



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Rol de la vía de mTORC1 en la evocación de la memoria

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

Magdalena Pereyra

Director de tesis: Jorge H. Medina

Directora asistente: Cynthia Katche

Consejero de estudios: Arturo Romano

Lugar de trabajo: Laboratorio de Memoria- Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof.E.de Robertis"-Facultad de Medicina-Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2020

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
PUBLICACIONES	9
ABSTRACT	10
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	18
Aprendizaje y memoria	19
Clasificaciones de la memoria	21
Memorias aversivas	23
Sistemas de memoria: lóbulo temporal medial y rol del hipocampo	25
Etapas de la memoria	28
Evocación	31
mTORC1	36
Rapamicina	40
Plasticidad sináptica y memoria	40
Receptores AMPA	43
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
HIPÓTESIS	47
OBJETIVO GENERAL	47
OBJETIVOS PARTICULARES	47
MATERIALES Y MÉTODOS	49
Sujetos experimentales	49
Cirugía	49
Infusión de drogas	51
Drogas	52
Corroboración de la correcta localización de las cánulas	54
Procedimientos conductuales	55
Tarea de evitación inhibitoria	55
Tarea de Reconocimiento espacial de objetos	57
Tarea de exploración en campo abierto	60
Ensayos bioquímicos	61
Obtención de fracciones subcelulares	61
Western Blot	63

Remoción de anticuerpos para re-incubación	64
Diseño Experimental y Estadística	64
RESULTADOS	66
CAPITULO 1	67
La síntesis proteica es requerida al momento de la evocación para una normal expresión de una memoria de largo término	68
El bloqueo de la vía de mTORC1 impide la evocación de memorias previamente expresadas ...	73
La vía de mTORC1 tiene una ventana temporal de acción específica en la evocación de la memoria.....	75
La vía de mTORC1 no participa en la evocación de la memoria de corto término.....	76
La vía de mTORC1 está involucrada en la expresión de memorias persistentes cuya evocación depende del hipocampo	78
La actividad de la vía de mTORC1 es requerida para la evocación de una MLT en la corteza retrosplenial	83
La actividad de la vía de mTORC1 es requerida para la evocación de una MLT y no de una MCT en la tarea de reconocimiento espacial de objetos	86
El bloqueo de la expresión de una MLT por inhibición de la vía de mTORC1 no se debe a un efecto de dependencia de estado	89
El bloqueo de la vía de mTORC1 no afecta la función locomotora en la rata	91
CAPÍTULO 2	94
La síntesis <i>de novo</i> de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA es requerida para la evocación de una MLT	95
La amnesia inducida por bloqueo de la síntesis <i>de novo</i> de GluA2, pero no de GluA1, es revertida por la inhibición de endocitosis de AMPAR	99
La inhibición de la endocitosis de AMPAR previene el efecto amnésico de la rapamicina en la evocación de una MLT	103
Cambios en la expresión de GluA1 y GluA2 asociados a la inhibición de la vía de mTORC1 durante la evocación de una MLT	105
Disminución en los niveles de GluA1 en la PSD asociada a la inhibición de mTORC1 durante la evocación de una MLT.....	106
Incremento en los niveles de GluA2 en la PSD asociado a la inhibición de mTORC1 durante la evocación de una MLT.....	108
Disminución en los niveles de GluA1 en la SPM asociada a la inhibición de mTORC1 durante la evocación de una MLT.....	109
Los niveles de GluA2 en la SPM no se vieron alterados con la inhibición de mTORC1 durante la evocación de una MLT.....	111
Los niveles de GluA1 y GluA2 en el homogenato total permanecieron inalterados con la inhibición de mTORC1 durante la evocación de una MLT	113

DISCUSIÓN	117
La actividad de mTORC1 es necesaria para la evocación de una MLT	117
mTORC1 y su influencia sobre la síntesis global y local en la sinapsis	126
La desregulación de la vía de mTORC1 se encuentra asociada a numerosas neuropatologías .	127
La síntesis de los AMPAR es requerida durante la evocación de una MLT	129
Alteraciones en los niveles de AMPAR durante la inhibición de mTORC1 impiden la normal expresión de una MLT	137
Perspectivas futuras	140
CONCLUSIÓN	143
BIBLIOGRAFÍA	146

AGRADECIMIENTOS

A Jorge, por abrirme las puertas a una experiencia increíble en el Laboratorio de Memoria. Por hacer del laboratorio un espacio de trabajo cálido, donde se promueven la discusión, el intercambio de ideas y comida de forma continua. Especialmente le agradezco por haber sido conmigo un jefe comprensivo y con una paciencia infinita. Por contagiar entusiasmo, curiosidad, espíritu positivo y ganas de trabajar todos los días. Por tirar siempre para adelante, por más agitadas que estuvieran las aguas. Por ser un generador continuo de ideas, un espíritu inquieto, inspirador, motivador. Por las palabras de aliento en momentos difíciles. Por ser un gran personaje, divertido, que siempre nos cuenta el detrás de escena de los papers y sus autores, por recordar cada fecha, por contarnos anécdotas disparatadas de ciencia, política y otras yerbas. Gracias especialmente por todos los consejos de ciencia y de la vida, por el Parque Lezama eterno y por apoyarme en todos mis proyectos.

A Cyn, por los experimentos fundacionales, la gran paciencia, el espíritu maternal, por saber dónde está cada cosa (protocolos, reactivos, cuadernos con indicaciones, etc), por promover seminarios al principio del doctorado, por estar encima para que estudie, lea y dibuje las cascadas de señalización de mTOR, por estar atenta a que no falte nada, por enseñarme tanto, por monitorear los experimentos que hacía falta. Por intentar que sea más “plástica” en mis pensamientos. Por darme una gran mano para que no colapse al inicio del doctorado.

A Anita, partícipe necesaria de esta tesis. Una jugadora indispensable de mi equipo siempre. Anita, mi Lita Ming, sargento Landeta, Truchana Laberreta, la hiena, mi copiloto, mi media naranja científica, la mejor compañera laboral que se puede tener. Por hacer cada experimento más ameno, por estar dispuesta a ayudarme en lo que sea, por su inteligencia y

eficiencia planeando, analizando, etc. Por el aguante, por enseñarme todo, por la paciencia más que infinita, por repetirme todo cada vez que lo necesité, por los consejos y los retos (“cuidados”) siempre desde el cariño, por la crítica constructiva, por su afilado ojo científico, el trabajo codo a codo, el compañerismo todo terreno, las charlas políticas. Por inspirarme con sus ideas, su garra, sus proyectos y por apoyar incondicionalmente los míos. Los agradecimientos quedan cortos.

A Mica y Fer, por la energía arrolladora, el humor, las anécdotas, las salidas, las risas en los almuerzos. A Juli D, por la tranquilidad, el espíritu prolijo, por compartir experimentos, dudas, ideas.

A los Viola. A Haydée, por la buena onda siempre y por sus preguntas inspiradoras que dejan pensando al final de cada seminario. A Maru por su calidez y buena onda, en tiempos que recién entraba al lab. A Pame, por tantos años de contención, cariño, risas, escucha, aguante, amistad, catarsis en momentos difíciles. Por preocuparte por mi y aconsejarme siempre.

