separación de representaciones es beneficiosa para la formación de una memoria diferenciable en el circuito recurrente de CA3, y trabajos posteriores demostraron el valor de la dispersión de las representaciones neuronales en el GD para la reducción de la interferencia entre memorias ^{217,249}. En este sentido, como lo

explican Bogacz y Brown ⁶⁰³ la escasa dispersión aumenta la capacidad de las redes asociativas porque reduce el ruido de la actividad neuronal y aumenta la precisión de la respuesta. Pero en las redes de familiaridad, aunque la codificación dispersa aumenta la precisión individual, también disminuye el número de neuronas novedosas activadas. En este sentido, podría ser menos beneficioso para las representaciones de Prh tener una capa responsable de la separación, y en su lugar un refinamiento del ensamble neuronal puede ser esencial para la detección de novedad y esto podría ser particularmente importante ante la información ambigua. La idea de que las redes neuronales en muchas regiones cerebrales pueden codificar dos entradas relativamente similares como representaciones distintas y que esta desambiguación es beneficiosa para el procesamiento posterior de la información es generalmente aceptada, y de hecho muchas regiones cerebrales tienen salidas menos correlacionadas que sus entradas ⁷³, así que realmente no es sorprendente que diferentes regiones del cerebro puedan realizar este cálculo. Por este motivo, surgieron visiones alternativas para explicar los resultados a nivel de la separación de patrones conductual que podrían explicar el carácter único del GD. Aimone et al. ²⁵² propuso que el rol clave del GD se debe a su capacidad excepcional de mejorar la resolución de la memoria durante su formación y así aumentar el alcance de la información codificada, permitiendo de esta forma una discriminación más fina de eventos similares (mejor separación de patrones comportamental), independientemente de si hubo o no una ortogonalización de la información en primera instancia. De esta forma, las neuronas inmaduras pueden proporcionar representaciones de baja especificidad pero densamente muestreadas, mientras que las neuronas maduras proporcionan una alta especificidad pero representaciones dispersas. Así, las neuronas inmaduras permitirían una mayor resolución al reclutarse en grandes cantidades, y en la medida que maduren adquirirían gran especificidad para el estímulo que codificaron. La neurogénesis adulta, por lo tanto, podría haber evolucionado al menos en parte como un mecanismo celular que previene interferencias específicamente entre representaciones espaciales y episódicas -y no representaciones que involucran solo objetos- porque la mayor excitabilidad y plasticidad de las neuronas adultas en el GD es necesaria para el procesamiento de información altamente compleja presente en lugares y episodios.

En resumen, en el contexto de lo discutido en los párrafos anteriores, este estudio proporciona nueva evidencia sobre las vías moleculares implicadas en la separación de patrones en la Prh y el GD para la formación de memorias diferenciadas de eventos

similares, ya sea objetos o posiciones en el espacio. Nuestros resultados apuntan hacia una convergencia evolutiva de los mecanismos moleculares implicados en la plasticidad requerida para la separación de patrones en diferentes regiones del cerebro.

Rol del giro dentado en la diferenciación de memorias de objetos similares

En el segundo capítulo, evaluamos el rol del GD en la diferenciación de representaciones mnemónicas de objetos similares. Históricamente, el GD ha sido considerado el sitio donde ocurre la diferenciación de las representaciones mnemónicas, y se han encontrado evidencias de separación de patrones tanto a nivel conductual como electrofisiológico en esta estructura^{217,234,249,260}. Dado que el GD y la Prh cumplen funciones de reconocimiento disociables en función del tipo de estímulo que procesan, nuestra hipótesis original era que el rol de estas dos estructuras en el proceso cognitivo de separación de patrones iba a depender en última instancia del tipo de estímulo que sea procesado; y como la Prh es esencial para el reconocimiento de objetos en general, y para la discriminación de representaciones configurales de estímulos en particular, esperábamos que la separación de patrones no espacial dependiera más fuertemente de la Prh que del GD. Sin embargo, a pesar de esta suposición inicial, en esta parte del trabajo encontramos que, en analogía con los resultados del capítulo anterior en Prh, la expresión de la proteína asociada a plasticidad sináptica, Arc, es necesaria también en el GD para la separación de patrones tanto de memorias espaciales como de memorias de objetos. Esto indica un rol de la inducción de cambios plásticos en el GD para el mantenimiento y diferenciación de las memorias independientemente del tipo de estímulo, a diferencia del requerimiento estímulo-específico de Arc en la Prh para la discriminación de memorias similares. Además, otra proteína asociada a plasticidad, BDNF, también participa en el GD de este mecanismo de diferenciación que se recluta en la formación de memorias de objetos similares. El conjunto de estos resultados evidencia una contribución inesperada de mecanismos plásticos a nivel del GD en la consolidación y diferenciación en la memoria de representaciones de información no espacial.

A pesar de estas similitudes entre el GD y la Prh en la diferenciación de memorias de objetos similares, los resultados de esta tesis indican que estas estructuras cumplen funciones diferenciadas tanto funcional como temporalmente. En primer lugar, mientras que el BDNF fue capaz de aumentar la capacidad de separación de patrones de

memorias de objetos cuando se infundió en Prh (Capítulo 1), no fue efectivo cuando la infusión se realizó en el GD. Este resultado contrasta con resultados previos que muestran un efecto promotor del BDNFr en el GD luego de entrenar a los animales en la versión espacial análoga del xs-REO, el xs-REP ²⁴⁷. La infusión de BDNFr en el GD parece actuar específicamente en la consolidación de memorias espaciales pero no en memorias de objetos. El hecho de que las memorias de objetos no sean modulables positivamente a través de manipulaciones farmacológicas sugiere que el GD no contiene la traza mnemónica utilizada para discriminar los objetos similares. El BDNFr es capaz de generar BDNF-LTP dependiente de síntesis de proteínas en el GD ^{449,456}, y muchos estudios han demostrado que BDNF es capaz de rescatar la inhibición del TBS-LTP tardío mediada por inhibidores de síntesis de proteínas ^{429,604}. Este BDNF exógeno maduro es endocitado y su liberación en forma dependiente de actividad es necesaria para este efecto de rescate del LTP tardío. Entonces, es posible que el efecto del BDNF sobre la memoria de objetos en Prh y sobre la memoria espacial en GD se deba a que en estas estructuras hay sinapsis previamente activas cuyo pool de BDNF es insuficiente como para sostener su liberación en el tiempo, con lo cual los efectos sobre el mantenimiento del LTP que se observan con liberaciones sostenidas de BDNF no alcanzan a ocurrir, y que en este contexto el BDNF agregado sirva como un impulsor de la estabilización de los cambios plásticos generados por el aprendizaje en la tarea.

Además, el bloqueo de la transmisión glutamatérgica utilizando el antagonista de rAMPA DNQX afectó la evocación de la memoria de los objetos similares únicamente cuando fue infundido en Prh y no así en el GD. Esto sugiere que el GD no participa durante la evocación de memorias diferenciadas de objetos similares. La ausencia de efecto promotor del BDNF en GD en versiones de alta carga de separación de patrones en el dominio de los objetos (en contraste con la tarea espacial) sumada al hecho de que la actividad vía rAMPA del GD no parece ser importante para la evocación de las memorias diferenciadas refuerza la idea de que el GD podría no ser una de las estructuras que forman parte de las trazas mnemónicas de los objetos. Finalmente, la infusión de Arc ASO en GD no tiene efecto cuando se realiza a los 5 minutos del entrenamiento, mientras que en la Prh el ODN continúa teniendo efecto a este tiempo, sugiriendo que el requerimiento de Arc en GD se da dentro de una ventana temporal más reducida que en la Prh. En líneas generales, estos resultados indican que, si bien ambas estructuras son necesarias, parecen cumplir distintas funciones en la discriminación de memorias similares. De hecho,

los resultados apuntan a un rol de la Prh como el sitio clave de almacenamiento de las representaciones únicas y no confundibles de los objetos, mientras que cambios plásticos en GD parecería tener un rol transitorio durante la consolidación en la diferenciación de memorias de objetos. Estos resultados son consistentes con reportes previos en la literatura que encuentran una dependencia de corteza entorhinal en la consolidación pero no reconsolidación de memorias de reconocimiento de objetos ⁶⁰⁵.

Varios resultados en este trabajo señalan una interacción entre el GD y la Prh durante la desambiguación de memorias de objetos similares. En primer lugar, experimentos de desconexión indican que la interacción de cambios plásticos en Prh y GD es necesaria para resolver la tarea de s-REO. Además, la infusión de Arc en GD consigue disminuir en la Prh los niveles de BDNF inducidos por la tarea. Esto habla de una interacción indirecta entre Prh y GD durante la consolidación de memorias similares que permite que cambios plásticos en GD lleven a la modificación de la liberación de BDNF en la Prh. Además, la inyección de BDNF en Prh es capaz de rescatar el déficit producido por el bloqueo de Arc en el GD. Estos resultados permiten sugerir que el aumento de BDNF podría *bypasar* el requerimiento de cambios plásticos en el GD durante la consolidación de memorias similares, al impedir la disminución de BDNF en Prh provocada por el Arc ASO en GD. Estos resultados apuntan a una interacción compleja entre las modificaciones plásticas a nivel del GD y la Prh, que permiten la separación de representaciones mnemónicas de objetos similares.

Las fallas en el s-REO se observaron aún cuando el GD es capaz de transmitir información a otras regiones, ya que las manipulaciones farmacológicas utilizadas (ODNs) no afectan la transmisión sináptica *per se* sino que impactan únicamente sobre la plasticidad sináptica. Esto sugiere un papel de la inducción transiente de procesos plásticos en el GD en la consolidación de memorias de objetos diferenciadas. Particularmente, proteínas asociadas a cambios plásticos a nivel de la sinapsis como Arc y BDNF juegan un rol en el GD como parte de los mecanismos de consolidación responsables de la mejora en la retención o diferenciación de memorias similares de objetos.

Existe un debate en torno a la dependencia hipocampal de las tareas de reconocimiento de objetos. Aunque muchos estudios indican que el HP no es necesario para el reconocimiento de objetos *per se* ⁶⁰⁶, en especial si estos son diferenciables en base a

una única característica ^{18,19,22,536,607-610}, muchos otros informan efectos consistentes con un rol del HP en algún aspecto del reconocimiento de objetos ^{23,611-615}. De acuerdo al “modelo de procesamiento dual”, en las tareas de reconocimiento es posible utilizar la discriminación basada en el recuerdo (*recollection*) o familiaridad, como sugieren los estudios que usan curvas de “receiver-operator” (ROC) ^{606,616,617}. Los modelos de procesos duales predicen que la patología hipocampal afectará a la memoria de reconocimiento en casos en que la memoria asociativa (*recollection*) contribuya a la discriminación ⁹. Si bien gran parte de los estudios previos de lesiones indican que el hipocampo está involucrado en aprendizaje asociativo, este rol se observa únicamente cuando el estímulo debe asociarse con una posición pero no si la ubicación espacial no es un componente de la tarea ^{48,49,552}. Esto sugiere que el hipocampo está especialmente involucrado en tareas que presenten un componente espacio-temporal (memoria asociativa de tipo episódica), pero no en cualquier tipo de memoria asociativa. Por otra parte, un gran número de estudios indican que el HP no es necesario para una memoria de reconocimiento de objetos exitosa (ver revisiones ^{20,618,619}). Es por esto que, en contraste con las visiones “basadas en procesos” como la de familiaridad vs. recuerdo (*recollection*), surgieron recientemente visiones basadas en los dominios, surgidas a partir de datos neuroanatómicos, que resaltan las diferencias regionales en función de los estímulos que cada región procesa ^{7,26,580}. De acuerdo con las visiones basadas en dominios, distintas regiones podrían contribuir a la evocación diferencialmente en función del estímulo que utilizan. Teniendo en cuenta estas teorías, nuestra hipótesis era que la región del GD del HP iba a tener un rol secundario en la desambiguación de memorias de objetos, menos crucial que su rol en memorias espaciales ya que en este caso el sustrato neuroanatómico que es el soporte de estas memorias es, de acuerdo con la mayor parte de los trabajos del campo, la Prh y no el circuito hipocampal. Sin embargo, nuestros resultados revelaron un rol de Arc y BDNF en tareas de reconocimiento de objetos tanto en Prh como en GD, sugiriendo que estos cambios plásticos en ambas estructuras participan de la consolidación de memorias diferenciadas de objetos similares. Sin embargo, existen varias evidencias que sugieren que sus roles no son equivalentes. El GD parece cumplir una función independiente de dominio en la consolidación de memorias diferenciadas (tanto para memorias espaciales similares como de objetos similares), mientras que la proteína Arc tiene un rol dominio-dependiente en la Prh: la infusión de Arc ASO en la Prh afecta a la discriminación de memorias de objetos similares, pero no tiene efecto sobre la diferenciación de memorias espaciales (ver

Capítulo 1). Esto implicaría que el GD está involucrado en el procesamiento de información relacionada con la identidad del estímulo y no solamente información espacial. Por otra parte, si bien la infusión de BDNFr recombinante en la Prh es capaz de aumentar la consolidación de representaciones de objetos similares, esto no ocurre si la infusión se realiza en GD, a pesar de que el BDNFr si es capaz de aumentar la consolidación de representaciones espaciales similares. Además, la capacidad de evocar las representaciones de objetos similares en la tarea de s-REO no es afectada por la inhibición de la actividad de rAMPAs en el GD, pero sí en la Prh. Más aún, existen cambios plásticos en el GD que son necesarios para la formación de memorias de reconocimiento de objetos en forma independiente de la similitud ya que la actividad de rNMDAs es parcialmente necesaria para un correcto desempeño tanto en la versión similar como en la versión disímil de la tarea de REO, si bien ciertos mecanismos moleculares como el aumento en la expresión de Arc y BDNF son necesarios selectivamente para la diferenciación de memorias de objetos similares y no disímiles. La función del GD en el procesamiento de memorias de objetos similares no está clara. Nuestros experimentos indican que, a pesar de que en ambas estructuras se reclutan mecanismos moleculares compatibles con procesos de consolidación, la función del GD y de la Prh es fundamentalmente diferente, mientras que la del GD es transitoria, la de la Prh parece ser persistente.

Recientemente, algunos investigadores han sugerido que la controversia en la literatura de reconocimiento de objetos respecto al rol del HP puede explicarse por diferencias de procedimiento sutiles en cómo se ejecutan las tareas de reconocimiento de objetos, y que el HP puede ser reclutado cuando el procesamiento de información espacial o contextual es relevante o útil para el desempeño en la tarea ^{18,22,88,538,552,554,620-622}. En nuestro trabajo, una explicación alternativa de los resultados podría ser que el hipocampo codifique información espacial de los objetos aún si esta no es necesaria. Se sabe que las ratas aprenden automáticamente la disposición espacial de los objetos explorados en la arena ^{623,624}, y en estudios donde se midió la expresión de c-fos en tareas de RO se encontraron evidencias de aprendizaje espacial espontáneo ⁶²⁵. Sin embargo si bien la exploración activa de objetos compromete la actividad del hipocampo, esta región parece no ser esencial para esta tarea porque las lesiones en esta área no provocan déficits ^{620,626}. Por lo tanto, es posible que el aprendizaje espacial automático en algunas tareas contribuya a que la actividad del hipocampo cambie. Más allá de las posibles contribuciones espaciales

incidentales inherentes a cualquier estudio, en nuestro trabajo al existir diferencias en el reclutamiento de estos cambios plásticos entre las dos condiciones de la tarea (s-REO y d-REO) con la misma contribución espacial, la codificación de información espacial no es una explicación plausible de nuestros resultados. Más aún, la tarea fue diseñada de forma tal de disminuir la posible contribución del procesamiento espacial durante el entrenamiento ya que la habituación al contexto fue extendida (5 min/3 días) y se utilizó un contexto de paredes altas y tamaño reducido. Además, la dependencia de Arc en la discriminación de memorias de objetos semejantes no se vió alterada cuando se redujo el tamaño del contexto, por lo cual la contribución de una codificación espacial incidental a nuestros efectos es altamente improbable.

Nuestros resultados permiten explicar al menos en parte los resultados contradictorios en la literatura previa relacionados con el rol del HP en la memoria de reconocimiento de objetos al establecer que la contribución del hipocampo puede depender de las demandas de separación de patrones de la tarea. Esto es así sobre todo porque en muy pocos trabajos se ha controlado el nivel de similitud de los objetos utilizados por lo cual se desconoce el impacto de esta función cognitiva sobre los resultados ^{22,609,611,627-629}. El hipocampo pasaría a tener una contribución importante en situaciones más complejas como las que se presentan normalmente en la vida diaria en donde las características individuales son ambiguas para el reconocimiento de un ítem. Además, nuestros resultados se suman a estudios de lesiones en monos y humanos que apoyan la idea de que la Prh, y no el HP, contiene representaciones conjuntas complejas que permiten resolver la ambigüedad en ciertas características del objeto permitiendo así discriminaciones visuales no espaciales complejas ^{81,630-632}. El papel esencial de la Prh en la tarea podría deberse a la ubicación anatómica central de la Prh dentro del circuito que forma la traza mnemónica del objeto y/o o porque es allí donde ocurren los cambios plásticos sinápticos necesarios para la estabilización de la memoria.

La participación hipocampal en memorias de RO se observa más consistentemente cuando es necesario identificar la familiaridad de arreglos o asociaciones de ítems y no ítems únicos ^{86,625,633-637}. La reorganización espacial de señales familiares conocidas está asociada a cambios en la actividad de c-Fos en el HP ^{86,634,635}. Sin embargo, no está claro si este reclutamiento hipocampal se mantendría si las asociaciones no tuvieran un componente espacial, y además la activación o inactivación de regiones del cerebro no

establece su necesidad para procesos mnemónicos o de aprendizaje y esta actividad podría deberse a la codificación incidental de información no relevante para la tarea como ocurre en muchas tareas independientes de hipocampo ⁶³⁸⁻⁶⁴¹. Esto ha sido utilizado para sugerir que la función que podría distinguir al hipocampo de otras estructuras del LTM es su habilidad para combinar distintos atributos asociados con una experiencia particular ^{7,9,13,89,642,643}. Sin embargo, también existe evidencia que sugiere que la Prh podría contribuir a codificar asociaciones novedosas. Tanto registros single-unit en monos ^{95,644} como fMRI en humanos ^{15,188,645-648} encontraron que la actividad en Prh se correlaciona con el aprendizaje y evocación de asociaciones entre ítems relacionados. Más aún, estudios en ratas y humanos sugieren que las lesiones hipocampales alteran la memoria de reconocimiento para las asociaciones entre dominios, pero solo se afecta levemente la memoria asociativa dentro de dominios, que se ve afectada significativamente frente a lesiones en Prh (^{78,138,649} pero ver ^{12,650,651}). Si la Prh es capaz de permitir el reconocimiento de asociaciones novedosas a través de la unificación de grupos de ítems en una sola representación o configuración como muchos trabajos sugieren ^{616,652,653}, la fuerza de familiaridad de estas configuraciones sería mayor si fueron experimentadas juntas que por separado, permitiendo que la familiaridad sea un mecanismo útil para la discriminación de memorias asociativas ⁶⁴⁶. Estos hallazgos, asumiendo que puede considerarse aprendizaje asociativo a este tipo de memoria relacional, son evidencia de que la Prh sería capaz tanto de detectar tanto familiaridad como de realizar aprendizaje asociativo⁶. En principio, teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, una posible explicación de los resultados sería que la dependencia hipocampal que observamos está relacionada a la presencia durante la tarea de rearreglos de los objetos previamente presentados. Sin embargo, si se piensa en función de rearreglos espaciales se debería ver esta dependencia en ambas condiciones ya que en ambas versiones de la tarea las posiciones de los objetos compuestos familiares se modificaron. Además, las posiciones de los objetos fueron asignadas en forma pseudoaleatoria con lo cual no pueden explicar las diferencias encontradas. Como la información respecto a la familiaridad o no del arreglo espacial no es relevante para resolver correctamente la tarea, aún si la codificación incidental de esta información ocurriera en el HP esta no explicaría el déficit diferencial en el desempeño de la versión similar (y no disímil) de la tarea generado por las manipulaciones en GD. Por otra parte, de acuerdo a esta visión la dependencia hipocampal debería ser mayor en la fase de evaluación en la cual existe una

reorganización de las señales familiares (y no en el entrenamiento), mientras que lo que se observa es el patrón opuesto, apoyando nuestra hipótesis.

Clásicamente, el aprendizaje relacional se asocia con un procesamiento lento que requeriría de la integración funcional de estructuras del lóbulo temporal medial, mientras que la literatura sugiere que para el caso de la MCT podrían existir mecanismos más rápidos vía interacción entre regiones corticales ^{138,654-656}. Hay muchos otros estudios que establecen un requerimiento hipocampal dependiente del intervalo de retención en la tarea de RO. Ratas con lesiones del hipocampo ²³ y ratones con deleciones de CREB/ATF (factor de transcripción activador) ⁶⁵⁷ o la subunidad R1 del rNMDA ⁶⁵⁸ en CA1 tienen fallas en la memoria de reconocimiento únicamente a intervalos de retención de 24 horas. Estos estudios son consistentes con el rol selectivo de los cambios plásticos en el GD sobre el mantenimiento de representaciones diferenciables de objetos similares, y con la ausencia de un efecto de las manipulaciones en GD sobre la MCT. Nuestros resultados permiten replantear la idea clásica de la separación de patrones como un proceso que ocurre durante la codificación de la información, proveniente de los orígenes del término en modelos computacionales. Al menos a nivel conductual, el proceso que permite la diferenciación de memorias de objetos similares es un proceso lento que requiere de la interacción entre distintas estructuras durante la consolidación de estas memorias.

Como se mencionó anteriormente, la Prh forma parte de la región parahipocampal junto con las cortezas entorrinal y postrinal. La evidencia anatómica sugiere que las áreas parahipocampales y el HP forman la llamada red hipocampo-parahipocampal, en la que el HP está recíprocamente conectado a todas las regiones de la neocorteza parahipocampal formando una red de vías paralelas que se cree trabajan en conjunto durante el aprendizaje y la formación de la memoria ⁶⁵⁹. Estudios anatómicos indican que la Prh proyecta en forma directa a la formación hipocampal, en particular a CA1 y subiculum, aunque no proyecta en forma directa al GD ^{56,68,564,660-663}. Una serie de estudios muestran que las fibras eferentes de Prh son capaces de enviar información electroquímica al hipocampo, ya que la estimulación de la Prh evoca potenciales de campo con dos componentes de distinta latencia en el HP, siendo el más tardío atribuido al GD por activación vía CE ⁶⁶⁴. A pesar de que no existe una entrada monosináptica desde la Prh al GD ^{661,662}, se ha demostrado que una proyección polisináptica indirecta desde la Prh al GD es capaz de generar LTP ¹³¹. La estimulación de la Prh puede dar como resultado la generación de fEPSP en CA1 ⁵⁶⁴, y esta proyección monosináptica puede mantener el LTP en forma dependiente del receptor NMDA ^{665,666}. Esto indica que existen conexiones

directas entre la Prh y el HP vía CA1, y estas conexiones son susceptibles de cambios plásticos. Del mismo modo, el HP se conecta con la Prh vía proyecciones de CA1 y subiculum, y la estimulación por TBS de esta vía es capaz de generar LTP en la Prh de ratas anestesiadas ⁶⁶⁷⁻⁶⁶⁹. Más aún, las proyecciones polisinápticas e indirectas del GD a Prh también pueden sufrir LTP en ratas anestesiadas ¹³¹, lo que sugiere un rol de estas proyecciones en el almacenamiento de memorias dependientes de Prh.

El hecho de que cambios plásticos dependientes de rNMDA en la región de CA1 del HP sean necesarios durante la consolidación de memorias de objetos similares, sumado a las proyecciones bidireccionales directas de esta subregión con la Prh, sugieren que esta podría ser una región clave en la interacción entre la Prh y el GD durante la consolidación de representaciones diferenciadas de objetos.

Estudios de expresión de c-fos frente a exposiciones a objetos nuevos y familiares o únicamente nuevos encontraron junto con la esperada activación de la Prh un patrón diferencial de activación hipocampal entre condiciones que sugiere que la interacción entre Prh y GD depende de la naturaleza del aprendizaje ^{625,670}. La exposición a mayor número de estímulos novedosos se asocia preferencialmente con la vía perforante y sus proyecciones de corteza entorrinal al GD/CA3, mientras que la discriminación de objetos familiares involucra preferencialmente la vía directa temporoamónica de corteza entorrinal a CA1 ^{625,671-673}. Considerando estos trabajos previos junto con los resultados de este trabajo, es posible plantear un escenario en el que estructuras corticales de bajo orden sean suficientes para el procesamiento y consolidación de estímulos simples (que requieren un menor número de recursos para ser procesados), pero frente a estímulos complejos como las configuraciones de características utilizadas en este trabajo se requieran un mayor número de recursos de estructuras corticales e hipocampales de alto orden para almacenarlos en forma diferenciada. En este contexto, la exposición a objetos similares generaría un aumento en el reclutamiento de las regiones del GD y Prh, y también un aumento en la interacción entre GD y Prh durante la consolidación (respecto a la presencia de objetos diferenciables). Esto podría ocurrir a través del reclutamiento de la vía perforante del HP frente a este evento y, luego vía CA1 esta señal se comunicaría nuevamente a la Prh, donde se producirían los cambios plásticos necesarios para la estabilización y diferenciación de las trazas de los objetos similares.

Hay muy pocos estudios que exploren la interacción entre estructuras del LTM durante la consolidación de memorias de objetos. Existen varias teorías que postulan que luego de la codificación de la información de los objetos, el hipocampo integra información de

regiones corticales, incluyendo la Prh, que representan las distintas características de una experiencia y las une en una traza coherente ^{142,674}. Un mecanismo mediado por el hipocampo que podría favorecer la consolidación de estas memorias diferenciadas es la reactivación de la actividad cerebral característica de una experiencia previa (*replay*, del inglés), que se da durante los períodos de tiempo posteriores a la codificación y es mediada por el hipocampo ^{201,675-677}. Este modelo sugiere que la memoria sería consolidada a través de la repetición de la activación de los circuitos que originalmente participaron de la codificación original de la experiencia. De esta forma, el hipocampo continuaría interactuando con las regiones corticales durante un período de tiempo para permitir la consolidación. Esta teoría ha surgido a partir de estudios electrofisiológicos en animales que demuestran que los patrones neuronales del hipocampo asociados con el aprendizaje se repiten posteriormente durante el sueño y el descanso ^{588,678-681}, y luego se ha descrito que interrumpir las ondas sharp wave ripples efectivamente afecta al aprendizaje relacionando estos patrones neuronales con la consolidación de la memoria ^{588,678-682}. Los mayores niveles de interferencia presentes entre memorias similares podrían hacer que estas sean particularmente sensibles a los mecanismos de *replay* durante la consolidación. El *replay* mediado por el HP podría llevar a que las trazas en corteza se fortalezcan y refinen durante la consolidación, y que luego de este período de tiempo la Prh sea suficiente para sostener la memoria por sí sola lográndose la independencia de HP que se observa en la evocación. Estudios en humanos encontraron que una conectividad mejorada entre la corteza perirrinal izquierda y el hipocampo se asocia con una mejor consolidación de recuerdos asociativos basados en objetos, sugiriendo que la consolidación de memorias de objetos involucra la distribución de representaciones de memorias a lo largo de regiones del cerebro ⁶⁸³. En otro estudio, Newmark et al. ⁶⁸⁴ encontró una mayor activación en CA3/DG, CA1 y subiculum cuando se codificaban pares de caras similares comparando con pares de caras no similares. Además, encontraron una mayor activación de las regiones de EC, Prh, CA1 y subiculum para el mantenimiento de estímulos superpuestos previamente presentados en la memoria de trabajo. En función de estos resultados, ellos postularon la presencia de representaciones de primer orden del estímulo en la corteza perirrinal, que generan una representación de segundo orden al ser procesadas por regiones de paso como CA1, donde esta información se compara con información almacenada temporalmente y así se estima la novedad del estímulo. Nuestros resultados permiten señalar a la región de CA1 como una región clave para la interacción cortico-hipocampal durante la consolidación de

memorias de objetos, y permiten pensar en la región de CA1 como un sitio de almacenamiento temporal de representaciones de los estímulos que podrían a su vez contener información respecto a la novedad del mismo. Sin embargo, los presentes resultados no permiten discriminar entre un requerimiento selectivo de CA1 para la consolidación de memorias de objetos similares (y no disímiles), versus un rol en la consolidación de memorias de objetos en general.

El hecho cambios en las sinapsis ocurran mucho más rápidamente en el HP que en la corteza ⁶⁸⁵ explica en parte el rol transitorio del HP en el mantenimiento y diferenciación de estas memorias de objetos similares. De acuerdo con nuestros resultados, la ventana temporal de requerimiento de Arc difiere entre GD y Prh. Existen evidencias previas de diferencias en el curso temporal de la expresión de Arc en distintas regiones del cerebro, que sugieren una tasa diferencial de la consolidación entre regiones del cerebro ⁵²¹. Estudios posteriores permitirían evaluar si las diferencias en las ventanas temporales de requerimiento de Arc entre estructuras se deben a que la persistencia de la inducción de Arc es variable entre regiones cerebrales, o si es que Arc deja de ser necesario en GD luego de un período de tiempo posterior al entrenamiento independientemente de si su inducción continúa.

Mecanismos moleculares involucrados en la evocación de una experiencia previa en un contexto degradado y su influencia en el balance entre los procesos de compleción de patrones y separación de patrones

Si bien impedir la interferencia es importante para la formación de memorias episódicas únicas de eventos individuales, es igualmente crucial para la memoria episódica poder recordar memorias de experiencias previas a pesar de que el ambiente haya cambiado (como ocurre en la mayoría de los casos de evocación). Esta función cognitiva es crucial para poder generalizar nuestros conocimientos a situaciones parcialmente novedosas. Muchos estudios plantean que las características únicas de cada una de las subregiones hipocampales permitirían desarrollar funciones computacionalmente distintas y complementarias para la formación y evocación de memorias episódicas como la de separación de patrones y compleción de patrones ^{73,686}. Teniendo en cuenta el rol primordial del balance entre estos dos procesos para las memorias episódicas, nos propusimos evaluar que mecanismos moleculares eran capaces de modular este balance.

La evocación holística de memorias de eventos es considerada un elemento clave de la memoria episódica, en la que es posible recuperar todos los aspectos del evento. Es posible definir a la compleción de patrones como la evocación del patrón completo de elementos del evento cuando se presentan sólo algunos elementos como clave. Nuestros resultados indican que a pesar de que las claves distales proveen información allocéntrica crucial para la resolución de la tarea, los animales pudieron recordar el objeto en contexto aún con una cantidad de información ambiental limitada respecto al entrenamiento. Esto acuerda con lo que ya se había reportado en estudios previos en roedores ^{213,687} y en humanos ⁶⁸⁸. La disminución en el tiempo de exploración en la condición CP respecto al entrenamiento sugiere que en presencia de claves parciales o degradadas las ratas son capaces de realizar la evocación de la memoria completa del evento a través del proceso de compleción de patrones, pero no así en ausencia de claves contextuales (condición SC). Además, el paralelismo del patrón de los porcentajes de exploración del objeto familiar y el patrón observado en el porcentaje de alzadas en presencia de un número variable de claves contextuales durante la evocación habla de la robustez de la medición e indica que los niveles de exploración de un objeto familiar podrían relacionarse en forma directa con la novedad del ambiente. Ambas mediciones (tanto rearings como porcentajes de exploración) apoyan la interpretación de que bajo la condición de CP ocurre el reconocimiento del contexto como familiar a pesar del cambio en el número de claves. Consistentes con estos resultados, estudios previos indican que las células de lugar no alteran su disparo espacial a pesar de que el input sensorial sea degradado o se remuevan parte de las claves ^{687,689,690}.

Esta habilidad cognitiva que nos permite recordar experiencias previas a pesar de los cambios ambientales forma parte de nuestra vida cotidiana ya que normalmente la evocación de memorias no ocurre frente a una configuración de estímulos ambientales exactamente igual a la presente cuando se formó. A pesar de que en la gran mayoría de las situaciones reales la evocación de memorias episódicas ocurre a partir de claves parciales, la compleción de patrones a nivel comportamental ha sido pobremente estudiada y la mayor parte de los trabajos que refieren a memorias episódicas estudian la evocación en presencia del contexto original de evocación asumiendo que los mecanismos moleculares y celulares implicados en ambos tipos de memorias no difieren. Si bien estos trabajos han aportado información importante sobre los mecanismos básicos de formación de la memoria, gracias a trabajos recientes que estudiaron el rol de los

rNMDAs y de las distintas subregiones del hipocampo en este proceso sabemos que existen mecanismos moleculares exclusivamente reclutados en el circuito hipocampal cuando la evocación se realiza en un contexto degradado ⁶⁸⁷. Los efectos sutiles de las fallas en estas dos funciones hacen que estos efectos puedan no ser observables en cualquier tarea de discriminación y por lo tanto es posible que hayan sido mayormente pasados por alto en la literatura.

Nuestros resultados avanzan en el entendimiento de estos mecanismos moleculares al demostrar que los rNMDAs están específicamente involucrados en la reactivación de memorias espaciales sólo cuando la cantidad de información ambiental disponible es limitada. Mientras que la inactivación de rNMDAs en CA3 afectó los niveles de evocación en presencia de claves parciales (y no de todas las claves), la inactivación de rNMDAs en el GD no tuvo efecto sobre la recuperación de la memoria en las condiciones CP y TC. Consistente con este resultado, la inactivación de rNMDAs en CA3 luego de la exposición al contexto CP afecta la capacidad de la Emetina infundida luego de la exposición de generar amnesia del objeto previamente asociado al contexto. Sin embargo, la infusión de AP5 previa a la exposición al contexto TC no afectó el patrón de amnesia producido por la Emetina. Más aún, la infusión de D-Cic en la región de CA3 previa a la evaluación es capaz de mejorar la evocación en un contexto degradado. Tanto el fortalecimiento de la VP a CA3 ⁶⁹¹ como el fortalecimiento de las conexiones vía colaterales recurrentes en CA3 ^{206,208,209,377} requieren de activación de rNMDAs. Como las sinapsis de la vía de FM no presentan niveles significativos de rNMDAs ⁶⁹² y de hecho el LTP reportado en esta vía es de tipo rNMDA-independiente ²²⁰, es poco probable que el efecto del AP5 en CA3 se deba a cambios en estas proyecciones. Posiblemente, el bloqueo de la evocación frente a un contexto degradado se deba a que los antagonistas de rNMDAs impiden la actividad reverberante de CA3. El efecto de los antagonistas de rNMDAs se observa específicamente en versiones de la tarea donde el input sensorial es bajo (contexto degradado), y por lo tanto el ingreso de información por la vía perforante es menor. Es posible que esto haga que la evocación dependa más fuertemente de la subsistencia del circuito atractor y en última instancia de la firmeza de las conexiones vía colaterales recurrentes. En este contexto, cambios en la actividad de rNMDAs podrían afectar el umbral de activación del circuito atractor de CA3, favoreciendo (D-Cic) o impidiendo (AP5) la estabilidad del estado atractor correspondiente a la traza del evento original. A nivel de circuitos neuronales, el trabajo de Nakazawa et al. ⁶⁸⁷ encontró que animales KO para

rNMDAs en la región de CA3 del HP el tamaño de los campos espaciales se encontraba reducido frente a claves parciales (y no con todas las claves), demostrando una recuperación incompleta del patrón de disparo en CA1.

Nuestros resultados son consistentes con otros estudios que sugieren que los rNMDA de la región hipocampal son necesarios para la reactivación de memorias de largo término espaciales sólo cuando la cantidad de información ambiental disponible está fuertemente limitada (^{687,693} pero ver ⁶⁹⁴). El primer estudio en encontrar evidencias de este rol específico de la región CA3 fue el de Nakazawa et al. ⁶⁸⁷ que describió que animales KO para rNMDAs en CA3 presentaban un déficit para encontrar la plataforma en el MWM si durante la evocación se removían parte de las claves originales, evidenciando que la plasticidad sináptica dependiente de rNMDAs en CA3 no sólo están involucrados en la adquisición rápida de información novedosa sino también en el proceso de compleción de patrones. Consistente con esto, Lee et al. ⁶⁹⁵ encontró que mecanismos plásticos en CA3 se reclutan preferencialmente en presencia de nuevas configuraciones de claves espaciales familiares. Por otra parte, cuando los animales encuentran cambios en el ambiente, los campos espaciales de CA3 son los primeros en modificarse, mientras que los de CA1 responden en forma más tardía en posteriores exposiciones ⁶⁹⁵, lo que sugiere que CA3 podría ser el primero en reaccionar a cambios en el ambiente e incorporarlos al sistema existente o (si los cambios son significativos) construir una nueva representación del ambiente. Dado que los campos espaciales se generan y modifican en forma rNMDA-dependiente ^{370,696-698}, es posible pensar un escenario donde cada vez que una memoria se reactiva esta se recodifica, manteniendo algunas características de la memoria original a través de la reactivación del estado atractor de CA3, pero también incorporando algunas asociaciones únicas que de acuerdo a su fuerza podrían o no ortogonalizar las representaciones.

La ausencia de una contribución de rNMDAs en CA3 para la evocación en presencia de todas las claves distales no es sorprendente dado que lesiones selectivas en CA3 o desconexiones entre CA3 y GD no afectan la evocación en tareas espaciales ^{230,699}, sumado a que los campos espaciales en GD o CA3 no son necesarios para establecer los de CA1 lo que indica que el procesamiento a nivel hipocampal no es secuencial sino que puede ocurrir de forma independiente en cada región ⁷⁰⁰⁻⁷⁰². De hecho, varias investigaciones sugieren la presencia de un modo de procesamiento hipocampal asociado

con la codificación de nuevos aprendizajes y otro modo asociado con la evocación. Estudios de RMf encontraron que la subregión GD/CA3 se encontraba activa durante la formación de memorias episódicas, y la subregión de CA1/subiculum durante la evocación⁷⁰³. Por otro lado, en estudios en roedores se observa una mayor expresión del mensajero de *c-fos* en CA3 respecto a CA1 durante la adquisición inicial de una tarea de discriminación olfativa, mientras que en animales sobreentrenados se observó una dominancia de CA1, sugiriendo un cambio de un modo de funcionamiento hipocampal asociado al nuevo aprendizaje en CA3 a un modo de evocación en CA1⁶³⁸.

En línea con estas teorías, computacionalmente, existe una compensación entre las demandas de la separación de patrones y compleción de patrones. En la separación de patrones, inputs similares se codifican usando representaciones distinguibles mientras que la compleción requiere que estas representaciones colapsen en una sola⁷³. Los circuitos, de acuerdo con esto, deberían optimizarse para dos funciones que son incompatibles, es decir disminuir la interferencia (diferenciar representaciones) o integrar experiencias para extraer generalidades (superponer representaciones). Una forma en la que el hipocampo podría sobreponerse a esta incompatibilidad es mediante un sesgo hacia un modo de codificación o de evocación a nivel de subregiones hipocampales, y así evitar la co-ocurrencia de estos procesos que llevaría a la sobreescritura de memorias y la formación de trazas excesivamente superpuestas. Por lo tanto, es ventajoso que un sistema de memoria vía colaterales recurrentes tenga dos vías de entrada, una muy fuerte para manejar el almacenamiento de información, y otra con un gran número de sinapsis capaces de modificarse en forma asociativa que transmita las señales para permitir el inicio de la evocación. Los modelos computacionales sugieren que la vía de las FM a CA3 puede ser dominante durante la codificación de información e influenciar cuáles neuronas en CA3 disparan frente a un evento dado y, gracias a los inputs dispersos del GD, puede aumentar la separación de patrones^{73,704}. Pero, por otra parte, la vía directa de CE a CA3 o CA1 podría ser la vía de procesamiento predilecta durante la evocación. El modelo sugiere que el circuito atractor en CA3 puede realizar separación de patrones o compleción de patrones dependiendo de la fuerza relativa de los atractores y de la naturaleza exacta de los inputs externos de la CE y la región del GD^{201,202,205}. De esta forma, el circuito de CA3 y GD participaría de una competencia dinámica entre dos procesos complementarios, la separación de patrones y la compleción de patrones. Por este motivo, se predice una transición tajante entre separación de patrones y compleción

de patrones a medida que el ambiente se modifica ⁵⁷¹ y esto es efectivamente lo que se observó en trabajos recientes en humanos y roedores ^{72,230,233,705}. Para un determinado patrón de entrada, dada la naturaleza del sistema atractor de CA3, los modelos predicen que el sistema deberá utilizar la información sensorial entrante por la vía perforante para recuperar el engrama original en CA3 y así permitir la evocación de la totalidad de la memoria (compleción de patrones) o permitir la formación de un nuevo engrama guiado por la información de entrada nueva, pero no podrá hacer ambos.

De esta forma, las teorías sugieren que el reconocimiento de una experiencia como familiar o novedosa por el animal va a depender de si en CA3 se realiza compleción de patrones o separación de patrones. A pesar de estas predicciones, no existen estudios comportamentales que evalúen el impacto de afectar a la región del GD (que se plantea como una aferencia crucial para la separación de patrones a nivel hipocampal) sobre la capacidad de CA3 de realizar compleción de patrones. Los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con estas predicciones, y efectivamente las manipulaciones en GD y CA3 afectaron el procesamiento favoreciendo la evocación o la adquisición de información novedosa. Esto habla de un balance entre las funciones de separación de patrones y compleción de patrones a nivel conductual, según lo cual interferir específicamente con una de ellas afecta en forma indirecta a la otra. Esto tiene sentido con lo que se conoce respecto a las vías de procesamiento en el HP, ya que modificar la información entrante a través de las aferencias desde el GD seguramente va a modificar la actividad en CA3 y afectar la evocación de la memoria al interferir con la capacidad de cómputo de CA3. Sin embargo, lo novedoso de este estudio es que afectar mecanismos plásticos en el GD (como la acción de BDNF y rNMDAs) puede de hecho favorecer la evocación de la memoria en condiciones en las que las claves espaciales para guiar esta evocación son incompletas.

Durante la evocación de la memoria, el circuito de CA3 recibe inputs externos tanto de la CE como del GD. Contrario a la noción general del GD como el primer componente del loop trisináptico, las neuronas piramidales de CA3 son las primeras en responder a la entrada de información de la CE ^{691,706-708}, con lo cual las proyecciones reversas de CA3 a GD, al inervar interneuronas en el GD, podrían modular la salida de esta estructura y, en respuesta al ingreso de información de la VP a CA3, inhibir el modo de adquisición hipocampal permitiendo que predomine un modo de evocación. Un cambio ambiental

importante en estas circunstancias llevaría a un aumento en la fuerza de los inputs generados por las claves externas presentes, y estos inputs competirían con los internos y predominarían por sobre la fuerza del circuito atractor intrínseco. En este contexto, es posible hipotetizar que en las condiciones TC y CP los inputs de CE por la vía perforante generan una actividad atractora mediada por los colaterales recurrentes en CA3 que se corresponde con la representación del objeto en contexto y, para el momento que llegan los inputs de GD, las fuertes dinámicas atractoras del circuito dominan sobre el input de GD y previenen el remapeo del circuito. Pero, si el input inducido por las claves de evocación proveniente de la CE es más débil (como ocurriría en el caso de CP2), la actividad de los circuitos atractores también será más débil dando la posibilidad de que los estados atractores de CA3 sigan al input del GD y ocurra un remapeo mediado por el desajuste ambiental. Esta competencia ha sido modelada como una función sigmoidea en la cual cambios pequeños en el input llevan a un proceso de tipo compleción de patrones a nivel hipocampal en el cual se tiende a un output más similar que el input, mientras que a medida que los inputs se diferencian el hipocampo cambia a un modo de tipo separación de patrones en el que el output está más diferenciado que los inputs ²⁰⁴. Varios estudios son consistentes con una dinámica no lineal según la cual la compleción de patrones ocurre frente a cambios pequeños en los inputs sensoriales, y la separación de patrones cuando los cambios son más drásticos ^{72,709}. Se han encontrado diferencias en las funciones de transferencia entre GD/CA3 y CA1, de acuerdo a las cuales los campos espaciales de CA3 presentan niveles de remapeo mayores que los de CA1 para ambientes similares ²³³, y de la misma forma cambios en los niveles de IEGs en respuesta a cambios ambientales en CA3 también muestran un patrón de cambio discontinuo, a diferencia del perfil continuo de CA1 ⁷². Nakashiba et al. ²⁵⁹ encontró que la inhibición de proyecciones de células maduras del GD a CA3 en animales transgénicos vía toxina tetánica afectó su capacidad de evocar en forma dependiente del contexto, sugiriendo un rol de las proyecciones de células granulares maduras en procesos de evocación. Sorprendentemente, la misma manipulación generó un aumento en la discriminación contextual específicamente cuando los contextos a discriminar eran altamente similares, lo que sugiere que la separación y compleción son contrarias y que disminuir una puede llevar a un aumento en la otra. En concordancia con esta idea, en este trabajo encontramos que mientras que la inactivación de rNMDAs en GD no tuvo efecto sobre las versiones TC y CP, que presentan una mayor similitud con el contexto original, la misma manipulación en la versión CP2 generó un aumento en la capacidad de los animales de

evocar la memoria original frente a información sensorial altamente degradada. Como mencionamos previamente, se cree que la competencia de los procesos de separación de patrones y compleción de patrones forma parte de un balance que se da en función del nivel de similitud de los estímulos, en el que en presencia de estímulos con menor grado de superposición los inputs provenientes de GD vía FM predominan sobre los internos de CA3. Sin embargo, es posible especular que la inactivación de rNMDAs, que se sabe puede afectar la capacidad de remapeo de tasa de disparo ²⁵⁰, podría alterar la capacidad del GD de responder a estímulos novedosos, y esto podría generar que la región de CA3 logre mantener estables sus campos espaciales tal que pueda evocarse la representación mnemónica original, lo que se evidenciaría en nuestros experimentos como una mejora en la evocación frente a información incompleta. Es posible que este mismo proceso ocurra en la condición CP pero no seamos capaces de detectarlo porque en este caso el balance ya se encuentra a favor de un procesamiento de tipo compleción de patrones o simplemente por la presencia de un efecto piso en la disminución del porcentaje de exploración. Consistente con este resultado y con el rol putativo del GD en la separación de patrones, la infusión del agonista parcial de rNMDAs D-Cic en GD impidió la evocación de la memoria en la condición CP, lo que podría asociarse con un balance hipocampal hacia un modo de adquisición por sobre la evocación.

Por otra parte, otro mecanismo molecular que se ha asociado con el proceso de separación de patrones en el GD es el dependiente de BDNF. Estudios previos encontraron que la expresión de BDNF es necesaria para la diferenciación de representaciones espaciales, y sugieren que este BDNF actuaría específicamente sobre la población de neuronas inmaduras para ejercer este efecto ^{247,540}. En este trabajo encontramos que la infusión de BDNF recombinante en el GD es capaz de impedir la evocación de la memoria en presencia de claves parciales. Es probable que esto se deba a que BDNF promueve la codificación del contexto como novedoso o diferente, lo cual es consistente con el rol de BDNF en la separación de patrones. En este contexto, la presencia de BDNF podría fortalecer el input de la vía de FM de forma tal que el balance entre la fuerza inputs externos respecto a los internos cambie en ausencia de cambios en la información sensorial, y esto podría favorecer la activación de un nuevo ensamble neuronal en CA3 por sobre la reactivación del ensamble original. Considerando estudios anteriores que sugieren que las neuronas del GD nacidas en el adulto participarían preferencialmente en la formación de nuevas memorias al favorecer la formación de

nuevos estados atractores en CA3, mientras que las viejas tendrían un rol preferencial en la evocación de memorias ya que llevarían el sistema a estados atractores formados en engramas previos ²⁵⁹, es posible que el BDNF en GD afecte la relación entre la contribución de cada una de las poblaciones favoreciendo la generación de engramas más distintivos.

Por otra parte, el BDNF en la región de CA3 (al igual que el D-Cic) tiene el efecto opuesto y permite la evocación guiada por un contexto altamente degradado (CP2), que normalmente no es suficiente para guiar la evocación. Es ampliamente aceptado que el factor neurotrófico BDNF es capaz de aumentar rápidamente la transmisión sináptica *in vitro* e *in vivo* ⁴¹⁷, ya sea por un aumento de la transmisión basal ^{440,448} o por alteraciones en el umbral necesario para producir LTP y LTD ^{443-445,710-714}. Además, BDNF aumenta en forma selectiva la fosforilación de las subunidades NR2B de los rNMDAs, también asociadas con el LTP ^{475,715}. Por este motivo, es posible especular que el BDNF, al igual que el agonista parcial D-Cic, podría de alguna forma reforzar el circuito de colaterales recurrentes en CA3 llevando el balance hacia la compleción de patrones.

Las infusiones de ANA-12 previas a la evocación, por otro lado, indican que en el GD el BDNF actúa a través sus receptores TrkB favoreciendo la adquisición de información novedosa. En particular, encontramos que la infusión en el GD del antagonista de receptores TrkB ANA-12 afecta el patrón de reconsolidación mejorando la capacidad del animal de evocar el objeto frente a un contexto altamente degradado volviendo la memoria del objeto lábil y susceptible a la Emetina. Este resultado refuerza la idea de que el BDNF en el GD es necesario para la adquisición de información como novedosa, y que la falta de activación de las vías BDNF-dependientes genera un desbalance hacia un modo de procesamiento hipocampal que favorece la evocación de la memoria contextual previamente almacenada. Por otro lado, el hecho de que el ANA-12 en CA3 no tenga efecto sobre la capacidad de evocar la memoria del objeto en contexto en presencia de un contexto degradado sugiere que bajo condiciones normales el BDNF no forma parte de los mecanismos moleculares que gobiernan el balance entre diferenciación y generalización de memorias en CA3, y que los efectos evidenciados con el BDNF probablemente se deben a un aumento artificial que no se reproduce en condiciones fisiológicas. Otra posibilidad que no puede ser descartada es que el BDNF endógeno actúe a través de otros receptores por los que tiene menor afinidad, como el receptor p75

^{716,717}. Aunque esto es menos probable ya que los niveles de p75 hipocampales son bajos, mientras que los de TrkB son relativamente altos ^{718,719}, esto podría evaluarse en futuros estudios. El conjunto de estos resultados evidencia que el BDNF tiene efectos diferenciales de acuerdo a la región hipocampal, con un rol específico en GD en el reconocimiento en condiciones normales de un contexto degradado como novedoso. El rol diferencial del BDNF de acuerdo con la subregión hipocampal es consistente con diferencias en la expresión de estos receptores, siendo las células granulares del GD las que sintetizan la mayor parte del BDNF hipocampal en la rata adulta ^{720,721}

El cálculo del ajuste o desajuste entre el ambiente y las expectativas podría ser un mediador del cambio entre los modos de codificación y evocación en el hipocampo en condiciones normales ^{186,190,192,236,722-724}, por lo cual es posible que la región de CA1 dado su rol en la detección de novedad sea la encargada de modular el establecimiento de estos distintos modos hipocampales de acuerdo a los niveles de estrés o el estado de alerta (*arousal*), etc. A nivel adaptativo, es útil que la separación se encuentre suavizada con la compleción tal que se pueda reconstruir el ambiente original a partir de esta información sensorial modificada y que alteraciones en el ambiente sin importancia a nivel conductual y adaptativo sean ignoradas ya que de lo contrario esta separación podría resultar disruptiva del funcionamiento normal del LTM, y además es lógico pensar que esto debería ser modulable de acuerdo al contexto interno del sujeto.

En nuestro estudio no evaluamos cambios en la coherencia de las representaciones en CA3 y GD frente a modificaciones en el número de claves contextuales presentes, que son necesarias para poder decir que CA3 realiza compleción de patrones y el GD separación de patrones a nivel de circuitos. Sin embargo, existen estudios anteriores que evidencian que frente a cambios pequeños en el ambiente la información de representaciones en CA3 es más coherente que los inputs de CE ²³⁴, lo que permite verificar la capacidad de esta estructura de realizar compleción de patrones tal como postulan las teorías computacionales.