A la nueva “troupe Viola”: Rami-Pablo-Juli C, porque el ala Viola se convirtió en un refugio donde bajar un par de cambios, tomar unos mates, reinos de todo y salir de nuevo a la sala de experimentos con las pilas recargadas. A Rami, por la buena onda, la tranquilidad, el humor, por entenderme tanto en temas diversos que van de ciencia a fútbol pasando por la “angustia existencial del viernes por la tarde”, por el aliento siempre. A Pablo, por la extremada buena onda, por siempre tirar para adelante, por siempre ver el lado positivo de todo, por siempre tener una idea para solucionar las cosas. A Juli C, por la buena onda, compañerismo, humor, ojo artístico, por nuestro amor compartido por Seinfeld y Carlos Cuevas, etc.

A los Artic Moncada. A Diego, que siempre está dispuesto a ayudar, a dar una mano ante cada situación que se nos presentó, por sus preguntas afiladas que siempre aportan y dejan pensando, por siempre dar una vuelta de tuerca más, por el afán de resolverlo todo, por tirar ideas disparadoras, por sus críticas a los papers que también fueron inspiradoras, por las charlas políticas, etc. A Mati y Cami, por la buena onda y el espíritu gordo y gourmet.

A Lina, por el cariño y la energía positiva siempre.

A Dani, por la manija workaholic, las juntadas de estudio, por abrirme los ojos en tantas cuestiones, por las charlas de feminismo, ciencia, amistad, risas, comida, risas y comida. A Magui, por la escucha, la amistad, siempre ayudarme a pensar nuevas ideas de los proyectos, por leer y corregirme.

A todos los anexos al lab, Lion, Noe, Pedro, Fabri, Joaco, Micol, Caro, Facu, Fran, Belu, Martín Giurfa, Martín Cammarota, por todos los seminarios y discusiones enriquecedoras. Agradezco mucho todos los intercambios que se promueven en el lab, la posibilidad de interactuar con investigadores tan grosos, comprometidos y a la vez tan cálidos y cercanos a los becarios.

A toda la gente del IBCN, en especial al Lab Paratcha, gracias por las mil dudas resueltas, la ayuda en protocolos de mesada, la mano con el Storm, préstamos de reactivos y toda la buena predisposición en general. ¡También al Lab Falzone por el pHímetro!

Agradezco también a la Universidad de Buenos Aires por la formación que me ha brindado. A la Agencia y al CONICET por las becas que me han permitido realizar este doctorado y a todos los organismos que prestan subsidios que hacen posible llevar a cabo las investigaciones en el laboratorio. A los gobiernos y a los sujetos políticos que empujan hacia adelante el

desarrollo científico en el país. A toda la lucha que garantiza que nuestros derechos laborales se cumplan y vayan mejorando.

A Caro, por la catarsis científica, la manija feminista, por cuestionarnos y replantearnos todo siempre. A Gaby, por nuestra amistad de larga data, el humor ácido y sarcasmo compartido que nos han ayudado a sobrellevar la carrera y el doc. A Ceci, por la dulzura, el cariño y la amistad, por el espíritu feminista, por siempre estar dispuesta a ayudarme y aconsejarme.

A mis amigos de Moscú, que ha sido todos estos años un espacio hermoso de disfrute y descubrimiento, un laboratorio fuera del laboratorio. En especial, gracias a Maga y a Yair, por prestar oído cada miércoles en Angelito, por alentarme, por agitarme y apoyarme en todos mis proyectos. A las +30, otro lindo espacio donde prima la manija, el aguante y los abrazos de gol.

A mis amigas del Pelle, hermanas del corazón, que me bancan en las buenas y en las malas desde ya hace mucho tiempo. A Andre, por entenderme y calmarme, por el cariño, por acordarse de todas mis cosas, por alentarme siempre y darme fuerzas para seguir adelante. A Veri, por la dulzura, la escucha y la re-escucha infinitas, la contención, por estar siempre y bancarme, por las charlas eternas, por ser mi gran compañera de aventuras y viajes. A Da, por el cariño y el apoyo, por ayudarme a parar la pelota, hasta en el sentido literal. A Sil, por apoyarme incondicionalmente, por esa dulzura infinita, por manejararme y tirarme para adelante, por acompañarme siempre a dar pequeños y grandes pasos. A Mauge, por las risas y la catarsis, A Pau, por cortar la bocha y tirar para adelante, A Sofi y Gise, por los lindos momentos.

Por último, el agradecimiento más importante es para mi familia. A mi mamá, por ser un ejemplo de esfuerzo infinito, de trabajo sin parar, de perseverancia, por guiarme, por enseñarme que de cada experiencia siempre puedo aprender algo y mejorar, por el apoyo, el amor, por alentarme siempre y ayudarme a pensar nuevas alternativas, por darme fuerzas y confianza en que todo va a salir bien, por leerme, corregirme, por el gen de hormiga viajera. A mi papá, por inculcarme espíritu de lucha (sobre todo peronista), el amor por la lectura, por cuestionar las cosas, por ese afán de hacer y de volver a intentar. A mis hermanas y a Felix, que es como un hermano más, por oficiar de segundos y a veces primeros padres. A Fran, por su ejemplo metódico, por malcriarme, aconsejarme, alentarme y ayudarme siempre. A Felix, por leer y corregir siempre y primero que nadie todas mis aplicaciones y ayudarme con el inglés, por los consejos, por su ojo estético y su visión práctica que nos han salvado de tantas “Pereyreadas”, por los vinos, los gin tonics y las ricas comidas, por compartir a Titi. A Jime, por correrme con su ritmo alocado para que no “cuelgue” con nada, por el espíritu práctico siempre, por acompañarme incluso a la distancia, por malcriarme. A Armel, por les fromages, por ayudarme con el francés. A los cuatro, por los sobrinos más lindos del mundo, Juli, Ine y Emi, que me llenan de dulzura, risas, piyama party, juego y amor.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados de esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones/manuscritos:

Pereyra, M., Katche, C., De Landeta, A. B., & Medina, J. H. (2018). mTORC1 controls long-term memory retrieval. *Scientific reports*, 8(1), 1-10. DOI: [10.1038/s41598-018-27053-5](https://doi.org/10.1038/s41598-018-27053-5)

Pereyra, M., de Landeta, A.B., Katche, C. & Medina, J. H. Requirement of AMPAR expression during long-term memory retrieval and its association with mTORC1 signaling. Manuscrito en preparación.

Otras publicaciones del período:

de Landeta, A.B., Pereyra, M., Medina, J. H. & Katche, C. (2020). Anterior retrosplenial cortex is required for long-term object recognition memory. *Scientific reports*. DOI: [10.1038/s41598-020-60937-z](https://doi.org/10.1038/s41598-020-60937-z)

ABSTRACT

Role of mTORC1 pathway on memory retrieval

The ability to recall past events is essential for several adaptive behaviours. Memory retrieval refers to the access to stored information and its expression in the brain. Understanding how stored information emerges is a main question in the neurobiology of memory that is now increasingly gaining attention. However, molecular mechanisms underlying memory retrieval, including involvement of protein synthesis, are to date poorly described.