Sería de interés evaluar cómo el remapeo en la región de CA3 se relaciona con la capacidad del animal de reconocer al contexto como novedoso o familiar cuando este contexto se encuentra degradado, y si este remapeo se ve modificado con las manipulaciones moleculares realizadas (que sabemos tienen un efecto a nivel conductual). En este sentido, es importante señalar que si bien existen estudios que

evalúan cómo remapea la actividad de CA3 o no según cómo cambian las claves contextuales, no hay demostraciones de cómo ese cambio en la actividad se correlaciona con una salida comportamental. No se sabe si cuando un animal reconoce un dado contexto como nuevo hay “remapeo” en la actividad de CA3 para establecer una nueva representación, lo que genera una gran brecha entre los resultados conductuales y electrofisiológicos de la literatura. Tampoco estudiamos cómo cambios en el ambiente modifican las representaciones en CA3 y GD haciéndolas más o menos ortogonales que las provenientes de CE de acuerdo al grado de similitud, pero esto también había sido evaluado en trabajos anteriores ^{72,709}. Sin embargo, ningún estudio había evaluado los parámetros que determinan este balance y si este puede ser modificado, sobre todo teniendo en cuenta que tanto la separación de patrones como la compleción son procesos que requieren de regulación (exceptuando el trabajo de Nakashiba et al.²⁵⁹). En este sentido, los mecanismos involucrados en este balance emergen como blanco de interés ya que cambios en el balance entre separación y compleción de patrones en el circuito GD/CA3 durante el envejecimiento neurocognitivo podría explicar en parte las alteraciones que se observan tanto en humanos como en roedores en la memoria episódica. En este sentido, se ha reportado en el envejecimiento la presencia de “rigidez” en las representaciones espaciales de CA3 frente a cambios en el ambiente que se evidencian como una propensión a usar mapas ya aprendidos en ambientes novedosos ⁷²⁵⁻⁷²⁸ pero también a usar mapas no relacionados en un ambiente familiar, lo que en conjunto indica una falla en la capacidad de evocar el mapa apropiado que genera un uso inadecuado de los mapas espaciales. Esto a su vez se encuentra asociado con cambios en la integridad de la vía perforante ^{729,730} y tasas de disparo anormalmente elevadas en CA3 posiblemente relacionadas con un deterioro de la modulación inhibitoria ^{727,731}. Es posible especular que cambios en los niveles de rNMDAs y BDNF en el HP durante el envejecimiento pueden contribuir a este cambio en el balance separación/compleción, y en experimentos futuros sería de interés evaluar en forma directa cómo se ve alterado este balance frente al envejecimiento, cómo responde este balance frente a variaciones en los niveles de BDNF en HP como las que puede provocar el ejercicio físico, y si este ejercicio es capaz de modificar las posibles alteraciones en este balance durante el envejecimiento.

La reactivación incidental de elementos de un evento es una consecuencia que es posible predecir del modelo de compleción de patrones en el circuito atractor de CA3 y hay

resultados previos que apoyan esta predicción. De acuerdo con esta idea, durante la evocación la actividad de la Prh se correlaciona con el recuerdo (*recollection*) en respuesta a claves espaciales parciales^{45,732}. Además, en otro estudio la evocación de una asociación lleva a una actividad neocortical que se corresponde con la reactivación incidental de todos los elementos del evento⁶⁸⁸. Sin embargo, esto no había sido estudiado hasta el momento en modelos animales. En este trabajo encontramos en una primera instancia que las claves contextuales son utilizadas para guiar la evocación de la traza de memoria del objeto en la Prh, ya que el patrón de reconsolidación de memorias de objetos en la Prh se altera si modificamos la presencia de claves durante la exposición al contexto. En particular, el contexto en presencia de todas las claves lleva a la evocación del objeto, como se evidencia por la amnesia inducida por Emetina de la traza del objeto al día siguiente, pero en ausencia de claves el contexto no es capaz de guiar la evocación del objeto. Además, la evocación guiada por el contexto sin claves distales es capaz de generar la recuperación de la memoria de la asociación del objeto en contexto, como se evidencia por la susceptibilidad al inhibidor de síntesis de proteínas de la traza del objeto asociado al contexto SC durante el entrenamiento, de la misma forma que ocurre con el contexto con todas las claves. Esto sugiere que las claves contextuales que permanecen en el contexto (aún en ausencia de claves distales) son suficientes como para guiar la evocación de un objeto previamente asociado con ese contexto. Además evidencia que la reactivación y subsecuente labilización del objeto es contexto específica porque la exposición al contexto SC labiliza la memoria del objeto asociado al contexto SC, pero no la del objeto asociado al contexto TC (y viceversa).

En los experimentos de reconsolidación de este trabajo existen evidencias de que ocurre una reactivación incidental de todos los elementos del evento original a partir de claves parciales. Como en la condición CP de la tarea tanto la información del objeto como la del contexto se encuentran degradadas, la evocación de la memoria del objeto en estas condiciones implica una demanda de reconstruir la totalidad de la memoria contextual (a partir de claves degradadas), de forma tal que esta pueda guiar la evocación de la memoria del objeto, dado que no habría suficiente información sensorial externa como para guiar esa evocación.

El sistema de células espaciales hipocampales es importante para la construcción de una representación interna de la posición y las características del ambiente, que podría

contribuir al aprendizaje contextual. La capacidad de estas células de lugar de remapear cuando se altera un ambiente familiar o la tarea que el animal debe realizar es necesaria para la asociación de distintas respuestas adaptativas frente a diferencias en la información contextual interna o externa ^{733,734}. Ciertos estudios sugieren que cambios drásticos de ortogonalización en las representaciones de CA3 se darían por remapeos globales asociados a la percepción de distintos contextos, mientras que diferencias más sutiles podrían ocurrir por remapeo de las tasas de disparo, sin cambios en el ensamble codificante ⁷³⁵. En tareas en las que se alteran las claves visuales los campos espaciales en CA3 y CA1 mantienen su posición de disparo pero se observan cambios en sus tasas de disparo, que de todas formas pueden generar cambios equivalentes al remapeo global en cuanto a la disimilitud en la codificación poblacional ^{709,736-739}. Como el código espacial y el de las tasas de disparo pueden ser independientes, se ha hipotetizado que esto permitiría la presencia de un código para la información espacial y otro para información no espacial dentro del hipocampo ⁷⁴⁰. Si bien las células espaciales pueden remapear luego de cambios menores en las claves sensoriales o demandas de la tarea, también estos campos pueden permanecer estables frente a diferencias en las configuraciones de las claves ^{52,689,741,742}. El remapeo puede ser un indicador de un procesamiento de tipo separación de patrones (o compleción de patrones) a nivel hipocampal que cree representaciones independientes de acuerdo a diferencias contextuales siempre en la medida en que esta separación involucre una transformación de patrones superpuestos a no superpuestos (o viceversa en el caso de la compleción de patrones) ⁷⁴³. Y en este sentido, es posible que la compleción de patrones en CA3 ocurra fundamentalmente como resultado de que las células piramidales permanecen unidas a un sistema de coordenadas en particular ^{233,695,735,738}.

Nuestros resultados sugieren que la evocación de la totalidad de la representación mnemónica en forma estable requiere de plasticidad sináptica en la región de CA3. Los sistemas atractores discretos poseen mínimos locales que podrían permitir la evocación al moverse hacia representaciones preformadas luego de la presentación de claves parciales ^{210,223}. De hecho existe evidencia fisiológica que demuestra que la activación sincronizada de CA3 produce la potenciación de las sinapsis colaterales recurrentes independientemente de la estimulación externa, produciendo los llamados "estado de atracción"²¹². Es ampliamente sostenido que la entrada de calcio a través de los canales de rNMDAs durante la estimulación puede producir la señal necesaria para la inducción

del LTP ^{744,745}, y esta inducción en CA3 podría ser necesaria para la recuperación de la memoria en forma dependiente de un sistema atractor como CA3. Cuando las neuronas se activen por información que ingresa por la vía perforante y la despolarización se distribuya por la subpoblación original de neuronas activas de CA3 fuertemente conectadas entre sí, la inducción de LTP en las conexiones entre estas neuronas podría requerirse para mantener la actividad del ensamble en forma reverberante por un período de tiempo transitorio que sea el suficiente como para permitir la recuperación de la memoria a nivel cortical en ausencia de la información sensorial necesaria ^{201,746}. Otra alternativa es que los mecanismos de expresión de los cambios plásticos generados durante la formación de la memoria en CA3 involucren un componente de transmisión sináptica dependiente de rNMDAs, lo que haría que la recuperación de la memoria en condiciones de claves parciales dependa de estos receptores. Es difícil pensar en un rol de los rNMDAs en la expresión del LTP asociativo generado durante la formación de la memoria porque la vasta mayoría de las evidencias sugieren que los rNMDAs son necesarios para la inducción pero no para la expresión del LTP, que implica una potenciación de la corriente no NMDAR-dependiente y no así de la rNMDA-dependiente ^{747,748}. Sin embargo, el tráfico de rNMDAs es inducible por actividad ⁷⁴⁹⁻⁷⁵², y trabajos recientes en GD indican que este ocurre en forma dependiente de síntesis de proteínas en una fase tardía del LTP ⁷⁵³, a diferencia del aumento durante el LTP temprano en el tráfico de rAMPA a membrana. Esto sugiere que los rNMDAs podrían también ser importantes para la expresión de la memoria mediada por LTP. Más aún, existen varios trabajos que plantean una contribución mayor del componente rNMDA-dependiente en la facilitación por pulsos pareados ^{754,755}, un tipo de plasticidad cuyos aumentos o disminuciones se encuentran asociados al LTP y que podría contribuir a la evocación de la memoria en estas condiciones ⁷⁵⁶. Además, las corrientes excitatorias post-sinápticas mediadas por rNMDAs son capaces de mantener el LTP ⁷⁵⁷⁻⁷⁵⁹. De hecho, un trabajo reciente encontró que la activación sincrónica de las sinapsis CA3-CA3 durante ráfagas de actividad poblacional genera LTP asociado con aumento de rNMDAs en membrana y asoció esta potenciación (junto con la depotenciación de sinapsis no activas) con un mecanismo de estabilización de redes neuronales de CA3 en condiciones de actividad sincrónica continua ⁷⁶⁰. Esto es consistente con resultados previos que indican que la ausencia de rNMDAs afecta tanto la memoria de posición como la activación de campos espaciales estables frente a las claves contextuales disponibles ²⁵⁰. De hecho, varias evidencias sugieren que la plasticidad influye en la estabilidad y expresión de los mapas

espaciales hipocampales. La inducción de potenciación a largo plazo es capaz de desencadenar el remapeo de las células de lugar ⁷⁶¹. Luego, la estabilización de los campos espaciales y su posterior reactivación requieren rNMDAs y síntesis de proteínas ^{409,762}. Sin embargo, la estabilidad puede ser regulada por el patrón de disparo de las células de lugar dentro de su campo espacial, con supresiones de la tasa de disparo que llevan al remapeo y facilitaciones que contribuyen a la estabilidad de los campos espaciales ⁷⁶³. Además, la forma de los campos espaciales también puede ser modulada por plasticidad dependiente de la actividad ^{764,765}, y esta modulación también es dependiente de rNMDAs, confirmando aún más la participación de plasticidad sináptica dependiente de actividad en estos procesos ^{766 761}. Durante la exploración de un contexto, su reconocimiento como novedoso o familiar va a estar asociado a una reactivación de los campos espaciales asociados a ese contexto o la formación de campos espaciales nuevos. Es probable que la estabilidad de los campos espaciales se regule a través de procesos dependientes de actividad de acuerdo a los inputs que reciba cada subregión, ya que el disparo sostenido dentro del campo espacial de una célula es necesario para que se establezca un nuevo campo de lugar ⁷⁶⁷, y posiblemente también lo es para que se reestablezca.

Conclusiones finales

En este trabajo demostramos por primera vez un mecanismo potencial que involucra a las proteínas asociadas a plasticidad BDNF y Arc en el GD, y que es necesario para la consolidación/diferenciación de las representaciones mnemónicas de objetos similares y de posiciones similares. Además, encontramos que este mecanismo dependiente de BDNF en el GD es capaz de regular el balance en el procesamiento hipocampal hacia un modo que favorece el reconocimiento de un contexto degradado como novedoso (consistente con el rol de BDNF en separación de patrones).

Además, encontramos que la interacción entre BDNF y Arc en la Prh es necesaria para el almacenamiento en forma diferenciada de representaciones de objetos similares, pero el requerimiento de estas proteínas es selectivo para memorias de objetos (no espaciales) a diferencia del GD. A pesar del rol crucial del GD inicialmente en esta diferenciación, esta estructura no parece formar parte de la traza mnemónica utilizada durante la evocación para discriminar los objetos similares, y de la misma forma la memoria no es modulable a

través de manipulaciones como la infusión de BDNF durante la consolidación (a diferencia de la Prh). Esto marca un rol diferencial de la Prh y el GD durante la consolidación de representaciones diferenciadas de objetos similares, en el que la Prh parecería ser un sitio clave en donde estas representaciones se almacenan y el GD tendría un rol transitorio durante la consolidación en la correcta diferenciación de las memorias de objetos.

Por otra parte, vimos que los rNMDAs en GD (y Prh en el caso de memorias de objetos) interactúan con BDNF para permitir esta discriminación. Más aún, avanzamos en el entendimiento del rol de los rNMDAs hipocampales sobre el balance diferenciación/generalización de las memorias. Utilizando una tarea que implica la evocación de una memoria en un contexto familiar pero degradado, encontramos que la activación de rNMDAs en GD favorece la diferenciación (es decir, el reconocimiento de un contexto como novedoso), mientras que la activación en CA3 favorece la generalización y el reconocimiento del contexto como familiar. De hecho, evidenciamos que es posible modular en forma bidireccional el procesamiento hipocampal hacia la evocación de una memoria o la adquisición de esa información como novedosa afectando el funcionamiento de los rNMDAs o de BDNF. Avanzar en el estudio del equilibrio entre separación y compleción de patrones en el circuito GD/CA3 podría ayudar a comprender como desbalances en este sistema pueden contribuir al deterioro cognitivo en condiciones patológicas o durante el envejecimiento normal. Futuros estudios son necesarios para abordar este problema en mayor profundidad, para esclarecer el rol de los mediadores moleculares que participan de este balance sobre el deterioro cognitivo.

Referencias

- 1 Locke, J. & George Fabyan Collection (Library of Congress). *An essay concerning humane understanding : in four books.* (Printed by Eliz. Holt for Thomas Bassett ... 1690).
- 2 Hebb, D. O. *The organization of behavior; a neuropsychological theory.* (Wiley, 1949).
- 3 Lashley, K. S. *Brain mechanisms and intelligence; a quantitative study of injuries to the brain.* (The University of Chicago Press, 1929).
- 4 Scoville, W. B. & Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **20**, 11-21 (1957).
- 5 Squire, L. R. The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron* **61**, 6-9, doi:10.1016/j.neuron.2008.12.023 (2009).
- 6 Squire, L. R., Stark, C. E. & Clark, R. E. The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* **27**, 279-306, doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130 (2004).
- 7 Wixted, J. T. & Squire, L. R. The medial temporal lobe and the attributes of memory. *Trends Cogn Sci* **15**, 210-217, doi:10.1016/j.tics.2011.03.005 (2011).
- 8 Squire, L. R. & Zola-Morgan, S. The medial temporal lobe memory system. *Science* **253**, 1380-1386 (1991).
- 9 Brown, M. W. & Aggleton, J. P. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* **2**, 51-61, doi:10.1038/35049064 (2001).
- 10 Eichenbaum, H., Yonelinas, A. P. & Ranganath, C. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci* **30**, 123-152, doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094328 (2007).
- 11 Bowles, B. *et al.* Impaired familiarity with preserved recollection after anterior temporal-lobe resection that spares the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16382-16387, doi:10.1073/pnas.0705273104 (2007).
- 12 Montaldi, D., Spencer, T. J., Roberts, N. & Mayes, A. R. The neural system that mediates familiarity memory. *Hippocampus* **16**, 504-520, doi:10.1002/hipo.20178 (2006).
- 13 Ranganath, C. *et al.* Dissociable correlates of recollection and familiarity within the medial temporal lobes. *Neuropsychologia* **42**, 2-13 (2004).
- 14 Yonelinas, A. P. & Parks, C. M. Receiver operating characteristics (ROCs) in recognition memory: a review. *Psychol Bull* **133**, 800-832, doi:10.1037/0033-2909.133.5.800 (2007).
- 15 Staresina, B. P. & Davachi, L. Selective and shared contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to episodic item and associative encoding. *J Cogn Neurosci* **20**, 1478-1489, doi:10.1162/jocn.2008.20104 (2008).
- 16 Diana, R. A., Yonelinas, A. P. & Ranganath, C. Medial temporal lobe activity during source retrieval reflects information type, not memory strength. *J Cogn Neurosci* **22**, 1808-1818, doi:10.1162/jocn.2009.21335 (2010).
- 17 Bussey, T. J. & Saksida, L. M. Memory, perception, and the ventral visual-perirhinal-hippocampal stream: thinking outside of the boxes. *Hippocampus* **17**, 898-908, doi:10.1002/hipo.20320 (2007).
- 18 Winters, B. D., Forwood, S. E., Cowell, R. A., Saksida, L. M. & Bussey, T. J. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci* **24**, 5901-5908, doi:10.1523/JNEUROSCI.1346-04.2004 (2004).

- 19 Ennaceur, A., Neave, N. & Aggleton, J. P. Neurotoxic lesions of the perirhinal cortex do not mimic the behavioural effects of fornix transection in the rat. *Behav Brain Res* **80**, 9-25 (1996).
- 20 Mumby, D. G. Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav Brain Res* **127**, 159-181 (2001).
- 21 Aggleton, J. P., Kyd, R. J. & Bilkey, D. K. When is the perirhinal cortex necessary for the performance of spatial memory tasks? *Neurosci Biobehav Rev* **28**, 611-624, doi:10.1016/j.neubiorev.2004.08.007 (2004).
- 22 Zola, S. M. *et al.* Impaired recognition memory in monkeys after damage limited to the hippocampal region. *J Neurosci* **20**, 451-463 (2000).
- 23 Clark, R. E., Zola, S. M. & Squire, L. R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* **20**, 8853-8860 (2000).
- 24 Eacott, M. J. & Norman, G. Integrated memory for object, place, and context in rats: a possible model of episodic-like memory? *J Neurosci* **24**, 1948-1953, doi:10.1523/JNEUROSCI.2975-03.2004 (2004).
- 25 Eichenbaum, H., Otto, T. & Cohen, N. J. The hippocampus--what does it do? *Behav Neural Biol* **57**, 2-36 (1992).
- 26 Davachi, L. Item, context and relational episodic encoding in humans. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 693-700, doi:10.1016/j.conb.2006.10.012 (2006).
- 27 Eacott, M. J. & Gaffan, E. A. The roles of perirhinal cortex, postrhinal cortex, and the fornix in memory for objects, contexts, and events in the rat. *Q J Exp Psychol B* **58**, 202-217, doi:10.1080/02724990444000203 (2005).
- 28 Eichenbaum, H. & Fortin, N. J. Bridging the gap between brain and behavior: cognitive and neural mechanisms of episodic memory. *J Exp Anal Behav* **84**, 619-629 (2005).
- 29 Montaldi, D. & Mayes, A. R. The role of recollection and familiarity in the functional differentiation of the medial temporal lobes. *Hippocampus* **20**, 1291-1314, doi:10.1002/hipo.20853 (2010).
- 30 Rempel-Clower, N. L., Zola, S. M., Squire, L. R. & Amaral, D. G. Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J Neurosci* **16**, 5233-5255 (1996).
- 31 Teng, E. & Squire, L. R. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature* **400**, 675-677, doi:10.1038/23276 (1999).
- 32 Squire, L. R. Memory and brain systems: 1969-2009. *J Neurosci* **29**, 12711-12716, doi:10.1523/JNEUROSCI.3575-09.2009 (2009).
- 33 Jarrard, L. E. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* **60**, 9-26 (1993).
- 34 Zola-Morgan, S. & Squire, L. R. The neuropsychology of memory. Parallel findings in humans and nonhuman primates. *Ann N Y Acad Sci* **608**, 434-450; discussion 450-436 (1990).
- 35 Moser, M. B. & Moser, E. I. Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J Neurosci* **18**, 7535-7542 (1998).
- 36 Anagnostaras, S. G., Maren, S. & Fanselow, M. S. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci* **19**, 1106-1114 (1999).
- 37 Tang, Y. P. *et al.* Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* **401**, 63-69, doi:10.1038/43432 (1999).

- 38 Martin, S. J., de Hoz, L. & Morris, R. G. Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia* **43**, 609-624, doi:10.1016/j.neuropsychologia.2004.07.007 (2005).
- 39 Morris, R. G., Hagan, J. J. & Rawlins, J. N. Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the "spatial mapping" and "working memory" theories of hippocampal function. *Q J Exp Psychol B* **38**, 365-395 (1986).
- 40 Pastalkova, E. *et al.* Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* **313**, 1141-1144, doi:10.1126/science.1128657 (2006).
- 41 Yonelinas, A. P. *et al.* Effects of extensive temporal lobe damage or mild hypoxia on recollection and familiarity. *Nat Neurosci* **5**, 1236-1241, doi:10.1038/nn961 (2002).
- 42 Eldridge, L. L., Knowlton, B. J., Furmanski, C. S., Bookheimer, S. Y. & Engel, S. A. Remembering episodes: a selective role for the hippocampus during retrieval. *Nat Neurosci* **3**, 1149-1152, doi:10.1038/80671 (2000).
- 43 Ryan, L. *et al.* Hippocampal complex and retrieval of recent and very remote autobiographical memories: evidence from functional magnetic resonance imaging in neurologically intact people. *Hippocampus* **11**, 707-714, doi:10.1002/hipo.1086 (2001).
- 44 Daselaar, S. M., Fleck, M. S. & Cabeza, R. Triple dissociation in the medial temporal lobes: recollection, familiarity, and novelty. *J Neurophysiol* **96**, 1902-1911, doi:10.1152/jn.01029.2005 (2006).
- 45 Diana, R. A., Yonelinas, A. P. & Ranganath, C. Imaging recollection and familiarity in the medial temporal lobe: a three-component model. *Trends Cogn Sci* **11**, 379-386, doi:10.1016/j.tics.2007.08.001 (2007).
- 46 Wiltgen, B. J. *et al.* The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *Curr Biol* **20**, 1336-1344, doi:10.1016/j.cub.2010.06.068 (2010).
- 47 Goshen, I. *et al.* Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell* **147**, 678-689, doi:10.1016/j.cell.2011.09.033 (2011).
- 48 Gilbert, P. E. & Kesner, R. P. Role of the rodent hippocampus in paired-associate learning involving associations between a stimulus and a spatial location. *Behav Neurosci* **116**, 63-71 (2002).
- 49 Rajji, T., Chapman, D., Eichenbaum, H. & Greene, R. The role of CA3 hippocampal NMDA receptors in paired associate learning. *J Neurosci* **26**, 908-915, doi:10.1523/JNEUROSCI.4194-05.2006 (2006).
- 50 Kesner, R. P. & Rolls, E. T. A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: new developments. *Neurosci Biobehav Rev* **48**, 92-147, doi:10.1016/j.neubiorev.2014.11.009 (2015).
- 51 O'Keefe, J. & Dostrovsky, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* **34**, 171-175 (1971).
- 52 Muller, R. U. & Kubie, J. L. The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *J Neurosci* **7**, 1951-1968 (1987).
- 53 Bliss, T. V. & Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**, 331-356 (1973).
- 54 Milner, B., Squire, L. R. & Kandel, E. R. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* **20**, 445-468 (1998).

- 55 Steward, O. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* **167**, 285-314, doi:10.1002/cne.901670303 (1976).
- 56 Witter, M. P. Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus* **3 Spec No**, 33-44 (1993).
- 57 Agster, K. L. & Burwell, R. D. Hippocampal and subicular efferents and afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Behav Brain Res* **254**, 50-64, doi:10.1016/j.bbr.2013.07.005 (2013).
- 58 Uva, L., Gruschke, S., Biella, G., De Curtis, M. & Witter, M. P. Cytoarchitectonic characterization of the parahippocampal region of the guinea pig. *J Comp Neurol* **474**, 289-303, doi:10.1002/cne.20121 (2004).
- 59 Burwell, R. D., Bucci, D. J., Sanborn, M. R. & Jutras, M. J. Perirhinal and postrhinal contributions to remote memory for context. *J Neurosci* **24**, 11023-11028, doi:10.1523/JNEUROSCI.3781-04.2004 (2004).
- 60 Knierim, J. J. The hippocampus. *Curr Biol* **25**, R1116-1121, doi:10.1016/j.cub.2015.10.049 (2015).
- 61 Sloviter, R. S. & Lomo, T. Updating the lamellar hypothesis of hippocampal organization. *Front Neural Circuits* **6**, 102, doi:10.3389/fncir.2012.00102 (2012).
- 62 Sutherland, R. J., Whishaw, I. Q. & Kolb, B. A behavioural analysis of spatial localization following electrolytic, kainate- or colchicine-induced damage to the hippocampal formation in the rat. *Behav Brain Res* **7**, 133-153 (1983).
- 63 Olsen, G. M., Scheel-Kruger, J., Moller, A. & Jensen, L. H. Relation of spatial learning of rats in the Morris water maze task to the number of viable CA1 neurons following four-vessel occlusion. *Behav Neurosci* **108**, 681-690 (1994).
- 64 Emerich, D. F. & Walsh, T. J. Selective working memory impairments following intradentate injection of colchicine: attenuation of the behavioral but not the neuropathological effects by gangliosides GM1 and AGF2. *Physiol Behav* **45**, 93-101 (1989).
- 65 Tilson, H. A. *et al.* Time-dependent neurobiological effects of colchicine administered directly into the hippocampus of rats. *Brain Res* **408**, 163-172 (1987).
- 66 Davis, H. P., Baranowski, J. R., Pulsinelli, W. A. & Volpe, B. T. Retention of reference memory following ischemic hippocampal damage. *Physiol Behav* **39**, 783-786 (1987).
- 67 Jarrard, L. E. Selective hippocampal lesions and behavior: effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. *Behav Neurosci* **97**, 873-889 (1983).
- 68 Burwell, R. D., Witter, M. P. & Amaral, D. G. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* **5**, 390-408, doi:10.1002/hipo.450050503 (1995).
- 69 Bennett, M. R., Gibson, W. G. & Robinson, J. Dynamics of the CA3 pyramidal neuron autoassociative memory network in the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **343**, 167-187, doi:10.1098/rstb.1994.0019 (1994).
- 70 Gilbert, P. E. & Kesner, R. P. Localization of function within the dorsal hippocampus: the role of the CA3 subregion in paired-associate learning. *Behav Neurosci* **117**, 1385-1394, doi:10.1037/0735-7044.117.6.1385 (2003).
- 71 Hasselmo, M. E. & McClelland, J. L. Neural models of memory. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 184-188 (1999).
- 72 Vazdarjanova, A. & Guzowski, J. F. Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence for distinct, yet

- complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *J Neurosci* **24**, 6489-6496, doi:10.1523/JNEUROSCI.0350-04.2004 (2004).
- 73 O'Reilly, R. C. & McClelland, J. L. Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off. *Hippocampus* **4**, 661-682, doi:10.1002/hipo.450040605 (1994).
- 74 Suzuki, W. A. & Amaral, D. G. Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cortical afferents. *J Comp Neurol* **350**, 497-533, doi:10.1002/cne.903500402 (1994).
- 75 Lavenex, P., Suzuki, W. A. & Amaral, D. G. Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: projections to the neocortex. *J Comp Neurol* **447**, 394-420, doi:10.1002/cne.10243 (2002).
- 76 Barker, G. R., Bird, F., Alexander, V. & Warburton, E. C. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J Neurosci* **27**, 2948-2957, doi:10.1523/JNEUROSCI.5289-06.2007 (2007).
- 77 Zola-Morgan, S., Squire, L. R., Amaral, D. G. & Suzuki, W. A. Lesions of perirhinal and parahippocampal cortex that spare the amygdala and hippocampal formation produce severe memory impairment. *J Neurosci* **9**, 4355-4370 (1989).
- 78 Meunier, M., Bachevalier, J., Mishkin, M. & Murray, E. A. Effects on visual recognition of combined and separate ablations of the entorhinal and perirhinal cortex in rhesus monkeys. *J Neurosci* **13**, 5418-5432 (1993).
- 79 Buffalo, E. A., Ramus, S. J., Squire, L. R. & Zola, S. M. Perception and recognition memory in monkeys following lesions of area TE and perirhinal cortex. *Learn Mem* **7**, 375-382 (2000).
- 80 Buckley, M. J. & Gaffan, D. Impairment of visual object-discrimination learning after perirhinal cortex ablation. *Behav Neurosci* **111**, 467-475 (1997).
- 81 Bussey, T. J., Saksida, L. M. & Murray, E. A. Impairments in visual discrimination after perirhinal cortex lesions: testing 'declarative' vs. 'perceptual-mnemonic' views of perirhinal cortex function. *Eur J Neurosci* **17**, 649-660 (2003).
- 82 Gaffan, D. & Murray, E. A. Monkeys (*Macaca fascicularis*) with rhinal cortex ablations succeed in object discrimination learning despite 24-hr intertrial intervals and fail at matching to sample despite double sample presentations. *Behav Neurosci* **106**, 30-38 (1992).
- 83 Winters, B. D. & Bussey, T. J. Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci* **25**, 52-61, doi:10.1523/JNEUROSCI.3827-04.2005 (2005).
- 84 Barker, G. R. *et al.* The different effects on recognition memory of perirhinal kainate and NMDA glutamate receptor antagonism: implications for underlying plasticity mechanisms. *J Neurosci* **26**, 3561-3566, doi:10.1523/JNEUROSCI.3154-05.2006 (2006).
- 85 Winters, B. D. & Bussey, T. J. Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci* **25**, 4243-4251, doi:10.1523/JNEUROSCI.0480-05.2005 (2005).
- 86 Wan, H., Aggleton, J. P. & Brown, M. W. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci* **19**, 1142-1148 (1999).
- 87 Warburton, E. C. *et al.* cAMP responsive element-binding protein phosphorylation is necessary for perirhinal long-term potentiation and recognition memory. *J Neurosci* **25**, 6296-6303, doi:10.1523/JNEUROSCI.0506-05.2005 (2005).

- 88 Aggleton, J. P. & Brown, M. W. Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. *Q J Exp Psychol B* **58**, 218-233, doi:10.1080/02724990444000131 (2005).
- 89 Davachi, L., Mitchell, J. P. & Wagner, A. D. Multiple routes to memory: distinct medial temporal lobe processes build item and source memories. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2157-2162, doi:10.1073/pnas.0337195100 (2003).
- 90 Corodimas, K. P. & LeDoux, J. E. Disruptive effects of posttraining perirhinal cortex lesions on conditioned fear: contributions of contextual cues. *Behav Neurosci* **109**, 613-619 (1995).
- 91 Higuchi, S. & Miyashita, Y. Formation of mnemonic neuronal responses to visual paired associates in inferotemporal cortex is impaired by perirhinal and entorhinal lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 739-743 (1996).
- 92 Suzuki, W. A. The anatomy, physiology and functions of the perirhinal cortex. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 179-186 (1996).
- 93 Buckley, M. J. & Gaffan, D. Perirhinal cortex ablation impairs configural learning and paired-associate learning equally. *Neuropsychologia* **36**, 535-546 (1998).
- 94 Sato, N. & Nakamura, K. Visual response properties of neurons in the parahippocampal cortex of monkeys. *J Neurophysiol* **90**, 876-886, doi:10.1152/jn.01089.2002 (2003).
- 95 Naya, Y., Yoshida, M. & Miyashita, Y. Backward spreading of memory-retrieval signal in the primate temporal cortex. *Science* **291**, 661-664, doi:10.1126/science.291.5504.661 (2001).
- 96 Deshmukh, S. S., Johnson, J. L. & Knierim, J. J. Perirhinal cortex represents nonspatial, but not spatial, information in rats foraging in the presence of objects: comparison with lateral entorhinal cortex. *Hippocampus* **22**, 2045-2058, doi:10.1002/hipo.22046 (2012).
- 97 Murray, E. A. & Bussey, T. J. Perceptual-mnemonic functions of the perirhinal cortex. *Trends Cogn Sci* **3**, 142-151 (1999).
- 98 Buckley, M. J., Booth, M. C., Rolls, E. T. & Gaffan, D. Selective perceptual impairments after perirhinal cortex ablation. *J Neurosci* **21**, 9824-9836 (2001).
- 99 Bussey, T. J., Saksida, L. M. & Murray, E. A. Perirhinal cortex resolves feature ambiguity in complex visual discriminations. *Eur J Neurosci* **15**, 365-374 (2002).
- 100 Bartko, S. J., Winters, B. D., Cowell, R. A., Saksida, L. M. & Bussey, T. J. Perirhinal cortex resolves feature ambiguity in configural object recognition and perceptual oddity tasks. *Learn Mem* **14**, 821-832, doi:10.1101/lm.749207 (2007).
- 101 Riches, I. P., Wilson, F. A. & Brown, M. W. The effects of visual stimulation and memory on neurons of the hippocampal formation and the neighboring parahippocampal gyrus and inferior temporal cortex of the primate. *J Neurosci* **11**, 1763-1779 (1991).
- 102 Fahy, F. L., Riches, I. P. & Brown, M. W. Neuronal activity related to visual recognition memory: long-term memory and the encoding of recency and familiarity information in the primate anterior and medial inferior temporal and rhinal cortex. *Exp Brain Res* **96**, 457-472 (1993).
- 103 Brown, M. W. & Xiang, J. Z. Recognition memory: neuronal substrates of the judgement of prior occurrence. *Prog Neurobiol* **55**, 149-189 (1998).
- 104 Holscher, C., Rolls, E. T. & Xiang, J. Perirhinal cortex neuronal activity related to long-term familiarity memory in the macaque. *Eur J Neurosci* **18**, 2037-2046 (2003).
- 105 Balderas, I. *et al.* The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learn Mem* **15**, 618-624, doi:10.1101/lm.1028008 (2008).

- 106 Seoane, A., Tinsley, C. J. & Brown, M. W. Interfering with perirhinal brain-derived neurotrophic factor expression impairs recognition memory in rats. *Hippocampus* **21**, 121-126, doi:10.1002/hipo.20763 (2011).
- 107 Warburton, E. C. *et al.* Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron* **38**, 987-996 (2003).
- 108 Wan, H. *et al.* Benzodiazepine impairment of perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Eur J Neurosci* **20**, 2214-2224, doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03688.x (2004).
- 109 Miller, E. K. & Desimone, R. Scopolamine affects short-term memory but not inferior temporal neurons. *Neuroreport* **4**, 81-84 (1993).
- 110 Eacott, M. J., Machin, P. E. & Gaffan, E. A. Elemental and configural visual discrimination learning following lesions to perirhinal cortex in the rat. *Behav Brain Res* **124**, 55-70 (2001).
- 111 Norman, G. & Eacott, M. J. Impaired object recognition with increasing levels of feature ambiguity in rats with perirhinal cortex lesions. *Behav Brain Res* **148**, 79-91 (2004).
- 112 Bartko, S. J., Winters, B. D., Cowell, R. A., Saksida, L. M. & Bussey, T. J. Perceptual functions of perirhinal cortex in rats: zero-delay object recognition and simultaneous oddity discriminations. *J Neurosci* **27**, 2548-2559, doi:10.1523/JNEUROSCI.5171-06.2007 (2007).
- 113 Bussey, T. J. & Saksida, L. M. The organization of visual object representations: a connectionist model of effects of lesions in perirhinal cortex. *Eur J Neurosci* **15**, 355-364 (2002).
- 114 Saksida, L. M., Bussey, T. J., Buckmaster, C. A. & Murray, E. A. Impairment and facilitation of transverse patterning after lesions of the perirhinal cortex and hippocampus, respectively. *Cereb Cortex* **17**, 108-115, doi:10.1093/cercor/bhj128 (2007).
- 115 Saksida, L. M. & Bussey, T. J. The representational-hierarchical view of amnesia: translation from animal to human. *Neuropsychologia* **48**, 2370-2384, doi:10.1016/j.neuropsychologia.2010.02.026 (2010).
- 116 Murray, E. A., Bussey, T. J. & Saksida, L. M. Visual perception and memory: a new view of medial temporal lobe function in primates and rodents. *Annu Rev Neurosci* **30**, 99-122, doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.113046 (2007).
- 117 Bartko, S. J., Cowell, R. A., Winters, B. D., Bussey, T. J. & Saksida, L. M. Heightened susceptibility to interference in an animal model of amnesia: impairment in encoding, storage, retrieval--or all three? *Neuropsychologia* **48**, 2987-2997, doi:10.1016/j.neuropsychologia.2010.06.007 (2010).
- 118 Sutherland, R. J., McDonald, R. J., Hill, C. R. & Rudy, J. W. Damage to the hippocampal formation in rats selectively impairs the ability to learn cue relationships. *Behav Neural Biol* **52**, 331-356 (1989).
- 119 Rudy, J. W. & Sutherland, R. J. Configural association theory and the hippocampal formation: an appraisal and reconfiguration. *Hippocampus* **5**, 375-389, doi:10.1002/hipo.450050502 (1995).
- 120 Pearce, J. M. Similarity and discrimination: a selective review and a connectionist model. *Psychol Rev* **101**, 587-607 (1994).
- 121 Rudy, J. W. & O'Reilly, R. C. Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behav Neurosci* **113**, 867-880 (1999).
- 122 Fanselow, M. S., DeCola, J. P. & Young, S. L. Mechanisms responsible for reduced contextual conditioning with massed unsigned unconditional stimuli. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **19**, 121-137 (1993).

- 123 Rescorla, R. A. & Cunningham, C. L. Within-compound flavor associations. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **4**, 267-275 (1978).
- 124 Alvarado, M. C. & Rudy, J. W. Rats with damage to the hippocampal-formation are impaired on the transverse-patterning problem but not on elemental discriminations. *Behav Neurosci* **109**, 204-211 (1995).
- 125 Gallagher, M. & Holland, P. C. Preserved configural learning and spatial learning impairment in rats with hippocampal damage. *Hippocampus* **2**, 81-88, doi:10.1002/hipo.450020111 (1992).
- 126 Cowell, R. A., Bussey, T. J. & Saksida, L. M. Why does brain damage impair memory? A connectionist model of object recognition memory in perirhinal cortex. *J Neurosci* **26**, 12186-12197, doi:10.1523/JNEUROSCI.2818-06.2006 (2006).
- 127 Bogacz, R., Brown, M. W. & Giraud-Carrier, C. Model of familiarity discrimination in the perirhinal cortex. *J Comput Neurosci* **10**, 5-23 (2001).
- 128 Ahn, J. R. & Lee, I. Neural correlates of object-associated choice behavior in the perirhinal cortex of rats. *J Neurosci* **35**, 1692-1705, doi:10.1523/JNEUROSCI.3160-14.2015 (2015).
- 129 O'Reilly, R. C. & Rudy, J. W. Computational principles of learning in the neocortex and hippocampus. *Hippocampus* **10**, 389-397, doi:10.1002/1098-1063(2000)10:4<389::AID-HIPO5>3.0.CO;2-P (2000).
- 130 Kealy, J. & Commins, S. The rat perirhinal cortex: A review of anatomy, physiology, plasticity, and function. *Prog Neurobiol* **93**, 522-548, doi:10.1016/j.pneurobio.2011.03.002 (2011).
- 131 Ivanco, T. L. & Racine, R. J. Long-term potentiation in the reciprocal corticohippocampal and corticocortical pathways in the chronically implanted, freely moving rat. *Hippocampus* **10**, 143-152, doi:10.1002/(SICI)1098-1063(2000)10:2<143::AID-HIPO3>3.0.CO;2-G (2000).
- 132 Eichenbaum, H. How does the hippocampus contribute to memory? *Trends Cogn Sci* **7**, 427-429 (2003).
- 133 Squire, L. R. & Zola-Morgan, J. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci* **34**, 259-288, doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113720 (2011).
- 134 Tulving, E., Donaldson, W., Bower, G. H. & United States. Office of Naval Research. *Organization of memory*. (Academic Press, 1972).
- 135 Tulving, E. Episodic memory: from mind to brain. *Annu Rev Psychol* **53**, 1-25, doi:10.1146/annurev.psych.53.100901.135114 (2002).
- 136 Nyberg, L., Kim, A. S., Habib, R., Levine, B. & Tulving, E. Consciousness of subjective time in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22356-22359, doi:10.1073/pnas.1016823108 (2010).
- 137 Pause, B. M. *et al.* Perspectives on episodic-like and episodic memory. *Front Behav Neurosci* **7**, 33, doi:10.3389/fnbeh.2013.00033 (2013).
- 138 Mayes, A., Montaldi, D. & Migo, E. Associative memory and the medial temporal lobes. *Trends Cogn Sci* **11**, 126-135, doi:10.1016/j.tics.2006.12.003 (2007).
- 139 Dere, E. *et al.* Episodic-like and procedural memory impairments in histamine H1 Receptor knockout mice coincide with changes in acetylcholine esterase activity in the hippocampus and dopamine turnover in the cerebellum. *Neuroscience* **157**, 532-541, doi:10.1016/j.neuroscience.2008.09.025 (2008).
- 140 Müller, G. E. & Pilzecker, A. *Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtniss*. (J. A. Barth, 1900).
- 141 Duncan, C. P. The retroactive effect of electroshock on learning. *J Comp Physiol Psychol* **42**, 32-44 (1949).

- 142 Dudai, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* **55**, 51-86, doi:10.1146/annurev.psych.55.090902.142050 (2004).
- 143 Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**, 1030-1038, doi:10.1126/science.1067020 (2001).
- 144 Malenka, R. C. & Bear, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**, 5-21, doi:10.1016/j.neuron.2004.09.012 (2004).
- 145 Katz, J. & Halstead, W. C. Protein organization and mental function. *Comp. Psychol.* **20**, 1-38 (1950).
- 146 Agranoff, B. W. Molecules and memories. *Perspect Biol Med* **9**, 13-22 (1965).
- 147 Bourtchouladze, R. *et al.* Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem* **5**, 365-374 (1998).
- 148 Quevedo, J. *et al.* Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* **6**, 600-607 (1999).
- 149 Igaz, L. M., Vianna, M. R., Medina, J. H. & Izquierdo, I. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* **22**, 6781-6789, doi:20026642 (2002).
- 150 Flood, J. F., Bennett, E. L., Orme, E. & Rosenzweig, M. R. Relation of memory formation to controlled amounts of brain protein synthesis. *Physiol Behav* **15**, 97-102 (1975).
- 151 Davis, H. P., Spanis, C. W. & Squire, L. R. Inhibition of cerebral protein synthesis: performance at different times after passive avoidance training. *Pharmacol Biochem Behav* **4**, 13-16 (1976).
- 152 Grecksch, G. & Matthies, H. Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol Biochem Behav* **12**, 663-665 (1980).
- 153 Montarolo, P. G. *et al.* A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* **234**, 1249-1254 (1986).
- 154 Rosenblum, K., Meiri, N. & Dudai, Y. Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* **59**, 49-56 (1993).
- 155 Pedreira, M. E., Dimant, B., Tomic, D., Quesada-Allue, L. A. & Maldonado, H. Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav* **52**, 385-395 (1995).
- 156 Ghirardi, M., Montarolo, P. G. & Kandel, E. R. A novel intermediate stage in the transition between short- and long-term facilitation in the sensory to motor neuron synapse of *aplysia*. *Neuron* **14**, 413-420 (1995).
- 157 Schafe, G. E. & LeDoux, J. E. Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* **20**, RC96 (2000).
- 158 Scharf, M. T. *et al.* Protein synthesis is required for the enhancement of long-term potentiation and long-term memory by spaced training. *J Neurophysiol* **87**, 2770-2777, doi:10.1152/jn.2002.87.6.2770 (2002).
- 159 Flood, J. F., Bennett, E. L., Orme, A. E. & Rosenzweig, M. R. Effects of protein synthesis inhibition on memory for active avoidance training. *Physiol Behav* **14**, 177-184 (1975).
- 160 Barondes, S. H. Cerebral protein synthesis inhibitors block long-term memory. *Int Rev Neurobiol* **12**, 177-205 (1970).
- 161 Davis, H. P. & Squire, L. R. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* **96**, 518-559 (1984).

- 162 Izquierdo, I. *et al.* Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working,
short-term and long-term memory. *Behav Pharmacol* **9**, 421-427 (1998).
- 163 McGaugh, J. L. Memory--a century of consolidation. *Science* **287**, 248-251 (2000).
- 164 Underwood, B. J. Interference and forgetting. *Psychol Rev* **64**, 49-60 (1957).
- 165 Postman, L. & Underwood, B. J. Critical issues in interference theory. *Mem Cognit* **1**, 19-40,
doi:10.3758/BF03198064 (1973).
- 166 Lewis, D. J. & Maher, B. A. Neural Consolidation and Electroconvulsive Shock. *Psychol Rev*
72, 225-239 (1965).
- 167 Misanin, J. R., Miller, R. R. & Lewis, D. J. Retrograde amnesia produced by
electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* **160**,
554-555 (1968).
- 168 Judge, M. E. & Quartermain, D. Characteristics of retrograde amnesia following
reactivation of memory in mice. *Physiol Behav* **28**, 585-590 (1982).
- 169 Nader, K., Schafe, G. E. & Le Doux, J. E. Fear memories require protein synthesis in the
amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**, 722-726, doi:10.1038/35021052
(2000).
- 170 Walker, M. P., Brakefield, T., Hobson, J. A. & Stickgold, R. Dissociable stages of human
memory consolidation and reconsolidation. *Nature* **425**, 616-620,
doi:10.1038/nature01930 (2003).
- 171 Milekic, M. H. & Alberini, C. M. Temporally graded requirement for protein synthesis
following memory reactivation. *Neuron* **36**, 521-525 (2002).
- 172 Lee, J. L., Everitt, B. J. & Thomas, K. L. Independent cellular processes for hippocampal
memory consolidation and reconsolidation. *Science* **304**, 839-843,
doi:10.1126/science.1095760 (2004).
- 173 Taubenfeld, S. M., Muravieva, E. V., Garcia-Osta, A. & Alberini, C. M. Disrupting the
memory of places induced by drugs of abuse weakens motivational withdrawal in a
context-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12345-12350,
doi:10.1073/pnas.1003152107 (2010).
- 174 Tronson, N. C. & Taylor, J. R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev*
Neurosci **8**, 262-275, doi:10.1038/nrn2090 (2007).
- 175 Barnes, P., Kirtley, A. & Thomas, K. L. Quantitatively and qualitatively different cellular
processes are engaged in CA1 during the consolidation and reconsolidation of contextual
fear memory. *Hippocampus* **22**, 149-171, doi:10.1002/hipo.20879 (2012).
- 176 Kelly, A., Laroche, S. & Davis, S. Activation of mitogen-activated protein
kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for
consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* **23**, 5354-5360
(2003).
- 177 Alberini, C. M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation
similar or distinct processes? *Trends Neurosci* **28**, 51-56, doi:10.1016/j.tins.2004.11.001
(2005).
- 178 Ranganath, C., Heller, A., Cohen, M. X., Brozinsky, C. J. & Rissman, J. Functional
connectivity with the hippocampus during successful memory formation. *Hippocampus*
15, 997-1005, doi:10.1002/hipo.20141 (2005).
- 179 Schomaker, J. & Meeter, M. Short- and long-lasting consequences of novelty, deviance and
surprise on brain and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* **55**, 268-279,
doi:10.1016/j.neubiorev.2015.05.002 (2015).

- 180 Kafkas, A. & Montaldi, D. How do memory systems detect and respond to novelty? *Neurosci Lett* **680**, 60-68, doi:10.1016/j.neulet.2018.01.053 (2018).
- 181 Xiang, J. Z. & Brown, M. W. Differential neuronal encoding of novelty, familiarity and recency in regions of the anterior temporal lobe. *Neuropharmacology* **37**, 657-676 (1998).
- 182 Baylis, G. C. & Rolls, E. T. Responses of neurons in the inferior temporal cortex in short term and serial recognition memory tasks. *Exp Brain Res* **65**, 614-622 (1987).
- 183 Viskontas, I. V., Knowlton, B. J., Steinmetz, P. N. & Fried, I. Differences in mnemonic processing by neurons in the human hippocampus and parahippocampal regions. *J Cogn Neurosci* **18**, 1654-1662, doi:10.1162/jocn.2006.18.10.1654 (2006).
- 184 Rutishauser, U., Mamelak, A. N. & Schuman, E. M. Single-trial learning of novel stimuli by individual neurons of the human hippocampus-amygdala complex. *Neuron* **49**, 805-813, doi:10.1016/j.neuron.2006.02.015 (2006).
- 185 Kafkas, A. & Montaldi, D. Two separate, but interacting, neural systems for familiarity and novelty detection: a dual-route mechanism. *Hippocampus* **24**, 516-527, doi:10.1002/hipo.22241 (2014).
- 186 Vinogradova, O. S. Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus* **11**, 578-598, doi:10.1002/hipo.1073 (2001).
- 187 Vago, D. R. & Kesner, R. P. Disruption of the direct perforant path input to the CA1 subregion of the dorsal hippocampus interferes with spatial working memory and novelty detection. *Behav Brain Res* **189**, 273-283, doi:10.1016/j.bbr.2008.01.002 (2008).
- 188 Staresina, B. P., Duncan, K. D. & Davachi, L. Perirhinal and parahippocampal cortices differentially contribute to later recollection of object- and scene-related event details. *J Neurosci* **31**, 8739-8747, doi:10.1523/JNEUROSCI.4978-10.2011 (2011).
- 189 Kafkas, A. & Montaldi, D. Striatal and midbrain connectivity with the hippocampus selectively boosts memory for contextual novelty. *Hippocampus* **25**, 1262-1273, doi:10.1002/hipo.22434 (2015).
- 190 Lisman, J. E. & Grace, A. A. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* **46**, 703-713, doi:10.1016/j.neuron.2005.05.002 (2005).
- 191 Larkin, M. C., Lykken, C., Tye, L. D., Wickelgren, J. G. & Frank, L. M. Hippocampal output area CA1 broadcasts a generalized novelty signal during an object-place recognition task. *Hippocampus* **24**, 773-783, doi:10.1002/hipo.22268 (2014).
- 192 Lisman, J. E. & Otmakhova, N. A. Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. *Hippocampus* **11**, 551-568, doi:10.1002/hipo.1071 (2001).
- 193 Li, S., Cullen, W. K., Anwyl, R. & Rowan, M. J. Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nat Neurosci* **6**, 526-531, doi:10.1038/nn1049 (2003).
- 194 Strange, B. A., Duggins, A., Penny, W., Dolan, R. J. & Friston, K. J. Information theory, novelty and hippocampal responses: unpredicted or unpredictable? *Neural Netw* **18**, 225-230, doi:10.1016/j.neunet.2004.12.004 (2005).
- 195 Strange, B. A. *et al.* Dopamine receptor 4 promoter polymorphism modulates memory and neuronal responses to salience. *Neuroimage* **84**, 922-931, doi:10.1016/j.neuroimage.2013.09.065 (2014).
- 196 McClelland, J. L., McNaughton, B. L. & O'Reilly, R. C. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev* **102**, 419-457 (1995).