Mammalian (mechanistic) target of rapamycin complex 1 (mTORC1), a central regulator of protein synthesis, has been implicated in synaptic plasticity and is required for memory formation. Using inhibitory avoidance (IA), we first evaluated the role of mTORC1 in memory retrieval. Infusion of a selective mTORC1 inhibitor, rapamycin, into the dorsal hippocampus 15 or 40 minutes but not 3 hours before testing at 24 hours reversibly disrupted memory expression even in animals that had already expressed IA memory. Emetine, a general protein synthesis inhibitor, provoked a similar impairment. mTORC1 inhibition did not interfere with short-term memory retrieval, while its infusion before test at 7 or 14 but not at 28 days after training impaired memory expression. mTORC1 blockade in retrosplenial cortex, another structure required for IA memory, also impaired memory retention. In addition, pretest intrahippocampal rapamycin infusion impaired object location memory retrieval.

Then, taking into account these results, we decided to evaluate the potential mechanisms by which mTORC1 signaling pathway participates in memory retrieval. As mTORC1 is necessary during consolidation to increase AMPA receptors (AMPA) GluA1 subunits levels at the synapse, we assessed if a similar mechanism accounts for memory retrieval.

Intrahippocampal infusion of GluA1 antisense but not GluA1 missense oligonucleotides 3 hours before testing impaired memory retention at 48 hours after training in the IA task. The same result was observed upon delivery of GluA2 antisense oligonucleotides 3 hours before test, thus showing the requirement of GluA1 and GluA2 AMPAR subunits for memory retrieval. This memory impairment induced by GluA2 antisense oligonucleotides infusion 3 hours before retrieval was reverted by infusion of GluA2 γ , a peptide that selectively interferes with the endocytosis of GluA2-containing AMPAR, 1 hour before testing at 48 hours in the IA task. We repeated this experiment for GluA1 ASO and surprisingly this time AMPAR endocytosis blockade was not sufficient to compensate the GluA1 synthesis inhibition. We next studied the role of GluA-subunit trafficking during memory recall and its relationship with mTORC1 pathway. We performed a double infusion experiment in which we first infused GluA2 γ 1 hour prior testing and then rapamycin 30 minutes before testing at 48 hours after training in the IA task. We found that GluA2 γ prevented memory impairment caused by mTORC1 inactivation. Our work indicates that GluA1 and GluA2 AMPAR subunits *de novo* synthesis is required for memory retrieval and suggests that mTORC1 regulates AMPAR trafficking during retrieval. Finally, we tested whether mTORC1 inactivation impacts the recruitment of AMPAR subunits using Western Blots to measure AMPAR subunits levels after testing in the IA task under rapamycin infusion prior test. We found a GluA2 levels increase and a GluA1 decrease at the post synaptic density close in time to memory retrieval while GluA2 levels remain intact at the synaptic plasma membrane fraction (SPM) and the GluA1 decrease persist also at the SPM. No changes in these AMPAR subunits were found in the total homogenate fractions.

Altogether, our findings support the idea that ongoing protein synthesis mediated by activation of mTORC1 pathway is necessary for long term memory retrieval. Also, our results

highlight the role of mTORC1 as a key determinant of memory retrieval that impacts on the expression of different AMPAR subunits.

Key words: memory-retrieval-mTORC1-hippocampus-AMPA receptors-protein synthesis.

RESUMEN

Rol de la vía de mTORC1 en la evocación de la memoria

La habilidad para recordar eventos pasados es esencial para numerosos comportamientos adaptativos. La evocación de la memoria es un proceso complejo que involucra la reactivación de la información previamente adquirida desde un estado latente a un estado que permite su expresión. Entender cómo la información guardada en el cerebro se expresa es una pregunta central de la neurobiología de la memoria. Sin embargo, la información sobre mecanismos moleculares que subyacen la evocación, incluyendo el requerimiento de síntesis proteica, es escasa y fragmentaria.

El complejo mTORC1, un regulador clave de la síntesis proteica, ha sido implicado en procesos de plasticidad sináptica y su requerimiento ha sido reportado para la formación de la memoria. Utilizando la tarea de evitación inhibitoria (EI), evaluamos el rol de mTORC1 en la evocación de la memoria de largo término. La infusión de rapamicina, un inhibidor selectivo de mTORC1, en el hipocampo dorsal 15 o 40 minutos, pero no 3 horas antes del testeo realizado a 24 horas bloqueó reversiblemente la expresión de la memoria incluso en animales que previamente habían expresado memoria. La infusión de emetina, un inhibidor general de la síntesis proteica, provocó un bloqueo similar de la expresión de la memoria. La inhibición de mTORC1 no interfirió con la expresión de una memoria de corto término y en cambio, sí afectó una memoria de largo término testada a los 7 o 14 días, pero no a los 28 días. El bloqueo de la vía de mTORC1 en la corteza retrosplenial, otra estructura involucrada en la memoria de la tarea de EI también bloqueó la retención de la memoria. Además, la infusión

de rapamicina afectó la evocación de una memoria asociada a una tarea con distinta valencia, como el reconocimiento espacial de objetos.

Luego, teniendo en cuenta estos resultados, decidimos evaluar los potenciales mecanismos a través de los cuales la vía de mTORC1 participa en la evocación de la memoria. Considerando que mTORC1 es necesario durante la consolidación para incrementar los niveles de la subunidad GluA1 de los receptores AMPA en la sinapsis, primero evaluamos si existían mecanismos similares subyacentes a la evocación de la memoria. La infusión intrahipocampal de oligonucleótidos antisentido para GluA1, pero no de oligonucleótidos sin sentido para GluA1 3 horas del testeo llevado a cabo 48 horas posteriores al entrenamiento de la tarea de EI bloqueó la expresión de la memoria. El mismo resultado fue obtenido luego de la infusión de oligonucleótidos antisentido para GluA2 3 horas antes del testeo, evidenciando el requerimiento tanto de la subunidad GluA1 como de la subunidad GluA2 de los receptores AMPA para la evocación de la memoria. Este bloqueo de la expresión de la memoria inducido por la infusión de los oligonucleótidos antisentido para GluA2 pudo ser revertido por la infusión de GluA23γ, un péptido que interfiere selectivamente con la endocitosis de los receptores AMPA, 1 hora antes del testeo llevado a cabo a las 48 horas posteriores al entrenamiento. Luego repetimos este experimento de doble infusión para GluA1 (infusión de los oligonucleótidos antisentido de GluA1 3 horas previas al testeo seguido por infusión del péptido 1 hora antes del testeo llevado a cabo 48 horas luego del entrenamiento) pero esta vez el bloqueo de la endocitosis no fue suficiente para compensar la inhibición de la síntesis de GluA1. Después decidimos estudiar el rol del tráfico de las subunidades GluA de los receptores AMPA durante la evocación de la memoria y su relación con la vía de mTORC1. Para ello realizamos un experimento de doble infusión intrahipocampal en el cual primero realizamos una infusión del péptido GluA23γ 1 hora antes del testeo en la tarea de EI, seguida

por una infusión de rapamicina 30 minutos antes del testeo que se llevó a cabo 48 horas posteriores al entrenamiento. Observamos que en este caso GluA2 γ previno el bloqueo de la expresión de la memoria inducido por la inactivación de la vía de mTORC1. En resumen, nuestro trabajo indica que tanto la síntesis *de novo* de la subunidad GluA1 como de la subunidad GluA2 de los receptores AMPA es requerida para la evocación de la memoria y sugiere que la vía de mTORC1 podría regular el tráfico de los receptores AMPA durante la evocación. Finalmente, testeamos si la inactivación de la vía de mTORC1 afecta los niveles de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA usando Western Blot. Realizamos experimentos en lo que infundimos vehículo o rapamicina a los animales 30 minutos antes del testeo llevado a cabo 48 horas posteriores al entrenamiento en la tarea de El y se extrajo el hipocampo inmediatamente después de la evocación. Evaluando la fracción de densidad postsináptica, enriquecida en membrana postsináptica, encontramos un aumento en los niveles de GluA2 y una caída de GluA1. En la fracción correspondiente a los sitios extrasinápticos (SPM) no encontramos cambios para GluA2 mientras que la caída en los niveles de GluA1 se mantuvo. Para el homogenato total no encontramos cambios en los niveles de expresión de ninguna de estas subunidades.

Nuestros resultados apoyan la idea de que la síntesis proteica mediada por la activación de la vía de mTORC1 es necesaria para la evocación de la memoria de largo término. Además, nuestros hallazgos apuntan a mTORC1 como un regulador clave de la evocación de la memoria que impacta en la expresión de diferentes subunidades de los receptores AMPA.

Palabras clave: evocación-memoria-mTORC1-receptores AMPA-síntesis proteica-hipocampo.

ABREVIATURAS

AMPAR: receptor de Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ASO: Oligonucleótidos antisentido, del inglés *antisense oligonucleotides*

CS: Estímulo condicionado, del inglés *conditioned stimulus*

DOR: Densidad óptica relativa

EI: Evitación Inhibitoria

Ho/ Ho total: Homogenato total

Hp: Hipocampo

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

LTM: Lóbulo temporal medial

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

MCT: memoria de corto término

MLT: memoria de largo término

MSO: oligonucleótidos sin sentido, del inglés *missense oligonucleotides*

mTOR: blanco de acción de la rapamicina en mamíferos/ mecanístico, del inglés, *mammalian/ mechanistic target of rapamycin*

NMDAR: receptor de ácido N-metil-D-aspartico

PSD: Densidad postsináptica, del inglés *postsynaptic density*

PSI: inhibidor de la síntesis proteica, del inglés *protein synthesis inhibitor*

Rapa: Rapamicina

REO: Reconocimiento espacial de objetos

RSC: Corteza retrosplenial, del inglés *retrosplenial cortex*

SPM: Membrana plasmática sináptica, del inglés *synaptic plasma membrane*

TR: Entrenamiento

TS: Testeo

Veh: vehículo

US: Estímulo incondicionado, del inglés *unconditioned stimulus*

INTRODUCCIÓN

“Los famas para conservar sus recuerdos proceden a embalsamarlos en la siguiente forma: Luego de fijado el recuerdo con pelos y señales, lo envuelven de pies a cabeza en una sábana negra y lo colocan parado contra la pared de la sala, con un cartelito que dice: ‘Excursión a Quilmes’, o ‘Frank Sinatra’. Los cronopios, en cambio, esos seres desordenados y tibios, dejan los recuerdos sueltos por la casa, entre alegres gritos, y ellos andan por el medio y cuando pasa corriendo uno, lo acarician con suavidad y le dicen: ‘No vayas a lastimarte’, y también: ‘Cuidado con los escalones’. Es por eso que las casas de los famas son ordenadas y silenciosas, mientras que en la de los cronopios hay gran bulla y puertas que golpean. Los vecinos se quejan siempre de los cronopios, y los famas mueven la cabeza comprensivamente y van a ver si las etiquetas están todas en su sitio.”

Conservación de los recuerdos, Historias de Cronopios y Famas, Julio Cortázar

“Tampoco la memoria es comprensible sin un acercamiento matemático. El dato fundamental radica en la relación numérica entre el tiempo de la vida vivida y el tiempo de la vida almacenada en la memoria. Nunca hemos intentado calcular esta relación y, por otra parte, no disponemos de ningún medio técnico para hacerlo; no obstante, sin grandes riesgos de equivocarme, puedo suponer que la memoria no conserva sino una millonésima, una milmillonésima, o sea una parcela muy ínfima, de la vida vivida. Esto también forma parte de la esencia misma del hombre. Si alguien pudiera conservar en su memoria todo lo que ha vivido, si pudiera evocar cuando quisiera cualquier fragmento de su pasado, no tendría nada que ver con un ser humano: ni sus amores, ni sus amistades, ni sus odios, ni su facultad de perdonar o de vengarse se parecerían a los nuestros.”

La Ignorancia, Milan Kundera

Aprendizaje y memoria

El aprendizaje y la memoria constituyen el medio principal de adaptación de los seres vivos a las modificaciones inciertas de su medio ambiente: sin ellos sólo seríamos capaces de ejecutar reflejos simples y comportamientos estereotipados.

El aprendizaje se refiere a los cambios en el sistema nervioso producidos por la experiencia que pueden ser duraderos y se manifiestan en el comportamiento. La memoria es un *proceso* de múltiples etapas en el cual la información del ambiente es codificada, almacenada y consolidada en circuitos neuronales y posteriormente evocada (Atkinson y Shiffrin, 1968; Baddeley, 2013). Como puede apreciarse aprendizaje y memoria son dos conceptos muy relacionados: la formación de una memoria y su retención en el tiempo requieren de una experiencia de aprendizaje en donde se adquiere la información. Es decir, no hay memoria sin aprendizaje (salvo en situaciones experimentales artificiales, Vetere y col, 2019).

Es importante destacar que actualmente entendemos a la memoria como un proceso que ocurre en el cerebro que involucra cambios constantes y relativamente permanentes en los circuitos neuronales que procesan la información. La memoria es entonces un fenómeno dinámico y en continua evolución, pero no siempre se la concibió así: antiguas concepciones la definían como un lugar de almacenamiento o como una entidad fija en alguna región delimitada del cerebro.

¿Cómo podemos estudiar aprendizaje y memoria en un organismo? Si bien los cambios en el comportamiento antes y después de una situación de aprendizaje son observables y cuantificables, no se puede medir aprendizaje o memoria en forma directa. La determinación

de si se ha adquirido o no la información sólo puede ser inferida en forma indirecta a través de cambios en el comportamiento (Cahill y col,2001).