- 197 Norman, K. A. & O'Reilly, R. C. Modeling hippocampal and neocortical contributions to recognition memory: a complementary-learning-systems approach. *Psychol Rev* **110**, 611-646, doi:10.1037/0033-295X.110.4.611 (2003).
- 198 Rumelhart, D. E., McClelland, J. L. & University of California San Diego. PDP Research Group. *Parallel distributed processing : explorations in the microstructure of cognition*. (MIT Press, 1986).
- 199 White, N. M. Reward or reinforcement: what's the difference? *Neurosci Biobehav Rev* **13**, 181-186 (1989).
- 200 McClelland, H. Learning from the past to build the future. *Int Emerg Nurs* **23**, 211-212, doi:10.1016/j.ienj.2015.06.004 (2015).
- 201 Marr, D. Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **262**, 23-81 (1971).
- 202 McNaughton, B. L. & Morris, R. G. Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends Neurosci* **10** (1987).
- 203 Treves, A. & Rolls, E. T. Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus* **2**, 189-199, doi:10.1002/hipo.450020209 (1992).
- 204 McClelland, J. L. & Goddard, N. H. Considerations arising from a complementary learning systems perspective on hippocampus and neocortex. *Hippocampus* **6**, 654-665, doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:6<654::AID-HIPO8>3.0.CO;2-G (1996).
- 205 Rolls, E. T., Treves, A., Robertson, R. G., Georges-Francois, P. & Panzeri, S. Information about spatial view in an ensemble of primate hippocampal cells. *J Neurophysiol* **79**, 1797-1813, doi:10.1152/jn.1998.79.4.1797 (1998).
- 206 Harris, E. W. & Cotman, C. W. Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci Lett* **70**, 132-137 (1986).
- 207 Zalutsky, R. A. & Nicoll, R. A. Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* **248**, 1619-1624 (1990).
- 208 Ito, I. *et al.* Synapse-selective impairment of NMDA receptor functions in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 or epsilon 2 subunit. *J Physiol* **500 (Pt 2)**, 401-408 (1997).
- 209 Debanne, D., Gahwiler, B. H. & Thompson, S. M. Long-term synaptic plasticity between pairs of individual CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *J Physiol* **507 (Pt 1)**, 237-247 (1998).
- 210 Amit, D. J. & Treves, A. Associative memory neural network with low temporal spiking rates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7871-7875 (1989).
- 211 Rolls, E. T. A computational theory of episodic memory formation in the hippocampus. *Behav Brain Res* **215**, 180-196, doi:10.1016/j.bbr.2010.03.027 (2010).
- 212 Bains, J. S., Longacher, J. M. & Staley, K. J. Reciprocal interactions between CA3 network activity and strength of recurrent collateral synapses. *Nat Neurosci* **2**, 720-726, doi:10.1038/11184 (1999).
- 213 Gold, A. E. & Kesner, R. P. The role of the CA3 subregion of the dorsal hippocampus in spatial pattern completion in the rat. *Hippocampus* **15**, 808-814, doi:10.1002/hipo.20103 (2005).
- 214 Ryan, J. D. & Cohen, N. J. Processing and short-term retention of relational information in amnesia. *Neuropsychologia* **42**, 497-511 (2004).
- 215 Kohonen, T. *Associative memory : a system-theoretical approach*. (Springer-Verlag, 1977).
- 216 Amaral, D. G., Ishizuka, N. & Claiborne, B. Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog Brain Res* **83**, 1-11 (1990).

- 217 Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B. & Moser, E. I. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science* **315**, 961-966, doi:10.1126/science.1135801 (2007).
- 218 Jung, M. W. & McNaughton, B. L. Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus* **3**, 165-182, doi:10.1002/hipo.450030209 (1993).
- 219 Chawla, M. K. *et al.* Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus* **15**, 579-586, doi:10.1002/hipo.20091 (2005).
- 220 Brown, T. H., Kairiss, E. W. & Keenan, C. L. Hebbian synapses: biophysical mechanisms and algorithms. *Annu Rev Neurosci* **13**, 475-511, doi:10.1146/annurev.ne.13.030190.002355 (1990).
- 221 Derrick, B. E. & Martinez, J. L., Jr. Associative, bidirectional modifications at the hippocampal mossy fibre-CA3 synapse. *Nature* **381**, 429-434, doi:10.1038/381429a0 (1996).
- 222 Rolls, E. T. Diluted connectivity in pattern association networks facilitates the recall of information from the hippocampus to the neocortex. *Prog Brain Res* **219**, 21-43, doi:10.1016/bs.pbr.2015.03.007 (2015).
- 223 Treves, A. & Rolls, E. T. Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus* **4**, 374-391, doi:10.1002/hipo.450040319 (1994).
- 224 Gilbert, P. E., Kesner, R. P. & DeCoteau, W. E. Memory for spatial location: role of the hippocampus in mediating spatial pattern separation. *J Neurosci* **18**, 804-810 (1998).
- 225 Rolls, E. T. & Kesner, R. P. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog Neurobiol* **79**, 1-48, doi:10.1016/j.pneurobio.2006.04.005 (2006).
- 226 Snyder, J. S. & Cameron, H. A. Could adult hippocampal neurogenesis be relevant for human behavior? *Behav Brain Res* **227**, 384-390, doi:10.1016/j.bbr.2011.06.024 (2012).
- 227 van Groen, T., Miettinen, P. & Kadish, I. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus* **13**, 133-149, doi:10.1002/hipo.10037 (2003).
- 228 Rolls, E. T., Tromans, J. M. & Stringer, S. M. Spatial scene representations formed by self-organizing learning in a hippocampal extension of the ventral visual system. *Eur J Neurosci* **28**, 2116-2127, doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06486.x (2008).
- 229 Rolls, E. T. An attractor network in the hippocampus: theory and neurophysiology. *Learn Mem* **14**, 714-731, doi:10.1101/lm.631207 (2007).
- 230 Lee, I. & Kesner, R. P. Encoding versus retrieval of spatial memory: double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus* **14**, 66-76, doi:10.1002/hipo.10167 (2004).
- 231 Lee, I. & Kesner, R. P. Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. *Hippocampus* **14**, 301-310, doi:10.1002/hipo.10177 (2004).
- 232 Lassalle, J. M., Bataille, T. & Halley, H. Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task. *Neurobiol Learn Mem* **73**, 243-257, doi:10.1006/nlme.1999.3931 (2000).
- 233 Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Treves, A., Moser, M. B. & Moser, E. I. Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1. *Science* **305**, 1295-1298, doi:10.1126/science.1100265 (2004).

- 234 Neunuebel, J. P. & Knierim, J. J. CA3 retrieves coherent representations from degraded input: direct evidence for CA3 pattern completion and dentate gyrus pattern separation. *Neuron* **81**, 416-427, doi:10.1016/j.neuron.2013.11.017 (2014).
- 235 Molyneaux, B. J. & Hasselmo, M. E. GABA(B) presynaptic inhibition has an in vivo time constant sufficiently rapid to allow modulation at theta frequency. *J Neurophysiol* **87**, 1196-1205, doi:10.1152/jn.00077.2001 (2002).
- 236 Hasselmo, M. E., Schnell, E. & Barkai, E. Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. *J Neurosci* **15**, 5249-5262 (1995).
- 237 Colgin, L. L. *et al.* Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature* **462**, 353-357, doi:10.1038/nature08573 (2009).
- 238 Manns, J. R., Zilli, E. A., Ong, K. C., Hasselmo, M. E. & Eichenbaum, H. Hippocampal CA1 spiking during encoding and retrieval: relation to theta phase. *Neurobiol Learn Mem* **87**, 9-20, doi:10.1016/j.nlm.2006.05.007 (2007).
- 239 Rizzuto, D. S. *et al.* Reset of human neocortical oscillations during a working memory task. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7931-7936, doi:10.1073/pnas.0732061100 (2003).
- 240 Henze, D. A., Wittner, L. & Buzsaki, G. Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nat Neurosci* **5**, 790-795, doi:10.1038/nn887 (2002).
- 241 Deng, W., Aimone, J. B. & Gage, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* **11**, 339-350, doi:10.1038/nrn2822 (2010).
- 242 Ranganath, C. A unified framework for the functional organization of the medial temporal lobes and the phenomenology of episodic memory. *Hippocampus* **20**, 1263-1290, doi:10.1002/hipo.20852 (2010).
- 243 Kirwan, C. B. & Stark, C. E. Overcoming interference: an fMRI investigation of pattern separation in the medial temporal lobe. *Learn Mem* **14**, 625-633, doi:10.1101/lm.663507 (2007).
- 244 Clelland, C. D. *et al.* A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* **325**, 210-213, doi:10.1126/science.1173215 (2009).
- 245 Toner, C. K., Pirogovsky, E., Kirwan, C. B. & Gilbert, P. E. Visual object pattern separation deficits in nondemented older adults. *Learn Mem* **16**, 338-342, doi:10.1101/lm.1315109 (2009).
- 246 Creer, D. J., Romberg, C., Saksida, L. M., van Praag, H. & Bussey, T. J. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2367-2372, doi:10.1073/pnas.0911725107 (2010).
- 247 Bekinschtein, P. *et al.* BDNF in the dentate gyrus is required for consolidation of "pattern-separated" memories. *Cell Rep* **5**, 759-768, doi:10.1016/j.celrep.2013.09.027 (2013).
- 248 Gilbert, P. E., Kesner, R. P. & Lee, I. Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* **11**, 626-636, doi:10.1002/hipo.1077 (2001).
- 249 McHugh, T. J. *et al.* Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* **317**, 94-99, doi:10.1126/science.1140263 (2007).
- 250 Nakazawa, K. *et al.* Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. *Neuron* **38**, 305-315 (2003).
- 251 Bekinschtein, P., Cammarota, M. & Medina, J. H. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* **76 Pt C**, 677-683, doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.024 (2014).

- 252 Aimone, J. B., Deng, W. & Gage, F. H. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron* **70**, 589-596, doi:10.1016/j.neuron.2011.05.010 (2011).
- 253 Sahay, A. *et al.* Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* **472**, 466-470, doi:10.1038/nature09817 (2011).
- 254 Esposito, M. S. *et al.* Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* **25**, 10074-10086, doi:10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005 (2005).
- 255 Marin-Burgin, A., Mongiat, L. A., Pardi, M. B. & Schinder, A. F. Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science* **335**, 1238-1242, doi:10.1126/science.1214956 (2012).
- 256 Wang, S., Scott, B. W. & Wojtowicz, J. M. Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J Neurobiol* **42**, 248-257 (2000).
- 257 Schmidt-Hieber, C., Jonas, P. & Bischofberger, J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* **429**, 184-187, doi:10.1038/nature02553 (2004).
- 258 Ge, S., Yang, C. H., Hsu, K. S., Ming, G. L. & Song, H. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* **54**, 559-566, doi:10.1016/j.neuron.2007.05.002 (2007).
- 259 Nakashiba, T. *et al.* Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* **149**, 188-201, doi:10.1016/j.cell.2012.01.046 (2012).
- 260 Yassa, M. A. & Stark, C. E. Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci* **34**, 515-525, doi:10.1016/j.tins.2011.06.006 (2011).
- 261 Norman, K. A. How hippocampus and cortex contribute to recognition memory: revisiting the complementary learning systems model. *Hippocampus* **20**, 1217-1227, doi:10.1002/hipo.20855 (2010).
- 262 Semon, R. W. & Simon, L. *The mneme*. (G. Allen & Unwin Ltd.; The Macmillan company, 1921).
- 263 Schacter, D. L. *The seven sins of memory : how the mind forgets and remembers*. (Houghton Mifflin, 2001).
- 264 Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D. S. & Ryan, T. J. Memory engram storage and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* **35**, 101-109, doi:10.1016/j.conb.2015.07.009 (2015).
- 265 Martin, S. J., Grimwood, P. D. & Morris, R. G. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* **23**, 649-711, doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.649 (2000).
- 266 Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. & Kasai, H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* **429**, 761-766, doi:10.1038/nature02617 (2004).
- 267 Olshausen, B. A. & Field, D. J. Sparse coding of sensory inputs. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 481-487, doi:10.1016/j.conb.2004.07.007 (2004).
- 268 Ramirez, S., Tonegawa, S. & Liu, X. Identification and optogenetic manipulation of memory engrams in the hippocampus. *Front Behav Neurosci* **7**, 226, doi:10.3389/fnbeh.2013.00226 (2013).
- 269 Tanaka, K. Z. *et al.* Cortical representations are reinstated by the hippocampus during memory retrieval. *Neuron* **84**, 347-354, doi:10.1016/j.neuron.2014.09.037 (2014).

- 270 Denny, C. A. *et al.* Hippocampal memory traces are differentially modulated by
experience, time, and adult neurogenesis. *Neuron* **83**, 189-201,
doi:10.1016/j.neuron.2014.05.018 (2014).
- 271 Tayler, K. K., Tanaka, K. Z., Reijmers, L. G. & Wiltgen, B. J. Reactivation of neural ensembles
during the retrieval of recent and remote memory. *Curr Biol* **23**, 99-106,
doi:10.1016/j.cub.2012.11.019 (2013).
- 272 Han, J. H. *et al.* Neuronal competition and selection during memory formation. *Science*
316, 457-460, doi:10.1126/science.1139438 (2007).
- 273 Yiu, A. P. *et al.* Neurons are recruited to a memory trace based on relative neuronal
excitability immediately before training. *Neuron* **83**, 722-735,
doi:10.1016/j.neuron.2014.07.017 (2014).
- 274 Stefanelli, T., Bertollini, C., Luscher, C., Muller, D. & Mendez, P. Hippocampal Somatostatin
Interneurons Control the Size of Neuronal Memory Ensembles. *Neuron* **89**, 1074-1085,
doi:10.1016/j.neuron.2016.01.024 (2016).
- 275 Lamprecht, R. & LeDoux, J. Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* **5**, 45-54,
doi:10.1038/nrn1301 (2004).
- 276 Barco, A., Bailey, C. H. & Kandel, E. R. Common molecular mechanisms in explicit and
implicit memory. *J Neurochem* **97**, 1520-1533, doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03870.x
(2006).
- 277 Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G. & Bear, M. F. Learning induces long-term
potentiation in the hippocampus. *Science* **313**, 1093-1097, doi:10.1126/science.1128134
(2006).
- 278 Bliss, T. V. & Collingridge, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the
hippocampus. *Nature* **361**, 31-39, doi:10.1038/361031a0 (1993).
- 279 Arai, A., Larson, J. & Lynch, G. Anoxia reveals a vulnerable period in the development of
long-term potentiation. *Brain Res* **511**, 353-357 (1990).
- 280 Barrionuevo, G., Schottler, F. & Lynch, G. The effects of repetitive low frequency
stimulation on control and "potentiated" synaptic responses in the hippocampus. *Life Sci*
27, 2385-2391 (1980).
- 281 Roman, F., Staubli, U. & Lynch, G. Evidence for synaptic potentiation in a cortical network
during learning. *Brain Res* **418**, 221-226 (1987).
- 282 Lisman, J., Schulman, H. & Cline, H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and
behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* **3**, 175-190, doi:10.1038/nrn753 (2002).
- 283 Malinow, R. & Malenka, R. C. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev
Neurosci* **25**, 103-126, doi:10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758 (2002).
- 284 Frey, U., Krug, M., Reymann, K. G. & Matthies, H. Anisomycin, an inhibitor of protein
synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro.
Brain Res **452**, 57-65 (1988).
- 285 Davis, S. & Laroche, S. A molecular biological approach to synaptic plasticity and learning.
C R Acad Sci III **321**, 97-107 (1998).
- 286 Steward, O. & Worley, P. F. A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs
to synaptic sites on dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7062-7068,
doi:10.1073/pnas.131146398 (2001).
- 287 Alberini, C. M. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol
Rev* **89**, 121-145, doi:10.1152/physrev.00017.2008 (2009).

- 288 Morris, R. G. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci* **23**, 2829-2846, doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04888.x (2006).
- 289 Ruediger, S. *et al.* Learning-related feedforward inhibitory connectivity growth required for memory precision. *Nature* **473**, 514-518, doi:10.1038/nature09946 (2011).
- 290 Frey, U. & Morris, R. G. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* **385**, 533-536, doi:10.1038/385533a0 (1997).
- 291 Sajikumar, S. & Frey, J. U. Late-associativity, synaptic tagging, and the role of dopamine during LTP and LTD. *Neurobiol Learn Mem* **82**, 12-25, doi:10.1016/j.nlm.2004.03.003 (2004).
- 292 Kauderer, B. S. & Kandel, E. R. Capture of a protein synthesis-dependent component of long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13342-13347, doi:10.1073/pnas.97.24.13342 (2000).
- 293 Engert, F. & Bonhoeffer, T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* **399**, 66-70, doi:10.1038/19978 (1999).
- 294 Maletic-Savatic, M., Malinow, R. & Svoboda, K. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* **283**, 1923-1927 (1999).
- 295 Bozdagi, O., Shan, W., Tanaka, H., Benson, D. L. & Huntley, G. W. Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron* **28**, 245-259 (2000).
- 296 Geinisman, Y. Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning. *Cereb Cortex* **10**, 952-962 (2000).
- 297 Weeks, A. C., Ivanco, T. L., Leboutillier, J. C., Racine, R. J. & Petit, T. L. Sequential changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus: III. Long-term maintenance phase. *Synapse* **40**, 74-84, doi:10.1002/1098-2396(200104)40:1<74::AID-SYN1028>3.0.CO;2-D (2001).
- 298 Zhou, Q., Xiao, M. & Nicoll, R. A. Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1261-1266, doi:10.1073/pnas.031573798 (2001).
- 299 Fukazawa, Y. *et al.* Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* **38**, 447-460 (2003).
- 300 Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A. & Hayashi, Y. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci* **7**, 1104-1112, doi:10.1038/nn1311 (2004).
- 301 Zito, K., Knott, G., Shepherd, G. M., Shenolikar, S. & Svoboda, K. Induction of spine growth and synapse formation by regulation of the spine actin cytoskeleton. *Neuron* **44**, 321-334, doi:10.1016/j.neuron.2004.09.022 (2004).
- 302 Tada, T. & Sheng, M. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 95-101, doi:10.1016/j.conb.2005.12.001 (2006).
- 303 Hotulainen, P. & Hoogenraad, C. C. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol* **189**, 619-629, doi:10.1083/jcb.201003008 (2010).
- 304 Gipson, C. D. & Olive, M. F. Structural and functional plasticity of dendritic spines - root or result of behavior? *Genes Brain Behav* **16**, 101-117, doi:10.1111/gbb.12324 (2017).
- 305 Krucker, T., Siggins, G. R. & Halpain, S. Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6856-6861, doi:10.1073/pnas.100139797 (2000).

- 306 Bonhoeffer, T. & Yuste, R. Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron* **35**, 1019-1027 (2002).
- 307 Zhou, Q., Homma, K. J. & Poo, M. M. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* **44**, 749-757, doi:10.1016/j.neuron.2004.11.011 (2004).
- 308 Fedulov, V. *et al.* Evidence that long-term potentiation occurs within individual hippocampal synapses during learning. *J Neurosci* **27**, 8031-8039, doi:10.1523/JNEUROSCI.2003-07.2007 (2007).
- 309 Davis, S., Butcher, S. P. & Morris, R. G. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J Neurosci* **12**, 21-34 (1992).
- 310 Grant, S. G. & Silva, A. J. Targeting learning. *Trends Neurosci* **17**, 71-75 (1994).
- 311 Abeliovich, A. *et al.* Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma-mutant mice. *Cell* **75**, 1253-1262 (1993).
- 312 Abeliovich, A. *et al.* PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. *Cell* **75**, 1263-1271 (1993).
- 313 Moser, E. I., Moser, M. B. & Andersen, P. Potentiation of dentate synapses initiated by exploratory learning in rats: dissociation from brain temperature, motor activity, and arousal. *Learn Mem* **1**, 55-73 (1994).
- 314 Eichenbaum, H. & Otto, T. LTP and memory: can we enhance the connection? *Trends Neurosci* **16**, 163-164 (1993).
- 315 Takeuchi, T., Duzskiewicz, A. J. & Morris, R. G. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**, 20130288, doi:10.1098/rstb.2013.0288 (2014).
- 316 Bozon, B. *et al.* MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 805-814, doi:10.1098/rstb.2002.1224 (2003).
- 317 Silingardi, D. *et al.* ERK pathway activation bidirectionally affects visual recognition memory and synaptic plasticity in the perirhinal cortex. *Front Behav Neurosci* **5**, 84, doi:10.3389/fnbeh.2011.00084 (2011).
- 318 Brown, M. W. & Bashir, Z. I. Evidence concerning how neurons of the perirhinal cortex may effect familiarity discrimination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**, 1083-1095, doi:10.1098/rstb.2002.1097 (2002).
- 319 Griffiths, S. *et al.* Expression of long-term depression underlies visual recognition memory. *Neuron* **58**, 186-194, doi:10.1016/j.neuron.2008.02.022 (2008).
- 320 Flexner, J. B., Flexner, L. B. & Stellar, E. Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science* **141**, 57-59 (1963).
- 321 Agranoff, B. W. & Klinger, P. D. Puromycin Effect on Memory Fixation in the Goldfish. *Science* **146**, 952-953 (1964).
- 322 Abel, T. *et al.* Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* **88**, 615-626 (1997).
- 323 Izquierdo, I. & Medina, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* **68**, 285-316, doi:10.1006/nlme.1997.3799 (1997).
- 324 Sweatt, J. D. Hippocampal function in cognition. *Psychopharmacology (Berl)* **174**, 99-110, doi:10.1007/s00213-004-1795-9 (2004).

- 325 Morrow, B. A., Elsworth, J. D., Inglis, F. M. & Roth, R. H. An antisense oligonucleotide reverses the footshock-induced expression of fos in the rat medial prefrontal cortex and the subsequent expression of conditioned fear-induced immobility. *J Neurosci* **19**, 5666-5673 (1999).
- 326 Cammarota, M. *et al.* Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res* **76**, 36-46 (2000).
- 327 Guzowski, J. F. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* **12**, 86-104, doi:10.1002/hipo.10010 (2002).
- 328 He, J., Yamada, K. & Nabeshima, T. A role of Fos expression in the CA3 region of the hippocampus in spatial memory formation in rats. *Neuropsychopharmacology* **26**, 259-268, doi:10.1016/S0893-133X(01)00332-3 (2002).
- 329 Fleischmann, A. *et al.* Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *J Neurosci* **23**, 9116-9122 (2003).
- 330 Countryman, R. A., Orłowski, J. D., Brightwell, J. J., Oskowitz, A. Z. & Colombo, P. J. CREB phosphorylation and c-Fos expression in the hippocampus of rats during acquisition and recall of a socially transmitted food preference. *Hippocampus* **15**, 56-67, doi:10.1002/hipo.20030 (2005).
- 331 Yasoshima, Y., Sako, N., Senba, E. & Yamamoto, T. Acute suppression, but not chronic genetic deficiency, of c-fos gene expression impairs long-term memory in aversive taste learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7106-7111, doi:10.1073/pnas.0600869103 (2006).
- 332 Brunelli, M., Castellucci, V. & Kandel, E. R. Synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: possible role of serotonin and cyclic AMP. *Science* **194**, 1178-1181 (1976).
- 333 Bernabeu, R. *et al.* Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7041-7046 (1997).
- 334 Locatelli, F., Maldonado, H. & Romano, A. Two critical periods for cAMP-dependent protein kinase activity during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem* **77**, 234-249, doi:10.1006/nlme.2001.4007 (2002).
- 335 Atkins, C. M., Selcher, J. C., Petraitis, J. J., Trzaskos, J. M. & Sweatt, J. D. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* **1**, 602-609, doi:10.1038/2836 (1998).
- 336 Selcher, J. C., Atkins, C. M., Trzaskos, J. M., Paylor, R. & Sweatt, J. D. A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. *Learn Mem* **6**, 478-490 (1999).
- 337 Schafe, G. E. *et al.* Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* **20**, 8177-8187 (2000).
- 338 Alonso, M., Viola, H., Izquierdo, I. & Medina, J. H. Aversive experiences are associated with a rapid and transient activation of ERKs in the rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* **77**, 119-124, doi:10.1006/nlme.2000.4000 (2002).
- 339 Gooney, M., Shaw, K., Kelly, A., O'Mara, S. M. & Lynch, M. A. Long-term potentiation and spatial learning are associated with increased phosphorylation of TrkB and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the dentate gyrus: evidence for a role for brain-derived neurotrophic factor. *Behav Neurosci* **116**, 455-463 (2002).

- 340 Kelleher, R. J., 3rd, Govindarajan, A., Jung, H. Y., Kang, H. & Tonegawa, S. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* **116**, 467-479 (2004).
- 341 Sweatt, J. D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 311-317, doi:10.1016/j.conb.2004.04.001 (2004).
- 342 English, J. D. & Sweatt, J. D. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* **272**, 19103-19106 (1997).
- 343 Rosenblum, K. *et al.* The role of extracellular regulated kinases I/II in late-phase long-term potentiation. *J Neurosci* **22**, 5432-5441, doi:20026549 (2002).
- 344 Impey, S. *et al.* Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* **16**, 973-982 (1996).
- 345 Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J. & Laroche, S. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* **20**, 4563-4572 (2000).
- 346 Bartsch, D., Casadio, A., Karl, K. A., Serodio, P. & Kandel, E. R. CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell* **95**, 211-223 (1998).
- 347 Taubenfeld, S. M. *et al.* Fornix-dependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein [beta] and [delta] Co-localizes with phosphorylated cAMP response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. *J Neurosci* **21**, 84-91 (2001).
- 348 Hall, J., Thomas, K. L. & Everitt, B. J. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* **3**, 533-535, doi:10.1038/75698 (2000).
- 349 Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H. & Nabeshima, T. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J Neurosci* **20**, 7116-7121 (2000).
- 350 Tokuyama, W., Okuno, H., Hashimoto, T., Xin Li, Y. & Miyashita, Y. BDNF upregulation during declarative memory formation in monkey inferior temporal cortex. *Nat Neurosci* **3**, 1134-1142, doi:10.1038/80655 (2000).
- 351 Alonso, M., Vianna, M. R., Izquierdo, I. & Medina, J. H. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol* **22**, 663-674 (2002).
- 352 Egan, M. F. *et al.* The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* **112**, 257-269 (2003).
- 353 Monteggia, L. M. *et al.* Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10827-10832, doi:10.1073/pnas.0402141101 (2004).
- 354 Pezawas, L. *et al.* The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci* **24**, 10099-10102, doi:10.1523/JNEUROSCI.2680-04.2004 (2004).
- 355 Rattiner, L. M., Davis, M. & Ressler, K. J. Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts during the consolidation of fear learning. *Learn Mem* **11**, 727-731, doi:10.1101/lm.83304 (2004).
- 356 Alonso, M. *et al.* Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn Mem* **12**, 504-510, doi:10.1101/lm.27305 (2005).