Además, el aprendizaje y la memoria son propiedades básicas del sistema nervioso. El entendimiento de los mecanismos cerebrales del aprendizaje y la memoria requiere la identificación de los eventos subyacentes y procesos que ocurren en múltiples niveles de complejidad: desde el nivel molecular, sináptico y celular hasta el de ensamble de neuronas, sistemas cerebrales y comportamiento (Tonegawa y col, 2003). En otras palabras, se puede estudiar cómo una memoria se manifiesta a través del comportamiento, cómo esta información se halla codificada en circuitos neuronales, cómo las neuronas cambian sus conexiones y sus propiedades reactivas para formar o modificar estos circuitos, y cómo estas conexiones son mantenidas en el tiempo, así como también qué vías de señalización y proteínas están implicadas en la memoria. Dados estos múltiples niveles de estudio posibles, para el análisis de la memoria y sus mecanismos biológicos se utiliza una gran variedad de modelos animales (desde insectos y crustáceos hasta roedores y primates) y de abordajes (farmacológico, comportamental, bioquímico, molecular, celular, electrofisiológico, etc). En esta tesis utilizamos una combinación de abordajes comportamentales, farmacológicos y bioquímicos. En este tipo de estudios, típicamente, se somete a los individuos a una sesión de entrenamiento en la que estos aprenden una tarea que produce un cambio en el comportamiento. Luego, se evalúa comportamentalmente si los animales retienen la memoria adquirida en el entrenamiento. Durante el intervalo entre la adquisición y la evaluación de la memoria, se pueden aplicar distintas intervenciones y tratamientos para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que subyacen su adquisición, almacenamiento y evocación. Los abordajes *in vivo* más utilizados incluyen la administración

de fármacos que inhiben específicamente alguna función enzimática, transmisión sináptica, vías de señalización celular, biosíntesis de macromoléculas, etc.; estimulaciones y registros electrofisiológicos en neuronas o poblaciones de neuronas particulares; lesiones discretas en determinadas regiones del cerebro; o simples manipulaciones comportamentales. En cuanto a los abordajes farmacológicos, en esta tesis se implantaron cánulas bilateralmente en el hipocampo dorsal para administrar drogas localmente (esta cirugía de implantación se realiza antes de los ensayos comportamentales). Asimismo, el empleo de distintos métodos bioquímicos de detección de moléculas específicas en tejidos de animales entrenados en alguna tarea permite el establecimiento de correlaciones neurales, celulares y moleculares con la memoria formada. En particular, en esta tesis se utilizó la técnica de Western Blott para medir los niveles de distintas proteínas involucradas en los procesos de memoria en estudio.

Clasificaciones de la memoria

Uno de los criterios más utilizados para clasificar la memoria es el tiempo de duración de las mismas. En primer lugar, la memoria más breve es la memoria de trabajo, que utilizamos para entender la realidad que nos rodea que guarda en detalle y durante pocos segundos informaciones recién percibidas. Luego, se pueden distinguir las memorias de corto término (MCT) que se extienden hasta 2 o 3 horas luego del aprendizaje de las memorias de largo término (MLT) que duran desde varias horas a días o incluso semanas, meses, años o toda una vida (MLT persistentes) (Ver Fig. I.1). Una distinción fundamental con la MCT es que la MLT requiere síntesis proteica (Quevedo y col, 2004).

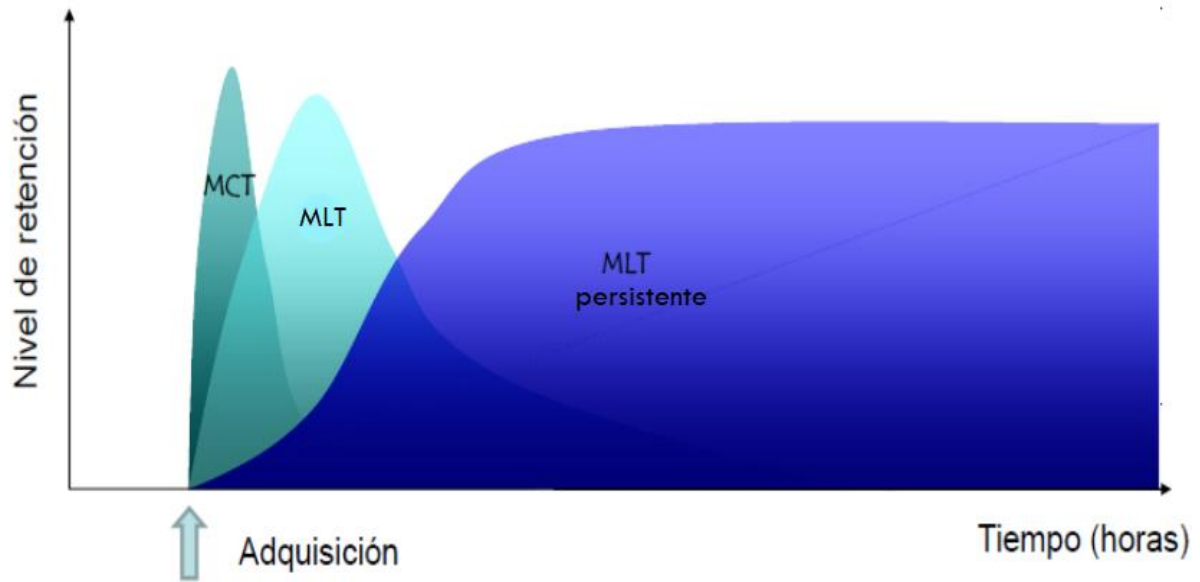


Figura I.1. Curso temporal de las memorias. Desde el momento del aprendizaje se gatillan procesos que pueden dar lugar a memorias de corto plazo (MCT), que duran de segundos a horas, o memorias de largo plazo (MLT), que duran de varias horas a días e incluso memorias de largo plazo persistentes (MLT persistentes), que duran de semanas, meses a años o toda la vida. El esquema muestra el nivel de retención de cada uno de estos tipos de memoria en función del tiempo en escala logarítmica. Se aprecia que las MCT y las MLT decaen con el tiempo, mientras que las MLT persistentes se hacen más fuertes. Modificado de McGaugh, 2000.

Otra clasificación se basa en cómo el sujeto guarda y evoca la información aprendida. Así, se pueden dividir en memorias declarativas o explícitas y las no declarativas, implícitas o de procedimiento. Las primeras (explícitas) involucran hechos o conceptos, dependen del lóbulo temporal medial y presentan una recuperación consciente por el sujeto que en humanos puede por ende expresarse mediante el lenguaje (de ahí el nombre “declarativas”). A su vez, las memorias declarativas incluyen aquellas que corresponden al conocimiento general de objetos, palabras, significados, hechos y personas (memorias semánticas) y aquellas relacionadas con eventos ocurridos en un tiempo y lugar específicos (memorias episódicas) (Squire y col, 2004). Las memorias implícitas corresponden a habilidades, aprendizajes

motores y asociaciones dependientes de otras estructuras cerebrales y que son, en general, adquiridas y recuperadas en un nivel inconsciente (Dudai, 2002). Dentro de las memorias no declarativas se puede diferenciar entre aquellas que implican un aprendizaje asociativo de aquellas no asociativas. En el primer caso, el sujeto presenta una respuesta refleja inconsciente ante un estímulo particular (condicionamiento clásico) o mediante la asociación de una conducta con un estímulo (condicionamiento operante). Las memorias no asociativas son adquiridas cuando la presentación reiterada de un estímulo produce un cambio comportamental en la respuesta al mismo, como es el caso de la habituación (disminución de la respuesta ante un estímulo repetido) y la sensibilización (aumento inespecífico de la intensidad o probabilidad de respuesta por la exposición repetida a un estímulo) (Squire, 2008).

Otro de los criterios usados para agrupar las memorias es la modalidad o valencia del estímulo que las gatilla. La valencia de una memoria está relacionada con el componente emocional y el significado biológico que tiene para el sujeto el estímulo presente durante el aprendizaje. Podemos distinguir así memorias aversivas, apetitivas, etc. Se observa que ante la presentación de un estímulo positivo los animales exhiben comportamientos de aproximación mientras que ante la presentación de un estímulo nocivo o molesto el animal tiene un comportamiento que implica una respuesta de escape o evitación.

Memorias aversivas

Las memorias aversivas o también llamadas memorias de miedo implican un componente negativo (miedo, dolor, malestar) para el sujeto que las experimenta. Al evocar ese evento,

el sujeto modifica su conducta para evitar ese tipo de sensación displacentera. En esta tesis se utilizó la tarea de evitación inhibitoria que genera una memoria aversiva, donde el componente negativo de la experiencia es la molestia causada por un shock eléctrico durante el entrenamiento.

Las memorias aversivas han sido ampliamente estudiadas en los últimos años usando principalmente dos procedimientos de condicionamiento clásico (condicionamiento contextual y condicionamiento de miedo a un tono) y uno instrumental (evitación inhibitoria de un solo entrenamiento) (Izquierdo y col, 2016). Los modelos de aprendizaje de miedo, particularmente el de evitación inhibitoria, han sido muy útiles para el análisis de los mecanismos bioquímicos de la consolidación de la memoria.

La memoria de miedo se forma en el hipocampo (condicionamiento contextual y evitación inhibitoria), en la amígdala basolateral (evitación inhibitoria) y en la amígdala lateral (condicionamiento a un tono) (Lorenzini y col, 1996; Cahill y col, 1999; Fanselow y LeDoux, 1999; Izquierdo y col, 2016). Los circuitos que codifican estas memorias involucran además a las cortezas entorrinal, prefrontal ventromedial pre e infralímbica, la corteza retrosplenial, el subnúcleo central de la amígdala y algunas regiones del sistema límbico (Izquierdo y Medina, 1993; Izquierdo y Medina, 1997; Corcoran y col, 2011; Zhang y col, 2014; Pierson y col, 2015; Weeden y col, 2015).

En modelos animales de roedores, el aprendizaje aversivo es usualmente estudiado por una asociación clásica (Pavloviana) o instrumental entre el ambiente o los cambios en el ambiente (estímulo condicionado) y el estímulo aversivo (en general uno o más shock/s eléctrico/s en las patas, estímulo incondicionado) (Maren, 2001; Kim y Jung, 2006). Este tipo de aprendizaje representa las diversas situaciones en humanos en las cuales un estímulo

inicialmente neutro se vuelve amenazante a través del pareamiento con otros estímulos y genera miedo, una emoción humana que guía muchas de nuestras conductas y que es crítica para la supervivencia.

El miedo es considerado un estado consciente que implica componentes asociativos como no asociativos causado por la exposición a una amenaza real o imaginaria que tiene un gran valor adaptativo (Costanzi y col, 2011). Sin embargo, el miedo humano no es necesariamente idéntico a las sensaciones experimentadas por otros animales expuestos a amenazas comparables (LeDoux, 2014).

Sistemas de memoria: lóbulo temporal medial y rol del hipocampo

En términos biológicos, un sistema de memoria es definido como un conjunto de regiones interconectadas anatómicamente, que procesan un tipo particular de información y su almacenamiento (Kim y Baxter, 2001).

Un sistema de memoria anatómicamente definido es el lóbulo temporal medial (LTM), que incluye la formación hipocampal – el hipocampo, el subíulum y la corteza entorrinal – y cortezas adyacentes – perirrinal y postrinal– (Amaral y Witter, 1995; Squire y Zola, 1996; Kandel y col, 1996; Burwell y Amaral, 1998).

La formación hipocampal es uno de los componentes más importantes dentro de las estructuras del LTM involucrados en la formación de las memorias (McGaugh 2000). En la rata, el término formación hipocampal comprende seis regiones citoarquitectónicamente diferentes e incluye el hipocampo propiamente dicho (el cual se divide en tres regiones CA1, CA2 y CA3 y abarca también al giro dentado (GD)), y el subiculum (S), el presubiculum (PrS),

el parasubiculum (PaS) y la corteza entorrinal (CE) (todas estas estructuras extrahipocampales también son agrupadas y se denominan como corteza parahipocampal). En resumen, toda la formación hipocampal se encuentra altamente conectada, recibiendo información sensorial, propioceptiva y moduladora de distintas áreas del cerebro, y enviando información hacia diferentes regiones del cerebro.

En especial, existe hoy un amplio consenso acerca de que el hipocampo es esencial para la representación espacial y contextual del ambiente y para la capacidad de recordar eventos específicos y correspondientes a lo que llamamos "memoria episódica" (Tulving, 1972; Izquierdo y col, 1993; Bechara y col, 1995; Eichenbaum y col. 1996). El hipocampo sostiene estas representaciones al proporcionar un marco espacial y temporal para relacionar experiencias, creando un "mapa cognitivo" del mundo experimentado por el organismo. También se ha demostrado que aprendizajes de tipo aversivos dependen de manera crucial de la integridad del lóbulo temporal medial, y en especial de la formación hipocampal para la formación de una MLT (Izquierdo y Medina 1997; Moser y Moser 1998; Ogrén y Stiedl 2015). En el paradigma de evitación inhibitoria, por ejemplo, los animales aprenden a evadir su comportamiento innato de exploración del ambiente porque lo asocian con la llegada de un shock eléctrico y se ha demostrado la participación del hipocampo en esta tarea (Izquierdo y col, 1997; Moncada y col, 2011; Giovaninni 2015). El rol crítico del hipocampo también fue observado en condicionamientos de miedo al contexto (Phillips y LeDoux 1992; Kim y Fanselow 1992; LaBar y Phelps 2005).

Numerosos trabajos que evalúan el impacto de lesiones o la administración de fármacos en modelos animales (Milner y col, 1998; Frankland y Bontempi, 2005) indican que la disrupción de la integridad hipocampal altera mayoritariamente la formación de memorias

recientes sobre las remotas. Este gradiente temporal de amnesia, es actualmente explicado a través de la consolidación a nivel de sistemas (McClelland, 1995; Squire y col, 1995). Esta teoría postula que una vez consolidadas, las memorias se independizan de la función hipocampal, volviéndose dependientes de la corteza cerebral (Scoville y Milner, 1957; Winocur, 1990; Squire y Alvarez, 1995). Sin embargo, algunos estudios demostraron la existencia de amnesias recientes y retrógradas sin gradiente temporal. Debido al fuerte componente espacial y al detalle implicado en estas memorias, algunos autores propusieron que el papel del hipocampo en algunos tipos de memoria no es limitado en el tiempo (Moscovitch y Nadel, 1998). Hallazgos similares fueron obtenidos utilizando abordajes con optogenética (Goshen y col, 2011).