- 357 Ou, L. C. & Gean, P. W. Regulation of amygdala-dependent learning by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3-kinase. *Neuropsychopharmacology* **31**, 287-296, doi:10.1038/sj.npp.1300830 (2006).
- 358 Rossetti, T. *et al.* Memory Erasure Experiments Indicate a Critical Role of CaMKII in Memory Storage. *Neuron* **96**, 207-216 e202, doi:10.1016/j.neuron.2017.09.010 (2017).
- 359 Lledo, P. M. *et al.* Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11175-11179 (1995).
- 360 Lee, S. J., Escobedo-Lozoya, Y., Szatmari, E. M. & Yasuda, R. Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* **458**, 299-304, doi:10.1038/nature07842 (2009).
- 361 Fukunaga, K., Stoppini, L., Miyamoto, E. & Muller, D. Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* **268**, 7863-7867 (1993).
- 362 Strack, S., Choi, S., Lovinger, D. M. & Colbran, R. J. Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density. *J Biol Chem* **272**, 13467-13470 (1997).
- 363 Chen, H. X., Otmakhov, N., Strack, S., Colbran, R. J. & Lisman, J. E. Is persistent activity of calcium/calmodulin-dependent kinase required for the maintenance of LTP? *J Neurophysiol* **85**, 1368-1376, doi:10.1152/jn.2001.85.4.1368 (2001).
- 364 Brakeman, P. R. *et al.* Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* **386**, 284-288, doi:10.1038/386284a0 (1997).
- 365 Xiao, B. *et al.* Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron* **21**, 707-716 (1998).
- 366 Xiao, B., Tu, J. C. & Worley, P. F. Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 370-374 (2000).
- 367 Gerstein, H., O'Riordan, K., Osting, S., Schwarz, M. & Burger, C. Rescue of synaptic plasticity and spatial learning deficits in the hippocampus of Homer1 knockout mice by recombinant Adeno-associated viral gene delivery of Homer1c. *Neurobiol Learn Mem* **97**, 17-29, doi:10.1016/j.nlm.2011.08.009 (2012).
- 368 Davis, R. L., Cherry, J., Dauwalder, B., Han, P. L. & Skoulakis, E. The cyclic AMP system and *Drosophila* learning. *Mol Cell Biochem* **149-150**, 271-278 (1995).
- 369 Silva, A. J., Kogan, J. H., Frankland, P. W. & Kida, S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* **21**, 127-148, doi:10.1146/annurev.neuro.21.1.127 (1998).
- 370 Tsien, J. Z., Huerta, P. T. & Tonegawa, S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* **87**, 1327-1338 (1996).
- 371 Guzowski, J. F. *et al.* Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* **20**, 3993-4001 (2000).
- 372 Li, Y. F. *et al.* Phosphodiesterase-4D knock-out and RNA interference-mediated knock-down enhance memory and increase hippocampal neurogenesis via increased cAMP signaling. *J Neurosci* **31**, 172-183, doi:10.1523/JNEUROSCI.5236-10.2011 (2011).
- 373 Wagatsuma, A. *et al.* De Novo synthesis of CREB in a presynaptic neuron is required for synaptic enhancement involved in memory consolidation. *J Neurosci Res* **84**, 954-960, doi:10.1002/jnr.21012 (2006).

- 374 Cull-Candy, S. G. & Leszkiewicz, D. N. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central
synapses. *Sci STKE* **2004**, re16, doi:10.1126/stke.2552004re16 (2004).
- 375 Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. & Traynelis, S. F. The glutamate receptor ion channels.
Pharmacol Rev **51**, 7-61 (1999).
- 376 Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. & Prochiantz, A. Magnesium gates
glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**, 462-465 (1984).
- 377 Nicoll, R. A., Kauer, J. A. & Malenka, R. C. The current excitement in long-term
potentiation. *Neuron* **1**, 97-103 (1988).
- 378 Collingridge, G. Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory.
Nature **330**, 604-605, doi:10.1038/330604a0 (1987).
- 379 Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple
forms and mechanisms. *Trends Neurosci* **16**, 521-527 (1993).
- 380 Bliss, T. V. & Collingridge, G. L. Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the
hippocampus: bridging the divide. *Mol Brain* **6**, 5, doi:10.1186/1756-6606-6-5 (2013).
- 381 Collingridge, G. L., Isaac, J. T. & Wang, Y. T. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat
Rev Neurosci* **5**, 952-962, doi:10.1038/nrn1556 (2004).
- 382 Collingridge, G. L., Kehl, S. J. & McLennan, H. Excitatory amino acids in synaptic
transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J
Physiol* **334**, 33-46 (1983).
- 383 Dudek, S. M. & Bear, M. F. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of
hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U
S A* **89**, 4363-4367 (1992).
- 384 Mulkey, R. M. & Malenka, R. C. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-
term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* **9**, 967-975 (1992).
- 385 Huganir, R. L. & Nicoll, R. A. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron* **80**,
704-717, doi:10.1016/j.neuron.2013.10.025 (2013).
- 386 Sugihara, H., Moriyoshi, K., Ishii, T., Masu, M. & Nakanishi, S. Structures and properties of
seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem Biophys
Res Commun* **185**, 826-832 (1992).
- 387 Monyer, H. *et al.* Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of
subtypes. *Science* **256**, 1217-1221 (1992).
- 388 Schorge, S. & Colquhoun, D. Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with
truncated and tandem subunits. *J Neurosci* **23**, 1151-1158 (2003).
- 389 Ulbrich, M. H. & Isacoff, E. Y. Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat Methods*
4, 319-321, doi:10.1038/nmeth1024 (2007).
- 390 Vicini, S. *et al.* Functional and pharmacological differences between recombinant N-
methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol* **79**, 555-566, doi:10.1152/jn.1998.79.2.555
(1998).
- 391 Wyllie, D. J., Behe, P. & Colquhoun, D. Single-channel activations and concentration jumps:
comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors. *J Physiol* **510** (
Pt 1), 1-18 (1998).
- 392 Luo, J., Wang, Y., Yasuda, R. P., Dunah, A. W. & Wolfe, B. B. The majority of N-methyl-D-
aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different
subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Mol Pharmacol* **51**, 79-86 (1997).
- 393 Liu, L. *et al.* Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal
synaptic plasticity. *Science* **304**, 1021-1024, doi:10.1126/science.1096615 (2004).

- 394 Chen, B. S. & Roche, K. W. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology* **53**, 362-368, doi:10.1016/j.neuropharm.2007.05.018 (2007).
- 395 Salter, M. W., Dong, Y., Kalia, L. V., Liu, X. J. & Pitcher, G. in *Biology of the NMDA Receptor Frontiers in Neuroscience* (ed A. M. Van Dongen) (2009).
- 396 Lieberman, D. N. & Mody, I. Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase. *Nature* **369**, 235-239, doi:10.1038/369235a0 (1994).
- 397 Morris, R. G., Davis, S. & Butcher, S. P. Hippocampal synaptic plasticity and NMDA receptors: a role in information storage? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **329**, 187-204, doi:10.1098/rstb.1990.0164 (1990).
- 398 Doyere, V. & Laroche, S. Linear relationship between the maintenance of hippocampal long-term potentiation and retention of an associative memory. *Hippocampus* **2**, 39-48, doi:10.1002/hipo.450020106 (1992).
- 399 Kessels, H. W. & Malinow, R. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* **61**, 340-350, doi:10.1016/j.neuron.2009.01.015 (2009).
- 400 Xu, X., Russell, T., Bazner, J. & Hamilton, J. NMDA receptor antagonist AP5 and nitric oxide synthase inhibitor 7-NI affect different phases of learning and memory in goldfish. *Brain Res* **889**, 274-277 (2001).
- 401 Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S. & Baudry, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**, 774-776, doi:10.1038/319774a0 (1986).
- 402 Shimizu, E., Tang, Y. P., Rampon, C. & Tsien, J. Z. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* **290**, 1170-1174 (2000).
- 403 Swain, H. A., Sigstad, C. & Scalzo, F. M. Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol* **26**, 725-729, doi:10.1016/j.ntt.2004.06.009 (2004).
- 404 Si, A., Helliwell, P. & Maleszka, R. Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memory in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol Biochem Behav* **77**, 191-197 (2004).
- 405 Maleszka, R., Helliwell, P. & Kucharski, R. Pharmacological interference with glutamate re-uptake impairs long-term memory in the honeybee, *apis mellifera*. *Behav Brain Res* **115**, 49-53 (2000).
- 406 Harder, J. A., Aboobaker, A. A., Hodgetts, T. C. & Ridley, R. M. Learning impairments induced by glutamate blockade using dizocilpine (MK-801) in monkeys. *Br J Pharmacol* **125**, 1013-1018, doi:10.1038/sj.bjp.0702178 (1998).
- 407 Morris, R. G. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* **9**, 3040-3057 (1989).
- 408 Morris, R. G. NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology* **74**, 32-40, doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.014 (2013).
- 409 Kentros, C. *et al.* Abolition of long-term stability of new hippocampal place cell maps by NMDA receptor blockade. *Science* **280**, 2121-2126 (1998).
- 410 Cho, K. *et al.* A new form of long-term depression in the perirhinal cortex. *Nat Neurosci* **3**, 150-156, doi:10.1038/72093 (2000).
- 411 Ziakopoulos, Z., Tillett, C. W., Brown, M. W. & Bashir, Z. I. Input-and layer-dependent synaptic plasticity in the rat perirhinal cortex in vitro. *Neuroscience* **92**, 459-472 (1999).

- 412 Saucier, D. & Cain, D. P. Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term
potentiation. *Nature* **378**, 186-189, doi:10.1038/378186a0 (1995).
- 413 Bannerman, D. M., Good, M. A., Butcher, S. P., Ramsay, M. & Morris, R. G. Distinct
components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade.
Nature **378**, 182-186, doi:10.1038/378182a0 (1995).
- 414 Bannerman, D. M. *et al.* Dissecting spatial knowledge from spatial choice by hippocampal
NMDA receptor deletion. *Nat Neurosci* **15**, 1153-1159, doi:10.1038/nn.3166 (2012).
- 415 Taylor, A. M. *et al.* Hippocampal NMDA receptors are important for behavioural inhibition
but not for encoding associative spatial memories. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**,
20130149, doi:10.1098/rstb.2013.0149 (2014).
- 416 Huang, E. J. & Reichardt, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function.
Annu Rev Neurosci **24**, 677-736, doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.677 (2001).
- 417 McAllister, A. K., Katz, L. C. & Lo, D. C. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev
Neurosci* **22**, 295-318, doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.295 (1999).
- 418 Cohen-Cory, S., Kidane, A. H., Shirkey, N. J. & Marshak, S. Brain-derived neurotrophic
factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev Neurobiol* **70**, 271-
288, doi:10.1002/dneu.20774 (2010).
- 419 Bramham, C. R. & Messaoudi, E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic
consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* **76**, 99-125,
doi:10.1016/j.pneurobio.2005.06.003 (2005).
- 420 Poo, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* **2**, 24-32,
doi:10.1038/35049004 (2001).
- 421 Tyler, W. J., Perrett, S. P. & Pozzo-Miller, L. D. The role of neurotrophins in
neurotransmitter release. *Neuroscientist* **8**, 524-531, doi:10.1177/1073858402238511
(2002).
- 422 Lewin, G. R. & Barde, Y. A. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* **19**, 289-
317, doi:10.1146/annurev.ne.19.030196.001445 (1996).
- 423 Tanaka, T., Saito, H. & Matsuki, N. Inhibition of GABA_A synaptic responses by brain-
derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *J Neurosci* **17**, 2959-2966 (1997).
- 424 Frerking, M., Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)
modulates inhibitory, but not excitatory, transmission in the CA1 region of the
hippocampus. *J Neurophysiol* **80**, 3383-3386, doi:10.1152/jn.1998.80.6.3383 (1998).
- 425 Wardle, R. A. & Poo, M. M. Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic
synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. *J Neurosci* **23**, 8722-8732
(2003).
- 426 Lessmann, V., Gottmann, K. & Malcangio, M. Neurotrophin secretion: current facts and
future prospects. *Prog Neurobiol* **69**, 341-374 (2003).
- 427 Schinder, A. F. & Poo, M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends
Neurosci* **23**, 639-645 (2000).
- 428 Drake, C. T., Milner, T. A. & Patterson, S. L. Ultrastructural localization of full-length trkB
immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-
dependent synaptic plasticity. *J Neurosci* **19**, 8009-8026 (1999).
- 429 Pang, P. T. *et al.* Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term
hippocampal plasticity. *Science* **306**, 487-491, doi:10.1126/science.1100135 (2004).
- 430 Saarelainen, T., Vaittinen, S. & Castren, E. trkB-receptor activation contributes to the
kainate-induced increase in BDNF mRNA synthesis. *Cell Mol Neurobiol* **21**, 429-435 (2001).

- 431 Canossa, M., Gartner, A., Campana, G., Inagaki, N. & Thoenen, H. Regulated secretion of neurotrophins by metabotropic glutamate group I (mGluRI) and Trk receptor activation is mediated via phospholipase C signalling pathways. *EMBO J* **20**, 1640-1650, doi:10.1093/emboj/20.7.1640 (2001).
- 432 Canossa, M. *et al.* Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13279-13286 (1997).
- 433 Kafitz, K. W., Rose, C. R., Thoenen, H. & Konnerth, A. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature* **401**, 918-921, doi:10.1038/44847 (1999).
- 434 Hartmann, M., Heumann, R. & Lessmann, V. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J* **20**, 5887-5897, doi:10.1093/emboj/20.21.5887 (2001).
- 435 Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M. & Tsumoto, T. Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* **291**, 2419-2423, doi:10.1126/science.1057415 (2001).
- 436 Balkowiec, A. & Katz, D. M. Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J Neurosci* **22**, 10399-10407 (2002).
- 437 Huang, E. J. & Reichardt, L. F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* **72**, 609-642, doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629 (2003).
- 438 Kaplan, D. R. & Miller, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 381-391 (2000).
- 439 Levine, E. S. & Kolb, J. E. Brain-derived neurotrophic factor increases activity of NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in excised patches from hippocampal neurons. *J Neurosci Res* **62**, 357-362, doi:10.1002/1097-4547(20001101)62:3<357::AID-JNR5>3.0.CO;2-6 (2000).
- 440 Levine, E. S., Dreyfus, C. F., Black, I. B. & Plummer, M. R. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8074-8077 (1995).
- 441 Matsumoto, T. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor enhances depolarization-evoked glutamate release in cultured cortical neurons. *J Neurochem* **79**, 522-530 (2001).
- 442 Jovanovic, J. N., Czernik, A. J., Fienberg, A. A., Greengard, P. & Sihra, T. S. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci* **3**, 323-329, doi:10.1038/73888 (2000).
- 443 Korte, M. *et al.* Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12547-12552 (1996).
- 444 Figurov, A., Pozzo-Miller, L. D., Olafsson, P., Wang, T. & Lu, B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* **381**, 706-709, doi:10.1038/381706a0 (1996).
- 445 Kang, H., Welcher, A. A., Shelton, D. & Schuman, E. M. Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* **19**, 653-664 (1997).
- 446 Chen, G., Kolbeck, R., Barde, Y. A., Bonhoeffer, T. & Kossel, A. Relative contribution of endogenous neurotrophins in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* **19**, 7983-7990 (1999).

- 447 Kovalchuk, Y., Hanse, E., Kafitz, K. W. & Konnerth, A. Postsynaptic Induction of BDNF-Mediated Long-Term Potentiation. *Science* **295**, 1729-1734, doi:10.1126/science.1067766 (2002).
- 448 Kang, H. & Schuman, E. M. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* **267**, 1658-1662 (1995).
- 449 Messaoudi, E. *et al.* Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* **27**, 10445-10455, doi:10.1523/JNEUROSCI.2883-07.2007 (2007).
- 450 Barco, A. *et al.* Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. *Neuron* **48**, 123-137, doi:10.1016/j.neuron.2005.09.005 (2005).
- 451 Patterson, S. L. *et al.* Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron* **32**, 123-140 (2001).
- 452 Soule, J., Messaoudi, E. & Bramham, C. R. Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. *Biochem Soc Trans* **34**, 600-604, doi:10.1042/BST0340600 (2006).
- 453 Ying, S. W. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci* **22**, 1532-1540 (2002).
- 454 Boulanger, L. M. & Poo, M. M. Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nat Neurosci* **2**, 346-351, doi:10.1038/7258 (1999).
- 455 Du, J., Feng, L., Yang, F. & Lu, B. Activity- and Ca(2+)-dependent modulation of surface expression of brain-derived neurotrophic factor receptors in hippocampal neurons. *J Cell Biol* **150**, 1423-1434 (2000).
- 456 Messaoudi, E., Ying, S. W., Kanhema, T., Croll, S. D. & Bramham, C. R. Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo. *J Neurosci* **22**, 7453-7461 (2002).
- 457 Aicardi, G. *et al.* Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15788-15792, doi:10.1073/pnas.0406960101 (2004).
- 458 Yin, Y., Edelman, G. M. & Vanderklish, P. W. The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneurosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2368-2373, doi:10.1073/pnas.042693699 (2002).
- 459 Schrott, G. M., Nigh, E. A., Chen, W. G., Hu, L. & Greenberg, M. E. BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J Neurosci* **24**, 7366-7377, doi:10.1523/JNEUROSCI.1739-04.2004 (2004).
- 460 Kang, H., Jia, L. Z., Suh, K. Y., Tang, L. & Schuman, E. M. Determinants of BDNF-induced hippocampal synaptic plasticity: role of the Trk B receptor and the kinetics of neurotrophin delivery. *Learn Mem* **3**, 188-196 (1996).
- 461 Kelleher, R. J., 3rd, Govindarajan, A. & Tonegawa, S. Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* **44**, 59-73, doi:10.1016/j.neuron.2004.09.013 (2004).
- 462 Takei, N. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J Neurosci* **24**, 9760-9769, doi:10.1523/JNEUROSCI.1427-04.2004 (2004).

- 463 Horch, H. W. & Katz, L. C. BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci* **5**, 1177-1184, doi:10.1038/nn927 (2002).
- 464 Tyler, W. J. & Pozzo-Miller, L. D. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* **21**, 4249-4258 (2001).
- 465 Alonso, M., Medina, J. H. & Pozzo-Miller, L. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem* **11**, 172-178, doi:10.1101/lm.67804 (2004).
- 466 Rex, C. S. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J Neurosci* **27**, 3017-3029, doi:10.1523/JNEUROSCI.4037-06.2007 (2007).
- 467 Kennedy, M. B., Beale, H. C., Carlisle, H. J. & Washburn, L. R. Integration of biochemical signalling in spines. *Nat Rev Neurosci* **6**, 423-434, doi:10.1038/nrn1685 (2005).
- 468 Zagrebelsky, M. *et al.* The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *J Neurosci* **25**, 9989-9999, doi:10.1523/JNEUROSCI.2492-05.2005 (2005).
- 469 Itami, C. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of "silent" synapses in the developing mouse barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13069-13074, doi:10.1073/pnas.2131948100 (2003).
- 470 Jourdi, H. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor signal enhances and maintains the expression of AMPA receptor-associated PDZ proteins in developing cortical neurons. *Dev Biol* **263**, 216-230 (2003).
- 471 Caldeira, M. V. *et al.* BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* **35**, 208-219, doi:10.1016/j.mcn.2007.02.019 (2007).
- 472 Levine, E. S., Crozier, R. A., Black, I. B. & Plummer, M. R. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10235-10239 (1998).
- 473 Lin, S. Y. *et al.* BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. *Brain Res Mol Brain Res* **55**, 20-27 (1998).
- 474 Suen, P. C. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8191-8195 (1997).
- 475 Rostas, J. A. *et al.* Enhanced tyrosine phosphorylation of the 2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor in long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10452-10456 (1996).
- 476 Crozier, R. A., Black, I. B. & Plummer, M. R. Blockade of NR2B-containing NMDA receptors prevents BDNF enhancement of glutamatergic transmission in hippocampal neurons. *Learn Mem* **6**, 257-266 (1999).
- 477 Katoh-Semba, R. *et al.* Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *FASEB J* **16**, 1328-1330, doi:10.1096/fj.02-0143fje (2002).
- 478 Lee, S. H., Kim, Y. J., Lee, K. M., Ryu, S. & Yoon, B. W. Ischemic preconditioning enhances neurogenesis in the subventricular zone. *Neuroscience* **146**, 1020-1031, doi:10.1016/j.neuroscience.2007.02.058 (2007).

- 479 Qiao, X. *et al.* Cerebellar brain-derived neurotrophic factor-TrkB defect associated with impairment of eyeblink conditioning in Stargazer mutant mice. *J Neurosci* **18**, 6990-6999 (1998).
- 480 Bekinschtein, P. *et al.* Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* **53**, 261-277, doi:10.1016/j.neuron.2006.11.025 (2007).
- 481 Johnston, A. N. & Rose, S. P. Memory consolidation in day-old chicks requires BDNF but not NGF or NT-3; an antisense study. *Brain Res Mol Brain Res* **88**, 26-36 (2001).
- 482 Alonso, M. *et al.* BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus* **12**, 551-560, doi:10.1002/hipo.10035 (2002).
- 483 Liu, I. Y., Lyons, W. E., Mamounas, L. A. & Thompson, R. F. Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. *J Neurosci* **24**, 7958-7963, doi:10.1523/JNEUROSCI.1948-04.2004 (2004).
- 484 Yamada, K. & Nabeshima, T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* **91**, 267-270 (2003).
- 485 Linnarsson, S., Bjorklund, A. & Ernfors, P. Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci* **9**, 2581-2587 (1997).
- 486 Minichiello, L. *et al.* Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* **24**, 401-414 (1999).
- 487 Saarelainen, T. *et al.* Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons show increased susceptibility to cortical injury after focal cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci* **16**, 87-96, doi:10.1006/mcne.2000.0863 (2000).
- 488 Heldt, S. A., Stanek, L., Chhatwal, J. P. & Ressler, K. J. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry* **12**, 656-670, doi:10.1038/sj.mp.4001957 (2007).
- 489 Murer, M. G., Yan, Q. & Raisman-Vozari, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* **63**, 71-124 (2001).
- 490 Morgan, J. I. & Curran, T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci* **12**, 459-462 (1989).
- 491 Bahrami, S. & Drablos, F. Gene regulation in the immediate-early response process. *Adv Biol Regul* **62**, 37-49, doi:10.1016/j.jbior.2016.05.001 (2016).
- 492 Frey, U. & Morris, R. G. Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci* **21**, 181-188 (1998).
- 493 Nguyen, P. V., Abel, T. & Kandel, E. R. Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* **265**, 1104-1107 (1994).
- 494 Otani, S. & Abraham, W. C. Inhibition of protein synthesis in the dentate gyrus, but not the entorhinal cortex, blocks maintenance of long-term potentiation in rats. *Neurosci Lett* **106**, 175-180 (1989).
- 495 Link, W. *et al.* Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5734-5738 (1995).
- 496 Steward, O. & Worley, P. Localization of mRNAs at synaptic sites on dendrites. *Results Probl Cell Differ* **34**, 1-26 (2001).
- 497 Lyford, G. L. *et al.* Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**, 433-445 (1995).

- 498 Steward, O. & Worley, P. F. Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active
synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* **30**, 227-240 (2001).
- 499 Wallace, C. S., Lyford, G. L., Worley, P. F. & Steward, O. Differential intracellular sorting of
immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. *J Neurosci* **18**,
26-35 (1998).
- 500 Steward, O., Wallace, C. S., Lyford, G. L. & Worley, P. F. Synaptic activation causes the
mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites.
Neuron **21**, 741-751 (1998).
- 501 Bramham, C. R. *et al.* The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* **200**, 125-140,
doi:10.1007/s00221-009-1959-2 (2010).
- 502 Plath, N. *et al.* Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and
memories. *Neuron* **52**, 437-444, doi:10.1016/j.neuron.2006.08.024 (2006).
- 503 Rial Verde, E. M., Lee-Osbourne, J., Worley, P. F., Malinow, R. & Cline, H. T. Increased
expression of the immediate-early gene arc/arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated
synaptic transmission. *Neuron* **52**, 461-474, doi:10.1016/j.neuron.2006.09.031 (2006).
- 504 Waung, M. W., Pfeiffer, B. E., Nosyreva, E. D., Ronesi, J. A. & Huber, K. M. Rapid translation
of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in
AMPA receptor endocytosis rate. *Neuron* **59**, 84-97, doi:10.1016/j.neuron.2008.05.014 (2008).
- 505 Wang, H. *et al.* Metabotropic Glutamate Receptors Induce a Form of LTP Controlled by
Translation and Arc Signaling in the Hippocampus. *J Neurosci* **36**, 1723-1729,
doi:10.1523/JNEUROSCI.0878-15.2016 (2016).
- 506 Yilmaz-Rastoder, E., Miyamae, T., Braun, A. E. & Thiels, E. LTP- and LTD-inducing
stimulations cause opposite changes in arc/arg3.1 mRNA level in hippocampal area CA1 in
vivo. *Hippocampus* **21**, 1290-1301, doi:10.1002/hipo.20838 (2011).
- 507 Tanaka, J. *et al.* Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of
single dendritic spines. *Science* **319**, 1683-1687, doi:10.1126/science.1152864 (2008).
- 508 Bramham, C. R. Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr Opin
Neurobiol* **18**, 524-531, doi:10.1016/j.conb.2008.09.013 (2008).
- 509 Bourne, J. N. & Harris, K. M. Balancing structure and function at hippocampal dendritic
spines. *Annu Rev Neurosci* **31**, 47-67, doi:10.1146/annurev.neuro.31.060407.125646
(2008).
- 510 Fujimoto, T., Tanaka, H., Kumamaru, E., Okamura, K. & Miki, N. Arc interacts with
microtubules/microtubule-associated protein 2 and attenuates microtubule-associated
protein 2 immunoreactivity in the dendrites. *J Neurosci Res* **76**, 51-63,
doi:10.1002/jnr.20056 (2004).
- 511 Peebles, C. L. *et al.* Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A **107**, 18173-18178, doi:10.1073/pnas.1006546107 (2010).
- 512 Chowdhury, S. *et al.* Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA
receptor trafficking. *Neuron* **52**, 445-459, doi:10.1016/j.neuron.2006.08.033 (2006).
- 513 Shepherd, J. D. & Bear, M. F. New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity.
Nat Neurosci **14**, 279-284, doi:10.1038/nn.2708 (2011).
- 514 Park, M., Penick, E. C., Edwards, J. G., Kauer, J. A. & Ehlers, M. D. Recycling endosomes
supply AMPA receptors for LTP. *Science* **305**, 1972-1975, doi:10.1126/science.1102026
(2004).
- 515 Martin, K. C., Barad, M. & Kandel, E. R. Local protein synthesis and its role in synapse-
specific plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 587-592 (2000).