El hipocampo dorsal, que es la subdivisión del hipocampo más extensamente estudiada en procesos de memoria (Fanselow y Dong, 2010; Strange y col, 2014) no parece estar conectado fuertemente a las cortezas anteriores. Por lo tanto, es probable que la información del hipocampo se transfiera a estas áreas de manera indirecta, a través de las cortezas posteriores que son los blancos predominantes dorsohipocampales (Cenquizca y Swanson, 2007). A diferencia de las cortezas anteriores que están preferencialmente implicadas en el procesamiento de memorias remotas, las cortezas posteriores son requeridas tanto para memorias recientes como remotas y, además, se ha reportado que su rol en memorias recientes no es redundante con el del hipocampo (Burwell y col, 2004). Entre las cortezas posteriores, la corteza entorrinal ha sido el foco de la investigación experimental, teórica y computacional de memorias episódicas (Gluck y col, 2003; Kesner y Rolls, 2015; Du y col, 2006). Sin embargo, existe evidencia creciente que indica que otras cortezas posteriores además de proporcionar información sensorial también participan en procesos de memoria

(Todd y Bucci, 2015). En este sentido, existen fuertes evidencias de la contribución de la corteza retrosplenial (RSC) en el procesamiento de memoria (Vann y Aggleton, 2002; Burwell y col, 2004; Corcoran y col, 2011; Keene y Bucci, 2008; Keene y Bucci, 2009; Katche y col, 2013)

La corteza retrosplenial (RSC) se localiza en la interfaz entre regiones corticales sensoriales y la formación hipocampal (van Groen y Wyss, 1990; von Groen y Wyss, 1992; von Groen y Wyss, 2003; Sugar y col, 2011; van Strien y col, 2009). Sus conexiones recíprocas con estas estructuras sugieren que se encuentra bien posicionada como para participar de procesos que ocurren luego de la codificación de información, como el almacenamiento y la evocación de la memoria. Consistentes con esta idea, experimentos farmacológicos de inactivación de la RSC llevados a cabo un día después del entrenamiento tanto en una tarea de miedo contextual (Corcoran y col, 2011) como en la tarea de evitación inhibitoria (Katche y col, 2013) afectaron la expresión de la memoria. Estos efectos también se observaron varias semanas después del entrenamiento inicial, sugiriendo una participación prolongada de la RSC en la evocación de la memoria (Corcoran y col, 2011; Katche y col, 2013). Teniendo en cuenta estos antecedentes, en la presente tesis hemos decidido llevar a cabo experimentos en esta estructura, para extender algunos resultados obtenidos en el hipocampo.

Etapas de la memoria

Para poder estudiar la memoria, se debe tener en cuenta que no se trata de un proceso único, sino que está integrado por un conjunto de etapas o fases dinámicas relativamente independientes, con diferentes requerimientos, mecanismos, y cinéticas.

Para que se forme una memoria de algún evento, primero es necesaria la adquisición de la información, durante la cual la experiencia se codifica internamente en los circuitos

neuronales. Luego, la memoria atraviesa una etapa de consolidación en la que se guarda en un sistema de almacenamiento de largo término a través de modificaciones bioquímicas y morfológicas de las sinapsis.

La idea de que las memorias atraviesan una etapa de consolidación surgió a partir de un estudio realizado por Muller y Pilzecker (1900) en humanos. Ellos encontraron que la memoria de cierta información A se perdía si otra información B era aprendida luego de haber adquirido la información A. Basados en estos resultados, concluyeron que la traza de memoria se forma gradualmente con el tiempo después de la adquisición y propusieron la hipótesis de preservación o consolidación de las memorias. Ésta sugiere que el proceso que subyace la formación de nuevas memorias persiste inicialmente en un estado lábil que se estabiliza y consolida con el tiempo.

Experimentos posteriores demostraron que la administración de drogas que inhiben la transcripción o la traducción después de un aprendizaje impiden la formación de la MLT (Agranoff, 1965) aunque no de la MCT (Schafe y col, 1999; McGaugh, 2000). Esta evidencia apoya la idea de que la síntesis de nuevos ARNs y proteínas es necesaria para la consolidación de una MLT (Davis y Squire, 1984; Igaz y col, 2002; Rossato y col, 2007) y que luego del aprendizaje de una tarea pueden formarse memorias de corto o largo plazo, pero con requerimientos distintos (Izquierdo y col, 1998).

Al referirse a la fase de consolidación existen dos distinciones. La consolidación sináptica o celular implica procesos que dependen de expresión génica para la formación de una MLT en un circuito neural mientras que la consolidación de sistemas alude a la lenta reorganización post adquisición de circuitos cerebrales para sostener la MLT en forma remota.

Finalmente, para poder recordar, existe un mecanismo que permite recuperar la traza de memoria que se formó: la evocación. Ante la presentación de un estímulo que funciona como recordatorio, la memoria es susceptible de activarse y así guiar el comportamiento (Sara, 2000). En particular, en esta tesis se abordará el estudio de la fase de evocación de la memoria. Es importante resaltar que existen circunstancias en las que la memoria podría ser evocada, produciéndose una activación de la misma, pero sin que la memoria se exprese comportamentalmente, dando lugar a la diferenciación entre evocación y expresión (Delorenzi y col, 2014).

Además, la misma evocación de un recuerdo puede modificar ese recuerdo: una memoria puede ser alterada o transformada cuando es evocada. Luego de la evocación de una memoria, dos fases distintas pueden tener lugar: la extinción, que implica una disminución en la retención de la memoria original, debido a la evocación explícita no reforzada y que en los hechos se trata de un nuevo aprendizaje (Berman y Dudai, 2001; Vianna y col, 2002) y la reconsolidación, que implica una nueva etapa de labilidad de la memoria debida a una evocación explícita de la misma (Misanin y col, 1968; Nader y col, 2000; Sara y col, 2000 ; Debiec y col, 2002; Pedreira y col, 2002) (Ver Fig.1.2).

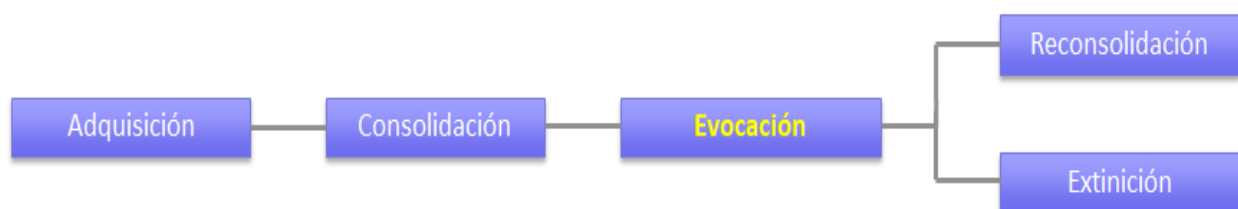


Figura 1.2. Etapas en el procesamiento de la memoria. El aprendizaje tiene lugar durante la etapa inicial de adquisición. Luego, la memoria atraviesa un período de consolidación donde se estabiliza la traza mnésica adquirida. La evocación de la memoria se refiere a la activación de la traza mnésica que codifica para la memoria adquirida y consolidada. La evocación, dependiendo de distintas variables, puede desencadenar al menos dos procesos: la reconsolidación o la extinción.