- 516 Okuno, H. *et al.* Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of
Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell* **149**, 886-898, doi:10.1016/j.cell.2012.02.062 (2012).
- 517 Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes, C. A. & Worley, P. F. Environment-specific
expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat*
Neurosci **2**, 1120-1124, doi:10.1038/16046 (1999).
- 518 Kubik, S., Miyashita, T. & Guzowski, J. F. Using immediate-early genes to map hippocampal
subregional functions. *Learn Mem* **14**, 758-770, doi:10.1101/lm.698107 (2007).
- 519 Ramirez-Amaya, V. *et al.* Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression:
evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci* **25**, 1761-1768,
doi:10.1523/JNEUROSCI.4342-04.2005 (2005).
- 520 Saha, R. N. *et al.* Rapid activity-induced transcription of Arc and other IEGs relies on poised
RNA polymerase II. *Nat Neurosci* **14**, 848-856, doi:10.1038/nn.2839 (2011).
- 521 Kelly, M. P. & Deadwyler, S. A. Experience-dependent regulation of the immediate-early
gene arc differs across brain regions. *J Neurosci* **23**, 6443-6451 (2003).
- 522 Miyashita, T., Kubik, S., Haghghi, N., Steward, O. & Guzowski, J. F. Rapid activation of
plasticity-associated gene transcription in hippocampal neurons provides a mechanism for
encoding of one-trial experience. *J Neurosci* **29**, 898-906, doi:10.1523/JNEUROSCI.4588-
08.2009 (2009).
- 523 Montag-Sallaz, M. & Montag, D. Learning-induced arg 3.1/arc mRNA expression in the
mouse brain. *Learn Mem* **10**, 99-107, doi:10.1101/lm.53403 (2003).
- 524 Rao, V. R. *et al.* AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-
early gene Arc. *Nat Neurosci* **9**, 887-895, doi:10.1038/nn1708 (2006).
- 525 Adams, J. P., Robinson, R. A., Hudgins, E. D., Wissink, E. M. & Dudek, S. M. NMDA receptor-
independent control of transcription factors and gene expression. *Neuroreport* **20**, 1429-
1433, doi:10.1097/WNR.0b013e3283311db6 (2009).
- 526 Park, S. *et al.* Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the
dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. *Neuron* **59**, 70-83,
doi:10.1016/j.neuron.2008.05.023 (2008).
- 527 Bloomer, W. A., VanDongen, H. M. & VanDongen, A. M. Arc/Arg3.1 translation is
controlled by convergent N-methyl-D-aspartate and Gs-coupled receptor signaling
pathways. *J Biol Chem* **283**, 582-592, doi:10.1074/jbc.M702451200 (2008).
- 528 Waltereit, R. *et al.* Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase
A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *J*
Neurosci **21**, 5484-5493 (2001).
- 529 Ploski, J. E. *et al.* The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is
required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala.
J Neurosci **28**, 12383-12395, doi:10.1523/JNEUROSCI.1662-08.2008 (2008).
- 530 Martinez, M. C., Alen, N., Ballarini, F., Moncada, D. & Viola, H. Memory traces compete
under regimes of limited Arc protein synthesis: implications for memory interference.
Neurobiol Learn Mem **98**, 165-173, doi:10.1016/j.nlm.2012.05.007 (2012).
- 531 Wibrand, K. *et al.* Identification of genes co-upregulated with Arc during BDNF-induced
long-term potentiation in adult rat dentate gyrus in vivo. *Eur J Neurosci* **23**, 1501-1511,
doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04687.x (2006).
- 532 Nakayama, D. *et al.* Long-delayed expression of the immediate early gene Arc/Arg3.1
refines neuronal circuits to perpetuate fear memory. *J Neurosci* **35**, 819-830,
doi:10.1523/JNEUROSCI.2525-14.2015 (2015).

- 533 Kheirbek, M. A., Tannenholz, L. & Hen, R. NR2B-dependent plasticity of adult-born granule cells is necessary for context discrimination. *J Neurosci* **32**, 8696-8702, doi:10.1523/JNEUROSCI.1692-12.2012 (2012).
- 534 Kent, B. A., Hvoslef-Eide, M., Saksida, L. M. & Bussey, T. J. The representational-hierarchical view of pattern separation: Not just hippocampus, not just space, not just memory? *Neurobiol Learn Mem* **129**, 99-106, doi:10.1016/j.nlm.2016.01.006 (2016).
- 535 Ennaceur, A. & Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* **31**, 47-59 (1988).
- 536 Ennaceur, A. & Aggleton, J. P. The effects of neurotoxic lesions of the perirhinal cortex combined to fornix transection on object recognition memory in the rat. *Behav Brain Res* **88**, 181-193 (1997).
- 537 Bevins, R. A. & Besheer, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* **1**, 1306-1311, doi:10.1038/nprot.2006.205 (2006).
- 538 Forwood, S. E., Winters, B. D. & Bussey, T. J. Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus* **15**, 347-355, doi:10.1002/hipo.20059 (2005).
- 539 Zhao, W., Fanning, M. L. & Lane, T. Efficient RNAi-based gene family knockdown via set cover optimization. *Artif Intell Med* **35**, 61-73, doi:10.1016/j.artmed.2005.01.009 (2005).
- 540 Bekinschtein, P. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor interacts with adult-born immature cells in the dentate gyrus during consolidation of overlapping memories. *Hippocampus* **24**, 905-911, doi:10.1002/hipo.22304 (2014).
- 541 Reichelt, A. C., Morris, M. J. & Westbrook, R. F. Daily access to sucrose impairs aspects of spatial memory tasks reliant on pattern separation and neural proliferation in rats. *Learn Mem* **23**, 386-390, doi:10.1101/lm.042416.116 (2016).
- 542 Peters, J., Dieppa-Perea, L. M., Melendez, L. M. & Quirk, G. J. Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science* **328**, 1288-1290, doi:10.1126/science.1186909 (2010).
- 543 Gaffan, D. & Harrison, S. Amygdalectomy and disconnection in visual learning for auditory secondary reinforcement by monkeys. *J Neurosci* **7**, 2285-2292 (1987).
- 544 Ito, R., Robbins, T. W., Pennartz, C. M. & Everitt, B. J. Functional interaction between the hippocampus and nucleus accumbens shell is necessary for the acquisition of appetitive spatial context conditioning. *J Neurosci* **28**, 6950-6959, doi:10.1523/JNEUROSCI.1615-08.2008 (2008).
- 545 Malenka, R. C., Lancaster, B. & Zucker, R. S. Temporal limits on the rise in postsynaptic calcium required for the induction of long-term potentiation. *Neuron* **9**, 121-128 (1992).
- 546 Miranda, M. *et al.* Molecular Mechanisms in Perirhinal Cortex Selectively Necessary for Discrimination of Overlapping Memories, but Independent of Memory Persistence. *eNeuro* **4**, doi:10.1523/ENEURO.0293-17.2017 (2017).
- 547 Mizuno, M., Yamada, K., He, J., Nakajima, A. & Nabeshima, T. Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn Mem* **10**, 108-115, doi:10.1101/lm.56003 (2003).
- 548 Johnson, S. A. *et al.* Rodent age-related impairments in discriminating perceptually similar objects parallel those observed in humans. *Hippocampus* **27**, 759-776, doi:10.1002/hipo.22729 (2017).

- 549 Reagh, Z. M. & Yassa, M. A. Object and spatial mnemonic interference differentially engage lateral and medial entorhinal cortex in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E4264-4273, doi:10.1073/pnas.1411250111 (2014).
- 550 Reagh, Z. M. *et al.* Greater loss of object than spatial mnemonic discrimination in aged adults. *Hippocampus* **26**, 417-422, doi:10.1002/hipo.22562 (2016).
- 551 Stark, S. M. & Stark, C. E. L. Age-related deficits in the mnemonic similarity task for objects and scenes. *Behav Brain Res* **333**, 109-117, doi:10.1016/j.bbr.2017.06.049 (2017).
- 552 Gaffan, D. Scene-specific memory for objects: a model of episodic memory impairment in monkeys with fornix transection. *J Cogn Neurosci* **6**, 305-320, doi:10.1162/jocn.1994.6.4.305 (1994).
- 553 Nadel, L. The role of the hippocampus in declarative memory: a comment on Zola-Morgan, Squire, and Ramus (1994). *Hippocampus* **5**, 232-239, doi:10.1002/hipo.450050309 (1995).
- 554 Cassaday, H. J. & Rawlins, J. N. The hippocampus, objects, and their contexts. *Behav Neurosci* **111**, 1228-1244 (1997).
- 555 Aggleton, J. P. & Brown, M. W. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* **22**, 425-444; discussion 444-489 (1999).
- 556 Warburton, E. C., Baird, A. L., Morgan, A., Muir, J. L. & Aggleton, J. P. Disconnecting hippocampal projections to the anterior thalamus produces deficits on tests of spatial memory in rats. *Eur J Neurosci* **12**, 1714-1726 (2000).
- 557 Sutherland, R. J., Dringenberg, H. C. & Hoising, J. M. Induction of long-term potentiation at perforant path dentate synapses does not affect place learning or memory. *Hippocampus* **3**, 141-147, doi:10.1002/hipo.450030206 (1993).
- 558 Nikolaienko, O., Patil, S., Eriksen, M. S. & Bramham, C. R. Arc protein: a flexible hub for synaptic plasticity and cognition. *Semin Cell Dev Biol* **77**, 33-42, doi:10.1016/j.semcdb.2017.09.006 (2018).
- 559 Kinnavane, L., Amin, E., Olarte-Sanchez, C. M. & Aggleton, J. P. Detecting and discriminating novel objects: The impact of perirhinal cortex disconnection on hippocampal activity patterns. *Hippocampus* **26**, 1393-1413, doi:10.1002/hipo.22615 (2016).
- 560 Chen, J., Olsen, R. K., Preston, A. R., Glover, G. H. & Wagner, A. D. Associative retrieval processes in the human medial temporal lobe: hippocampal retrieval success and CA1 mismatch detection. *Learn Mem* **18**, 523-528, doi:10.1101/lm.2135211 (2011).
- 561 Duncan, K., Ketz, N., Inati, S. J. & Davachi, L. Evidence for area CA1 as a match/mismatch detector: a high-resolution fMRI study of the human hippocampus. *Hippocampus* **22**, 389-398, doi:10.1002/hipo.20933 (2012).
- 562 Swanson, L. W. & Cowan, W. M. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* **172**, 49-84, doi:10.1002/cne.901720104 (1977).
- 563 Liu, P. & Bilkey, D. K. Is there a direct projection from perirhinal cortex to the hippocampus? *Hippocampus* **8**, 424-425, doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:4<424::AID-HIPO10>3.0.CO;2-2 (1998).
- 564 Naber, P. A., Witter, M. P. & Lopez da Silva, F. H. Perirhinal cortex input to the hippocampus in the rat: evidence for parallel pathways, both direct and indirect. A combined physiological and anatomical study. *Eur J Neurosci* **11**, 4119-4133 (1999).
- 565 Sturman, O., Germain, P. L. & Bohacek, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress* **21**, 443-452, doi:10.1080/10253890.2018.1438405 (2018).

- 566 Sarafino, E. Experiential aspects of exploratory behavior in rats. 235-243 (1978).
- 567 Kesner, R. P., Hunsaker, M. R. & Warthen, M. W. The CA3 subregion of the hippocampus is critical for episodic memory processing by means of relational encoding in rats. *Behav Neurosci* **122**, 1217-1225, doi:10.1037/a0013592 (2008).
- 568 Rolls, E. T. A quantitative theory of the functions of the hippocampal CA3 network in memory. *Front Cell Neurosci* **7**, 98, doi:10.3389/fncel.2013.00098 (2013).
- 569 Bakker, A., Kirwan, C. B., Miller, M. & Stark, C. E. Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science* **319**, 1640-1642, doi:10.1126/science.1152882 (2008).
- 570 Yassa, M. A. *et al.* Pattern separation deficits associated with increased hippocampal CA3 and dentate gyrus activity in nondemented older adults. *Hippocampus* **21**, 968-979, doi:10.1002/hipo.20808 (2011).
- 571 Wills, T. J., Lever, C., Cacucci, F., Burgess, N. & O'Keefe, J. Attractor dynamics in the hippocampal representation of the local environment. *Science* **308**, 873-876, doi:10.1126/science.1108905 (2005).
- 572 Jezek, K., Henriksen, E. J., Treves, A., Moser, E. I. & Moser, M. B. Theta-paced flickering between place-cell maps in the hippocampus. *Nature* **478**, 246-249, doi:10.1038/nature10439 (2011).
- 573 Dudai, Y. & Eisenberg, M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* **44**, 93-100, doi:10.1016/j.neuron.2004.09.003 (2004).
- 574 Morici, J. F. *et al.* 5-HT_{2a} receptor in mPFC influences context-guided reconsolidation of object memory in perirhinal cortex. *Elife* **7**, doi:10.7554/eLife.33746 (2018).
- 575 Miranda, M. *et al.* NMDA receptors and BDNF are necessary for discrimination of overlapping spatial and non-spatial memories in perirhinal cortex and hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* **155**, 337-343, doi:10.1016/j.nlm.2018.08.019 (2018).
- 576 Reichardt, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1545-1564, doi:10.1098/rstb.2006.1894 (2006).
- 577 Dechant, G. *et al.* Expression and binding characteristics of the BDNF receptor chick trkB. *Development* **119**, 545-558 (1993).
- 578 Weeden, C. S., Hu, N. J., Ho, L. U. & Kesner, R. P. The role of the ventral dentate gyrus in olfactory pattern separation. *Hippocampus* **24**, 553-559, doi:10.1002/hipo.22248 (2014).
- 579 Gilbert, P. E. & Kesner, R. P. The amygdala but not the hippocampus is involved in pattern separation based on reward value. *Neurobiol Learn Mem* **77**, 338-353, doi:10.1006/nlme.2001.4033 (2002).
- 580 Graham, K. S., Barense, M. D. & Lee, A. C. Going beyond LTM in the MTL: a synthesis of neuropsychological and neuroimaging findings on the role of the medial temporal lobe in memory and perception. *Neuropsychologia* **48**, 831-853, doi:10.1016/j.neuropsychologia.2010.01.001 (2010).
- 581 Seoane, A., Tinsley, C. J. & Brown, M. W. Interfering with Fos expression in rat perirhinal cortex impairs recognition memory. *Hippocampus* **22**, 2101-2113, doi:10.1002/hipo.22028 (2012).
- 582 Rudy, J. W., Biedenkapp, J. C., Moineau, J. & Bolding, K. Anisomycin and the reconsolidation hypothesis. *Learn Mem* **13**, 1-3, doi:10.1101/lm.157806 (2006).
- 583 Winters, B. D. & Bussey, T. J. Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. *Eur J Neurosci* **21**, 2263-2270, doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04055.x (2005).

- 584 Bilkey, D. K. Space and context in the temporal cortex. *Hippocampus* **17**, 813-825, doi:10.1002/hipo.20318 (2007).
- 585 Massey, P. V., Bhabra, G., Cho, K., Brown, M. W. & Bashir, Z. I. Activation of muscarinic receptors induces protein synthesis-dependent long-lasting depression in the perirhinal cortex. *Eur J Neurosci* **14**, 145-152 (2001).
- 586 Shepherd, J. D. *et al.* Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* **52**, 475-484, doi:10.1016/j.neuron.2006.08.034 (2006).
- 587 Jakkamsetti, V. *et al.* Experience-induced Arc/Arg3.1 primes CA1 pyramidal neurons for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term synaptic depression. *Neuron* **80**, 72-79, doi:10.1016/j.neuron.2013.07.020 (2013).
- 588 Karlsson, M. P. & Frank, L. M. Awake replay of remote experiences in the hippocampus. *Nat Neurosci* **12**, 913-918, doi:10.1038/nn.2344 (2009).
- 589 Pascual, M., Climent, E. & Guerri, C. BDNF induces glutamate release in cerebrocortical nerve terminals and in cortical astrocytes. *Neuroreport* **12**, 2673-2677 (2001).
- 590 Sala, R. *et al.* Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor increase neurotransmitter release in the rat visual cortex. *Eur J Neurosci* **10**, 2185-2191 (1998).
- 591 Nakai, T. *et al.* Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. *J Neurosci* **34**, 14995-15008, doi:10.1523/JNEUROSCI.2228-14.2014 (2014).
- 592 Nakazawa, T. *et al.* Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR epsilon 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* **276**, 693-699, doi:10.1074/jbc.M008085200 (2001).
- 593 Iwasaki, Y., Gay, B., Wada, K. & Koizumi, S. Association of the Src family tyrosine kinase Fyn with TrkB. *J Neurochem* **71**, 106-111 (1998).
- 594 Itoh, N., Enomoto, A., Nagai, T., Takahashi, M. & Yamada, K. Molecular mechanism linking BDNF/TrkB signaling with the NMDA receptor in memory: the role of Girdin in the CNS. *Rev Neurosci* **27**, 481-490, doi:10.1515/revneuro-2015-0072 (2016).
- 595 Carew, T. J. & Sahley, C. L. Invertebrate learning and memory: from behavior to molecules. *Annu Rev Neurosci* **9**, 435-487, doi:10.1146/annurev.ne.09.030186.002251 (1986).
- 596 Abel, T. & Lattal, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 180-187 (2001).
- 597 Schafe, G. E., Nader, K., Blair, H. T. & LeDoux, J. E. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci* **24**, 540-546 (2001).
- 598 Lu, B. & Chow, A. Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci Res* **58**, 76-87 (1999).
- 599 Pezet, S. & McMahon, S. B. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci* **29**, 507-538, doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112929 (2006).
- 600 Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I. & Medina, J. H. BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist* **14**, 147-156, doi:10.1177/1073858407305850 (2008).
- 601 Cho, K., Brown, M. W. & Bashir, Z. I. Mechanisms and physiological role of enhancement of mGlu5 receptor function by group II mGlu receptor activation in rat perirhinal cortex. *J Physiol* **540**, 895-906 (2002).
- 602 Malkani, S., Wallace, K. J., Donley, M. P. & Rosen, J. B. An egr-1 (zif268) antisense oligodeoxynucleotide infused into the amygdala disrupts fear conditioning. *Learn Mem* **11**, 617-624, doi:10.1101/lm.73104 (2004).

- 603 Bogacz, R. & Brown, M. W. The restricted influence of sparseness of coding on the capacity
of familiarity discrimination networks. *Network* **13**, 457-485 (2002).
- 604 Santi, S. *et al.* Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and
LTP maintenance. *EMBO J* **25**, 4372-4380, doi:10.1038/sj.emboj.7601303 (2006).
- 605 Lima, R. H. *et al.* Infusion of protein synthesis inhibitors in the entorhinal cortex blocks
consolidation but not reconsolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*
91, 466-472, doi:10.1016/j.nlm.2008.12.009 (2009).
- 606 Fortin, N. J., Wright, S. P. & Eichenbaum, H. Recollection-like memory retrieval in rats is
dependent on the hippocampus. *Nature* **431**, 188-191, doi:10.1038/nature02853 (2004).
- 607 Pascalis, O., Hunkin, N. M., Holdstock, J. S., Isaac, C. L. & Mayes, A. R. Visual paired
comparison performance is impaired in a patient with selective hippocampal lesions and
relatively intact item recognition. *Neuropsychologia* **42**, 1293-1300,
doi:10.1016/j.neuropsychologia.2004.03.005 (2004).
- 608 Aggleton, J. P. & Shaw, C. Amnesia and recognition memory: a re-analysis of psychometric
data. *Neuropsychologia* **34**, 51-62 (1996).
- 609 Murray, E. A. & Mishkin, M. Object recognition and location memory in monkeys with
excitotoxic lesions of the amygdala and hippocampus. *J Neurosci* **18**, 6568-6582 (1998).
- 610 Alvarez, P., Zola-Morgan, S. & Squire, L. R. Damage limited to the hippocampal region
produces long-lasting memory impairment in monkeys. *J Neurosci* **15**, 3796-3807 (1995).
- 611 Broadbent, N. J., Gaskin, S., Squire, L. R. & Clark, R. E. Object recognition memory and the
rodent hippocampus. *Learn Mem* **17**, 5-11, doi:10.1101/lm.1650110 (2010).
- 612 Broadbent, N. J., Squire, L. R. & Clark, R. E. Spatial memory, recognition memory, and the
hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14515-14520, doi:10.1073/pnas.0406344101
(2004).
- 613 Clark, R. E., West, A. N., Zola, S. M. & Squire, L. R. Rats with lesions of the hippocampus are
impaired on the delayed nonmatching-to-sample task. *Hippocampus* **11**, 176-186,
doi:10.1002/hipo.1035 (2001).
- 614 de Lima, M. N., Luft, T., Roesler, R. & Schroder, N. Temporary inactivation reveals an
essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory.
Neurosci Lett **405**, 142-146, doi:10.1016/j.neulet.2006.06.044 (2006).
- 615 Gaskin, S., Tremblay, A. & Mumby, D. G. Retrograde and anterograde object recognition in
rats with hippocampal lesions. *Hippocampus* **13**, 962-969, doi:10.1002/hipo.10154 (2003).
- 616 Sauvage, M. M., Fortin, N. J., Owens, C. B., Yonelinas, A. P. & Eichenbaum, H. Recognition
memory: opposite effects of hippocampal damage on recollection and familiarity. *Nat
Neurosci* **11**, 16-18, doi:10.1038/nn2016 (2008).
- 617 Sauvage, M. M. ROC in animals: uncovering the neural substrates of recollection and
familiarity in episodic recognition memory. *Conscious Cogn* **19**, 816-828,
doi:10.1016/j.concog.2010.06.023 (2010).
- 618 Winters, B. D., Saksida, L. M. & Bussey, T. J. Implications of animal object memory research
for human amnesia. *Neuropsychologia* **48**, 2251-2261,
doi:10.1016/j.neuropsychologia.2010.01.023 (2010).
- 619 Winters, B. D., Saksida, L. M. & Bussey, T. J. Object recognition memory: neurobiological
mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* **32**, 1055-
1070, doi:10.1016/j.neubiorev.2008.04.004 (2008).
- 620 Mumby, D. G., Gaskin, S., Glenn, M. J., Schramek, T. E. & Lehmann, H. Hippocampal
damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts.
Learn Mem **9**, 49-57, doi:10.1101/lm.41302 (2002).

- 621 O'Brien, N., Lehmann, H., Lecluse, V. & Mumby, D. G. Enhanced context-dependency of object recognition in rats with hippocampal lesions. *Behav Brain Res* **170**, 156-162, doi:10.1016/j.bbr.2006.02.008 (2006).
- 622 Piterkin, P., Cole, E., Cossette, M. P., Gaskin, S. & Mumby, D. G. A limited role for the hippocampus in the modulation of novel-object preference by contextual cues. *Learn Mem* **15**, 785-791, doi:10.1101/lm.1035508 (2008).
- 623 Dix, S. L. & Aggleton, J. P. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav Brain Res* **99**, 191-200 (1999).
- 624 Poucet, B. Object exploration, habituation, and response to a spatial change in rats following septal or medial frontal cortical damage. *Behav Neurosci* **103**, 1009-1016 (1989).
- 625 Albasser, M. M., Poirier, G. L. & Aggleton, J. P. Qualitatively different modes of perirhinal-hippocampal engagement when rats explore novel vs. familiar objects as revealed by c-Fos imaging. *Eur J Neurosci* **31**, 134-147, doi:10.1111/j.1460-9568.2009.07042.x (2010).
- 626 Hoge, J. & Kesner, R. P. Role of CA3 and CA1 subregions of the dorsal hippocampus on temporal processing of objects. *Neurobiol Learn Mem* **88**, 225-231, doi:10.1016/j.nlm.2007.04.013 (2007).
- 627 Aggleton, J. P., Hunt, P. R. & Rawlins, J. N. The effects of hippocampal lesions upon spatial and non-spatial tests of working memory. *Behav Brain Res* **19**, 133-146 (1986).
- 628 Rossato, J. I. *et al.* On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* **14**, 36-46, doi:10.1101/lm.422607 (2007).
- 629 Beason-Held, L. L., Rosene, D. L., Killiany, R. J. & Moss, M. B. Hippocampal formation lesions produce memory impairment in the rhesus monkey. *Hippocampus* **9**, 562-574, doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:5<562::AID-HIPO10>3.0.CO;2-X (1999).
- 630 Saksida, L. M., Bussey, T. J., Buckmaster, C. A. & Murray, E. A. No effect of hippocampal lesions on perirhinal cortex-dependent feature-ambiguous visual discriminations. *Hippocampus* **16**, 421-430, doi:10.1002/hipo.20170 (2006).
- 631 Barense, M. D. *et al.* Functional specialization in the human medial temporal lobe. *J Neurosci* **25**, 10239-10246, doi:10.1523/JNEUROSCI.2704-05.2005 (2005).
- 632 Lee, A. C. *et al.* Perceptual deficits in amnesia: challenging the medial temporal lobe 'mnemonic' view. *Neuropsychologia* **43**, 1-11, doi:10.1016/j.neuropsychologia.2004.07.017 (2005).
- 633 Sanderson, D. J., Pearce, J. M., Kyd, R. J. & Aggleton, J. P. The importance of the rat hippocampus for learning the structure of visual arrays. *Eur J Neurosci* **24**, 1781-1788, doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05035.x (2006).
- 634 Jenkins, T. A., Amin, E., Pearce, J. M., Brown, M. W. & Aggleton, J. P. Novel spatial arrangements of familiar visual stimuli promote activity in the rat hippocampal formation but not the parahippocampal cortices: a c-fos expression study. *Neuroscience* **124**, 43-52, doi:10.1016/j.neuroscience.2003.11.024 (2004).
- 635 Poirier, G. L., Amin, E. & Aggleton, J. P. Qualitatively different hippocampal subfield engagement emerges with mastery of a spatial memory task by rats. *J Neurosci* **28**, 1034-1045, doi:10.1523/JNEUROSCI.4607-07.2008 (2008).
- 636 Bunsey, M. & Eichenbaum, H. Selective damage to the hippocampal region blocks long-term retention of a natural and nonspatial stimulus-stimulus association. *Hippocampus* **5**, 546-556, doi:10.1002/hipo.450050606 (1995).

- 637 Honey, R. C., Watt, A. & Good, M. Hippocampal lesions disrupt an associative mismatch
process. *J Neurosci* **18**, 2226-2230 (1998).
- 638 Hess, U. S., Lynch, G. & Gall, C. M. Regional patterns of c-fos mRNA expression in rat
hippocampus following exploration of a novel environment versus performance of a well-
learned discrimination. *J Neurosci* **15**, 7796-7809 (1995).
- 639 Kelly, M. P. & Deadwyler, S. A. Acquisition of a novel behavior induces higher levels of Arc
mRNA than does overtrained performance. *Neuroscience* **110**, 617-626 (2002).
- 640 Weitemier, A. Z. & Ryabinin, A. E. Subregion-specific differences in hippocampal activity
between Delay and Trace fear conditioning: an immunohistochemical analysis. *Brain Res*
995, 55-65 (2004).
- 641 Morris, R. G. & Frey, U. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the
automatic recording of attended experience? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **352**, 1489-
1503, doi:10.1098/rstb.1997.0136 (1997).
- 642 Staresina, B. P., Gray, J. C. & Davachi, L. Event congruency enhances episodic memory
encoding through semantic elaboration and relational binding. *Cereb Cortex* **19**, 1198-
1207, doi:10.1093/cercor/bhn165 (2009).
- 643 Tubridy, S. & Davachi, L. Medial temporal lobe contributions to episodic sequence
encoding. *Cereb Cortex* **21**, 272-280, doi:10.1093/cercor/bhq092 (2011).
- 644 Miyashita, Y. & Chang, H. S. Neuronal correlate of pictorial short-term memory in the
primate temporal cortex. *Nature* **331**, 68-70, doi:10.1038/331068a0 (1988).
- 645 Tendolkar, I. *et al.* Probing the neural correlates of associative memory formation: a
parametrically analyzed event-related functional MRI study. *Brain Res* **1142**, 159-168,
doi:10.1016/j.brainres.2007.01.040 (2007).
- 646 Haskins, A. L., Yonelinas, A. P., Quamme, J. R. & Ranganath, C. Perirhinal cortex supports
encoding and familiarity-based recognition of novel associations. *Neuron* **59**, 554-560,
doi:10.1016/j.neuron.2008.07.035 (2008).
- 647 Davis, T., Love, B. C. & Preston, A. R. Learning the exception to the rule: model-based fMRI
reveals specialized representations for surprising category members. *Cereb Cortex* **22**, 260-
273, doi:10.1093/cercor/bhr036 (2012).
- 648 Hannula, D. E. & Ranganath, C. Medial temporal lobe activity predicts successful relational
memory binding. *J Neurosci* **28**, 116-124, doi:10.1523/JNEUROSCI.3086-07.2008 (2008).
- 649 Bunsey, M. & Eichenbaum, H. Critical role of the parahippocampal region for paired-
associate learning in rats. *Behav Neurosci* **107**, 740-747 (1993).
- 650 Turriziani, P., Fadda, L., Caltagirone, C. & Carlesimo, G. A. Recognition memory for single
items and for associations in amnesic patients. *Neuropsychologia* **42**, 426-433 (2004).
- 651 Quamme, J. R., Yonelinas, A. P. & Norman, K. A. Effect of unitization on associative
recognition in amnesia. *Hippocampus* **17**, 192-200, doi:10.1002/hipo.20257 (2007).
- 652 Schacter, D. L. & Graf, P. Modality specificity of implicit memory for new associations. *J*
Exp Psychol Learn Mem Cogn **15**, 3-12 (1989).
- 653 Cohen, N. J., Poldrack, R. A. & Eichenbaum, H. Memory for items and memory for relations
in the procedural/declarative memory framework. *Memory* **5**, 131-178,
doi:10.1080/741941149 (1997).
- 654 Luo, J. & Niki, K. Does hippocampus associate discontinuous events? Evidence from event-
related fMRI. *Hippocampus* **15**, 141-148, doi:10.1002/hipo.20054 (2005).
- 655 Raffone, A. & Wolters, G. A cortical mechanism for binding in visual working memory. *J*
Cogn Neurosci **13**, 766-785, doi:10.1162/08989290152541430 (2001).

- 656 Cer, D. M. & O'Reilly, R. C. Neural mechanisms of binding in the hippocampus and neocortex. (2006).
- 657 Pittenger, C. *et al.* Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron* **34**, 447-462 (2002).
- 658 Rampon, C. *et al.* Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* **3**, 238-244, doi:10.1038/72945 (2000).
- 659 Witter, M. P., Wouterlood, F. G., Naber, P. A. & Van Haften, T. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci* **911**, 1-24 (2000).
- 660 Burwell, R. D. & Amaral, D. G. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* **391**, 293-321 (1998).
- 661 Kosel, K. C., Van Hoesen, G. W. & Rosene, D. L. A direct projection from the perirhinal cortex (area 35) to the subiculum in the rat. *Brain Res* **269**, 347-351 (1983).
- 662 McIntyre, D. C., Kelly, M. E. & Staines, W. A. Efferent projections of the anterior perirhinal cortex in the rat. *J Comp Neurol* **369**, 302-318, doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960527)369:2<302::AID-CNE10>3.0.CO;2-J (1996).
- 663 Witter, M. P., Naber, P. A. & Lopes da Silva, F. Perirhinal cortex does not project to the dentate gyrus. *Hippocampus* **9**, 605-606, doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:5<605::AID-HIPO16>3.0.CO;2-9 (1999).
- 664 Craig, S. & Commins, S. Plastic and metaplastic changes in the CA1 and subicular projections to the entorhinal cortex. *Brain Res* **1147**, 124-139, doi:10.1016/j.brainres.2007.02.016 (2007).
- 665 Liu, P. & Bilkey, D. K. Long-term potentiation in the perirhinal-hippocampal pathway is NMDA dependent. *Neuroreport* **7**, 1241-1244 (1996).
- 666 Liu, P. & Bilkey, D. K. Direct connection between perirhinal cortex and hippocampus is a major constituent of the lateral perforant path. *Hippocampus* **6**, 125-135, doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:2<125::AID-HIPO4>3.0.CO;2-O (1996).
- 667 Kealy, J. & Commins, S. Frequency-dependent changes in synaptic plasticity and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the CA1 to perirhinal cortex projection. *Brain Res* **1326**, 51-61, doi:10.1016/j.brainres.2010.02.065 (2010).
- 668 Kealy, J. & Commins, S. Antagonism of glutamate receptors in the CA1 to perirhinal cortex projection prevents long-term potentiation and attenuates levels of brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res* **1265**, 53-64, doi:10.1016/j.brainres.2009.01.067 (2009).
- 669 Cousens, G. & Otto, T. A. Induction and transient suppression of long-term potentiation in the peri- and postrhinal cortices following theta-related stimulation of hippocampal field CA1. *Brain Res* **780**, 95-101 (1998).
- 670 Albasser, M. M. *et al.* The neural basis of nonvisual object recognition memory in the rat. *Behav Neurosci* **127**, 70-85, doi:10.1037/a0031216 (2013).
- 671 Kinnavane, L., Amin, E., Horne, M. & Aggleton, J. P. Mapping parahippocampal systems for recognition and recency memory in the absence of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **40**, 3720-3734, doi:10.1111/ejn.12740 (2014).
- 672 Olarte-Sanchez, C. M., Kinnavane, L., Amin, E. & Aggleton, J. P. Contrasting networks for recognition memory and recency memory revealed by immediate-early gene imaging in the rat. *Behav Neurosci* **128**, 504-522, doi:10.1037/a0037055 (2014).

- 673 Fernandez, G. *et al.* Real-time tracking of memory formation in the human rhinal cortex
and hippocampus. *Science* **285**, 1582-1585 (1999).
- 674 Romero-Granados, R., Fontan-Lozano, A., Delgado-Garcia, J. M. & Carrion, A. M. From
learning to forgetting: behavioral, circuitry, and molecular properties define the different
functional states of the recognition memory trace. *Hippocampus* **20**, 584-595,
doi:10.1002/hipo.20669 (2010).
- 675 Buzsaki, G. Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states.
Neuroscience **31**, 551-570 (1989).
- 676 Stickgold, R., Hobson, J. A., Fosse, R. & Fosse, M. Sleep, learning, and dreams: off-line
memory reprocessing. *Science* **294**, 1052-1057, doi:10.1126/science.1063530 (2001).
- 677 Kali, S. & Dayan, P. Off-line replay maintains declarative memories in a model of
hippocampal-neocortical interactions. *Nat Neurosci* **7**, 286-294, doi:10.1038/nn1202
(2004).
- 678 Skaggs, W. E. & McNaughton, B. L. Replay of neuronal firing sequences in rat hippocampus
during sleep following spatial experience. *Science* **271**, 1870-1873 (1996).
- 679 Qin, Y. L., McNaughton, B. L., Skaggs, W. E. & Barnes, C. A. Memory reprocessing in
corticocortical and hippocampocortical neuronal ensembles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol
Sci* **352**, 1525-1533, doi:10.1098/rstb.1997.0139 (1997).
- 680 Wilson, M. A. & McNaughton, B. L. Reactivation of hippocampal ensemble memories
during sleep. *Science* **265**, 676-679 (1994).
- 681 Ji, D. & Wilson, M. A. Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus
during sleep. *Nat Neurosci* **10**, 100-107, doi:10.1038/nn1825 (2007).
- 682 Ego-Stengel, V. & Wilson, M. A. Disruption of ripple-associated hippocampal activity during
rest impairs spatial learning in the rat. *Hippocampus* **20**, 1-10, doi:10.1002/hipo.20707
(2010).
- 683 Vilberg, K. L. & Davachi, L. Perirhinal-hippocampal connectivity during reactivation is a
marker for object-based memory consolidation. *Neuron* **79**, 1232-1242,
doi:10.1016/j.neuron.2013.07.013 (2013).
- 684 Newmark, R. E., Schon, K., Ross, R. S. & Stern, C. E. Contributions of the hippocampal
subfields and entorhinal cortex to disambiguation during working memory. *Hippocampus*
23, 467-475, doi:10.1002/hipo.22106 (2013).
- 685 Frankland, P. W. & Bontempi, B. The organization of recent and remote memories. *Nat
Rev Neurosci* **6**, 119-130, doi:10.1038/nrn1607 (2005).
- 686 Amaral, D. G. & Witter, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal
formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* **31**, 571-591 (1989).
- 687 Nakazawa, K. *et al.* Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative
memory recall. *Science* **297**, 211-218, doi:10.1126/science.1071795 (2002).
- 688 Horner, A. J., Bisby, J. A., Bush, D., Lin, W. J. & Burgess, N. Evidence for holistic episodic
recollection via hippocampal pattern completion. *Nat Commun* **6**, 7462,
doi:10.1038/ncomms8462 (2015).
- 689 O'Keefe, J. & Conway, D. H. Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire
where they fire. *Exp Brain Res* **31**, 573-590 (1978).
- 690 Quirk, G. J., Muller, R. U. & Kubie, J. L. The firing of hippocampal place cells in the dark
depends on the rat's recent experience. *J Neurosci* **10**, 2008-2017 (1990).
- 691 Do, V. H., Martinez, C. O., Martinez, J. L., Jr. & Derrick, B. E. Long-term potentiation in
direct perforant path projections to the hippocampal CA3 region in vivo. *J Neurophysiol*
87, 669-678, doi:10.1152/jn.00938.2000 (2002).

- 692 Watanabe, M. *et al.* Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum
lucidum (mossy fibre-recipient layer) of the mouse hippocampal CA3 subfield. *Eur J*
Neurosci **10**, 478-487 (1998).
- 693 Fellini, L., Florian, C., Courtney, J. & Roulet, P. Pharmacological intervention of hippocampal
CA3 NMDA receptors impairs acquisition and long-term memory retrieval of spatial
pattern completion task. *Learn Mem* **16**, 387-394, doi:10.1101/lm.1433209 (2009).
- 694 Mei, B., Li, F., Gu, Y., Cui, Z. & Tsien, J. Z. NMDA receptors are not required for pattern
completion during associative memory recall. *PLoS One* **6**, e19326,
doi:10.1371/journal.pone.0019326 (2011).
- 695 Lee, I., Rao, G. & Knierim, J. J. A double dissociation between hippocampal subfields:
differential time course of CA3 and CA1 place cells for processing changed environments.
Neuron **42**, 803-815, doi:10.1016/j.neuron.2004.05.010 (2004).
- 696 Cabral, H. O., Fouquet, C., Rondi-Reig, L., Pennartz, C. M. & Battaglia, F. P. Single-trial
properties of place cells in control and CA1 NMDA receptor subunit 1-KO mice. *J Neurosci*
34, 15861-15869, doi:10.1523/JNEUROSCI.5320-13.2014 (2014).
- 697 McHugh, T. J., Blum, K. I., Tsien, J. Z., Tonegawa, S. & Wilson, M. A. Impaired hippocampal
representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* **87**, 1339-1349
(1996).
- 698 Tonegawa, S. *et al.* Hippocampal CA1-region-restricted knockout of NMDAR1 gene
disrupts synaptic plasticity, place fields, and spatial learning. *Cold Spring Harb Symp Quant*
Biol **61**, 225-238 (1996).
- 699 Jerman, T., Kesner, R. P. & Hunsaker, M. R. Disconnection analysis of CA3 and DG in
mediating encoding but not retrieval in a spatial maze learning task. *Learn Mem* **13**, 458-
464, doi:10.1101/lm.246906 (2006).
- 700 McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Meltzer, J. & Sutherland, R. J. Hippocampal granule cells
are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell
discharge. *Exp Brain Res* **76**, 485-496 (1989).
- 701 Mizumori, S. J., McNaughton, B. L., Barnes, C. A. & Fox, K. B. Preserved spatial coding in
hippocampal CA1 pyramidal cells during reversible suppression of CA3c output: evidence
for pattern completion in hippocampus. *J Neurosci* **9**, 3915-3928 (1989).
- 702 Brun, V. H. *et al.* Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-
hippocampal circuitry. *Science* **296**, 2243-2246, doi:10.1126/science.1071089 (2002).
- 703 Eldridge, L. L., Engel, S. A., Zeineh, M. M., Bookheimer, S. Y. & Knowlton, B. J. A
dissociation of encoding and retrieval processes in the human hippocampus. *J Neurosci* **25**,
3280-3286, doi:10.1523/JNEUROSCI.3420-04.2005 (2005).
- 704 Rolls, E. T. A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus* **6**, 601-620,
doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:6<601::AID-HIPO5>3.0.CO;2-J (1996).
- 705 Lacy, J. W., Yassa, M. A., Stark, S. M., Muftuler, L. T. & Stark, C. E. Distinct pattern
separation related transfer functions in human CA3/dentate and CA1 revealed using high-
resolution fMRI and variable mnemonic similarity. *Learn Mem* **18**, 15-18,
doi:10.1101/lm.1971111 (2011).
- 706 Derrick, B. E. Plastic processes in the dentate gyrus: a computational perspective. *Prog*
Brain Res **163**, 417-451, doi:10.1016/S0079-6123(07)63024-6 (2007).
- 707 Derrick, B. E., York, A. D. & Martinez, J. L., Jr. Increased granule cell neurogenesis in the
adult dentate gyrus following mossy fiber stimulation sufficient to induce long-term
potentiation. *Brain Res* **857**, 300-307 (2000).

- 708 Yeckel, M. F. & Berger, T. W. Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from
the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proc Natl Acad
Sci U S A* **87**, 5832-5836 (1990).
- 709 Leutgeb, J. K. *et al.* Progressive transformation of hippocampal neuronal representations
in "morphed" environments. *Neuron* **48**, 345-358, doi:10.1016/j.neuron.2005.09.007
(2005).
- 710 Patterson, S. L. *et al.* Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission
and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* **16**, 1137-1145 (1996).
- 711 Akaneya, Y., Tsumoto, T., Kinoshita, S. & Hatanaka, H. Brain-derived neurotrophic factor
enhances long-term potentiation in rat visual cortex. *J Neurosci* **17**, 6707-6716 (1997).
- 712 Gottschalk, W., Pozzo-Miller, L. D., Figurov, A. & Lu, B. Presynaptic modulation of synaptic
transmission and plasticity by brain-derived neurotrophic factor in the developing
hippocampus. *J Neurosci* **18**, 6830-6839 (1998).
- 713 Huber, K. M., Sawtell, N. B. & Bear, M. F. Brain-derived neurotrophic factor alters the
synaptic modification threshold in visual cortex. *Neuropharmacology* **37**, 571-579 (1998).
- 714 Kinoshita, S. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor prevents low-frequency inputs from
inducing long-term depression in the developing visual cortex. *J Neurosci* **19**, 2122-2130
(1999).
- 715 Rosenblum, K., Dudai, Y. & Richter-Levin, G. Long-term potentiation increases tyrosine
phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in rat dentate gyrus in
vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10457-10460 (1996).
- 716 Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G., Gotz, R. & Barde, Y. A. Binding of neurotrophin-3 to its
neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived
neurotrophic factor. *EMBO J* **11**, 917-922 (1992).
- 717 Chao, M. V. & Hempstead, B. L. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* **18**,
321-326 (1995).
- 718 Friedman, W. J. Proneurotrophins, seizures, and neuronal apoptosis. *Neuroscientist* **16**,
244-252, doi:10.1177/1073858409349903 (2010).
- 719 Hu, X. Y. *et al.* Increased p75(NTR) expression in hippocampal neurons containing
hyperphosphorylated tau in Alzheimer patients. *Exp Neurol* **178**, 104-111 (2002).
- 720 Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M. & Varon, S. Distribution of brain-
derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS:
evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* **17**, 2295-2313 (1997).
- 721 Yan, Q. *et al.* Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat
central nervous system. *Neuroscience* **78**, 431-448 (1997).
- 722 Hasselmo, M. E. & Schnell, E. Laminar selectivity of the cholinergic suppression of synaptic
transmission in rat hippocampal region CA1: computational modeling and brain slice
physiology. *J Neurosci* **14**, 3898-3914 (1994).
- 723 Lorincz, A. & Buzsaki, G. Two-phase computational model training long-term memories in
the entorhinal-hippocampal region. *Ann N Y Acad Sci* **911**, 83-111 (2000).
- 724 Kumaran, D. & Maguire, E. A. Match mismatch processes underlie human hippocampal
responses to associative novelty. *J Neurosci* **27**, 8517-8524, doi:10.1523/JNEUROSCI.1677-
07.2007 (2007).
- 725 Wilson, I. A. *et al.* Place cell rigidity correlates with impaired spatial learning in aged rats.
Neurobiol Aging **24**, 297-305 (2003).
- 726 Wilson, I. A. *et al.* Cognitive aging and the hippocampus: how old rats represent new
environments. *J Neurosci* **24**, 3870-3878, doi:10.1523/JNEUROSCI.5205-03.2004 (2004).

- 727 Wilson, I. A., Ikonen, S., Gallagher, M., Eichenbaum, H. & Tanila, H. Age-associated alterations of hippocampal place cells are subregion specific. *J Neurosci* **25**, 6877-6886, doi:10.1523/JNEUROSCI.1744-05.2005 (2005).
- 728 Barnes, C. A., Suster, M. S., Shen, J. & McNaughton, B. L. Multistability of cognitive maps in the hippocampus of old rats. *Nature* **388**, 272-275, doi:10.1038/40859 (1997).
- 729 Yassa, M. A., Muftuler, L. T. & Stark, C. E. Ultrahigh-resolution microstructural diffusion tensor imaging reveals perforant path degradation in aged humans in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12687-12691, doi:10.1073/pnas.1002113107 (2010).
- 730 Smith, T. D., Adams, M. M., Gallagher, M., Morrison, J. H. & Rapp, P. R. Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J Neurosci* **20**, 6587-6593 (2000).
- 731 Wilson, I. A., Gallagher, M., Eichenbaum, H. & Tanila, H. Neurocognitive aging: prior memories hinder new hippocampal encoding. *Trends Neurosci* **29**, 662-670, doi:10.1016/j.tins.2006.10.002 (2006).
- 732 Sakai, K. & Miyashita, Y. Neural organization for the long-term memory of paired associates. *Nature* **354**, 152-155, doi:10.1038/354152a0 (1991).
- 733 Knierim, J. J. Hippocampus and memory. Can we have our place and fear it too? *Neuron* **37**, 372-374 (2003).
- 734 Knierim, J. J. & Rao, G. Distal landmarks and hippocampal place cells: effects of relative translation versus rotation. *Hippocampus* **13**, 604-617, doi:10.1002/hipo.10092 (2003).
- 735 Leutgeb, S. *et al.* Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles. *Science* **309**, 619-623, doi:10.1126/science.1114037 (2005).
- 736 O'Keefe, J. & Speakman, A. Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Exp Brain Res* **68**, 1-27 (1987).
- 737 Hayman, R. M., Chakraborty, S., Anderson, M. I. & Jeffery, K. J. Context-specific acquisition of location discrimination by hippocampal place cells. *Eur J Neurosci* **18**, 2825-2834 (2003).
- 738 Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Moser, M. B. & Moser, E. I. Place cells, spatial maps and the population code for memory. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 738-746, doi:10.1016/j.conb.2005.10.002 (2005).
- 739 Tanila, H., Shapiro, M. L. & Eichenbaum, H. Discordance of spatial representation in ensembles of hippocampal place cells. *Hippocampus* **7**, 613-623, doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:6<613::AID-HIPO4>3.0.CO;2-F (1997).
- 740 Hales, J. B. *et al.* Medial entorhinal cortex lesions only partially disrupt hippocampal place cells and hippocampus-dependent place memory. *Cell Rep* **9**, 893-901, doi:10.1016/j.celrep.2014.10.009 (2014).
- 741 O'Keefe, J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol* **51**, 78-109 (1976).
- 742 Muller, R. U., Bostock, E., Taube, J. S. & Kubie, J. L. On the directional firing properties of hippocampal place cells. *J Neurosci* **14**, 7235-7251 (1994).
- 743 Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Moser, E. I. & Moser, M. B. Fast rate coding in hippocampal CA3 cell ensembles. *Hippocampus* **16**, 765-774, doi:10.1002/hipo.20201 (2006).
- 744 MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J. & Barker, J. L. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* **321**, 519-522, doi:10.1038/321519a0 (1986).
- 745 Collingridge, G. L., Randall, A. D., Davies, C. H. & Alford, S. The synaptic activation of NMDA receptors and Ca²⁺ signalling in neurons. *Ciba Found Symp* **164**, 162-171; discussion 172-165 (1992).

- 746 Rolls, E. T. & Deco, G. Networks for memory, perception, and decision-making, and beyond
to how the syntax for language might be implemented in the brain. *Brain Res* **1621**, 316-
334, doi:10.1016/j.brainres.2014.09.021 (2015).
- 747 Muller, D., Joly, M. & Lynch, G. Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the
induction and expression of LTP. *Science* **242**, 1694-1697 (1988).
- 748 Bawin, S. M., Satmary, W. M. & Adey, W. R. Roles of the NMDA and quisqualate/kainate
receptors in the induction and expression of kindled bursts in rat hippocampal slices.
Epilepsy Res **15**, 7-13 (1993).
- 749 Rao, A. & Craig, A. M. Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in
hippocampal neurons. *Neuron* **19**, 801-812 (1997).
- 750 Barria, A. & Malinow, R. Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron*
35, 345-353 (2002).
- 751 Chen, W. S. & Bear, M. F. Activity-dependent regulation of NR2B translation contributes to
metaplasticity in mouse visual cortex. *Neuropharmacology* **52**, 200-214,
doi:10.1016/j.neuropharm.2006.07.003 (2007).
- 752 Roche, K. W. *et al.* Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat*
Neurosci **4**, 794-802, doi:10.1038/90498 (2001).
- 753 Williams, J. M. *et al.* Differential trafficking of AMPA and NMDA receptors during long-
term potentiation in awake adult animals. *J Neurosci* **27**, 14171-14178,
doi:10.1523/JNEUROSCI.2348-07.2007 (2007).
- 754 Clark, K. A., Randall, A. D. & Collingridge, G. L. A comparison of paired-pulsed facilitation of
AMPA and NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic currents in the
hippocampus. *Exp Brain Res* **101**, 272-278 (1994).
- 755 Muller, D. & Lynch, G. Long-term potentiation differentially affects two components of
synaptic responses in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9346-9350 (1988).
- 756 Schulz, P. E., Cook, E. P. & Johnston, D. Changes in paired-pulse facilitation suggest
presynaptic involvement in long-term potentiation. *J Neurosci* **14**, 5325-5337 (1994).
- 757 Pita-Almenar, J. D., Collado, M. S., Colbert, C. M. & Eskin, A. Different mechanisms exist for
the plasticity of glutamate reuptake during early long-term potentiation (LTP) and late LTP.
J Neurosci **26**, 10461-10471, doi:10.1523/JNEUROSCI.2579-06.2006 (2006).
- 758 Kullmann, D. M., Perkel, D. J., Manabe, T. & Nicoll, R. A. Ca²⁺ entry via postsynaptic
voltage-sensitive Ca²⁺ channels can transiently potentiate excitatory synaptic
transmission in the hippocampus. *Neuron* **9**, 1175-1183 (1992).
- 759 Manabe, T., Renner, P. & Nicoll, R. A. Postsynaptic contribution to long-term potentiation
revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature* **355**, 50-55,
doi:10.1038/355050a0 (1992).
- 760 Hellier, J. L. *et al.* NMDA receptor trafficking at recurrent synapses stabilizes the state of
the CA3 network. *J Neurophysiol* **98**, 2818-2826, doi:10.1152/jn.00346.2007 (2007).
- 761 Dragoi, G., Harris, K. D. & Buzsaki, G. Place representation within hippocampal networks is
modified by long-term potentiation. *Neuron* **39**, 843-853 (2003).
- 762 Agnihotri, N. T., Hawkins, R. D., Kandel, E. R. & Kentros, C. The long-term stability of new
hippocampal place fields requires new protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**,
3656-3661, doi:10.1073/pnas.0400385101 (2004).
- 763 Schoenenberger, P., O'Neill, J. & Csicsvari, J. Activity-dependent plasticity of hippocampal
place maps. *Nature Communications* **7**, 11824, doi:10.1038/ncomms11824 (2016).
- 764 Mehta, M. R., Quirk, M. C. & Wilson, M. A. Experience-dependent asymmetric shape of
hippocampal receptive fields. *Neuron* **25**, 707-715 (2000).

- 765 Mehta, M. R., Barnes, C. A. & McNaughton, B. L. Experience-dependent, asymmetric expansion of hippocampal place fields. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8918-8921 (1997).
- 766 Ekstrom, A. D., Meltzer, J., McNaughton, B. L. & Barnes, C. A. NMDA receptor antagonism blocks experience-dependent expansion of hippocampal "place fields". *Neuron* **31**, 631-638 (2001).
- 767 Frank, L. M., Stanley, G. B. & Brown, E. N. Hippocampal plasticity across multiple days of exposure to novel environments. *J Neurosci* **24**, 7681-7689, doi:10.1523/JNEUROSCI.1958-04.2004 (2004).