Existen distintas aproximaciones al estudio de las diferentes etapas de la memoria. Los estudios que utilizan lesiones permanentes o manipulaciones de expresión génica no permiten distinguir sin ambigüedad entre distintas etapas de la memoria. Esto se debe a que, dependiendo del curso temporal de las manipulaciones, más de una etapa de la memoria puede ser afectada. Así, muchas veces resulta difícil discriminar experimentalmente los efectos en los mecanismos moleculares de la codificación de la memoria de aquellos responsables de la evocación. Sin embargo, estos problemas se pueden evitar utilizando abordajes farmacológicos que ofrecen mayor especificidad temporal porque el tratamiento puede ser aplicado en una ventana temporal corta y en un lugar preciso del cerebro (Abel y Lattal, 2001). Por ello, en esta tesis hemos elegido el uso de microinfusiones de drogas en sitios y regiones específicos poco antes de la sesión de testeo (correspondiente con la evocación) que ayudan a dilucidar los requerimientos de la evocación de la memoria.

Evocación

Si volvemos a revisar las definiciones de memoria, nos encontramos con que sólo es posible evaluarla midiendo su evocación (James y col, 1890); se asume que la evocación es función de la memoria, y ésta del aprendizaje. Por tanto, la evocación es una etapa fundamental del procesamiento de la memoria.

Sin embargo, y a pesar de su importancia para abordar cualquier proceso de memoria, ha sido la etapa menos estudiada históricamente. Esto puede deberse en parte a que las amnesias retrógradas, los fenómenos de pérdida de memoria de los eventos que ocurrieron antes de ciertas lesiones o patologías cerebrales, han sido por muchos años atribuidas

exclusivamente a defectos en la consolidación de la memoria (McGaugh 1966; David y Squire 1984; Dudai y Morris, 2000). Esta idea ha ganado sustento gracias a estudios con variaciones sistemáticas entre el intervalo temporal entre la experiencia o el entrenamiento y el daño cerebral que revelaban un gradiente temporal de la amnesia retrógrada. Sin embargo, algunos autores han desafiado esta visión predominante basados en casos de pacientes con gradientes de amnesia largos y uniformes. Así, estos trabajos han postulado que las amnesias retrógradas también pueden reflejar la incapacidad del sistema de memoria para acceder a la traza, es decir, un problema en la evocación de la memoria (Warrington y Weiskrantz, 1968). Posteriormente, otros autores han desarrollado un protocolo con lesiones parciales del hipocampo que les permitió demostrar que algunas fallas en la memoria en la tarea del laberinto acuático se deben, al menos en parte, a problemas de evocación (de Hoz y col, 2004). Además, recientemente ha resurgido en la literatura la idea de que ciertos fenómenos de amnesia, como los observados en estadios tempranos de Alzheimer, pueden ser debidos más a problemas de evocación que a problemas de guardado (Roy y col, 2016). En este contexto, el estudio de la evocación y las vías implicadas en este proceso han adquirido lentamente mayor relevancia.

La evocación se refiere al acceso a la información aprendida inducido por claves sensoriales o internas e implica la reactivación rápida de la memoria que permanece en un estado inactivo (Morris y col, 2003; Eichenbaum, 2004; Frankland y Bontempi, 2005; Tayler y col, 2013). Se desencadena por el restablecimiento total o parcial del CS, US, otros estímulos o recuerdos relacionados y, al menos en los humanos, a menudo por un acto de voluntad. La evocación no es simplemente el resultado (readout) del acceso a la información almacenada, en cambio, representa un proceso activo que puede ser estudiado separadamente de la

adquisición y la consolidación con los cuales comparte mecanismos similares (Davis y Squire, 1984; Kandel, 2001; López y col, 2015). Así, los eventos complejos que subyacen la evocación de la memoria no son estáticos: los datos neurobiológicos indican que los procesos que acceden y activan redes neuronales implicadas en la memoria son dinámicos y pueden resultar en cambios dramáticos en la información almacenada (Nader, 2003).

Tradicionalmente, se ha considerado que la evocación depende del hipocampo (Eldridge y col, 2000; Corcoran y Maren, 2001; Anderson y col, 2004). Sin embargo, se ha demostrado que la expresión de la memoria para una tarea tan simple como la EI de un solo entrenamiento requiere la intervención simultánea de varias regiones del cerebro, incluido el hipocampo, las cortezas entorrinal, posterior parietal y cingulada anterior, y la amígdala basolateral (Barros y col, 2003). En el hipocampo, así como en todas las áreas corticales examinadas, el funcionamiento de los sistemas de señalización PKA y ERK y la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) son necesarios para la recuperación de la memoria (Barros y col, 2000; Barros y col, 2003; Izquierdo y col, 2001). Los mGluR son necesarios junto con los receptores AMPA en el hipocampo y la corteza entorrinal, y también son necesarios los receptores NMDA en la corteza cingulada parietal y anterior y en la corteza retrosplenial en la evocación (Barros y col, 2000; Corcoran y col, 2011). En la amígdala, existen trabajos que señalan la necesidad de receptores AMPA, pero no de receptores mGluR o NMDA ni de las vías de señalización de PKA o ERK para la expresión de la memoria (Barros y col, 2000; Izquierdo y col, 2001). Esto sugiere que la amígdala juega un papel modulador en la evocación, pero no participa en los procesos que gatillan la evocación en particular (Dominique y col, 2000; Roozendaal, 2002).

Sabemos, por nuestra experiencia cotidiana, que la evocación de la memoria está influenciada por diversos factores, muchos de ellos emocionales, entre los cuales podemos mencionar el estado de ánimo y situaciones de estrés. Todos hemos asistido a presentaciones en las cuales el orador se paraliza o tiene “un blanco” en medio de la exposición, de la misma manera que vemos estudiantes que se “bloquean” en los exámenes a pesar de haber estudiado mucho.

Para formalizar estas “percepciones” de la vida cotidiana, se puede mencionar que existen al menos tres vías de modulación de la evocación. Una comprende los sistemas noradrenérgicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos y colinérgicos del cerebro que participan en la respuesta al estrés, la ansiedad, el miedo o aversión, así como en la regulación del estado de ánimo. Por ejemplo, en el hipocampo, corteza entorrinal, corteza parietal posterior y corteza cingulada anterior, tanto los receptores β -noradrenérgicos, los colinérgicos, los dopaminérgicos tipo D1 y muscarínicos facilitan, mientras que los de serotonina tipo 1A dificultan la evocación (Barros y col, 2001). Un segundo tipo de mecanismos involucrado en la regulación de la evocación está relacionado con las hormonas. Por ejemplo, se ha descrito que la acción de los glucocorticoides en la amígdala inhibe la evocación (Roosendaal y col, 2002) mientras que la adrenalina, vasopresina, B-endorfinas y adrenocorticotropina (ACTH) en dosis bajas han sido reportadas como moduladores positivos de la evocación (Barros y col, 2002). Por último, la tercera vía de modulación conocida es otra información añadida durante el momento de evocación. Se ha estudiado la influencia de la novedad, exponiendo a los animales a un nuevo contexto o a un nuevo estímulo entre 0 y 180 minutos previos al testeo y se ha observado que mejora la retención de la memoria en una tarea de El de un solo

entrenamiento y en otras tareas (Izquierdo y col, 2001; Izquierdo y col, 2003 y Barros y col, 2003).

La evocación es un proceso extremadamente rápido en el cual la traza de memoria inactiva se reactiva en segundos. Por eso, no se espera que ocurra ningún cambio particular en vías de señalización como PKA, PKC o ERK que requiera mucho tiempo de activación un tiempo antes o al momento de la evocación. Muchos de estos cambios se han reportado en el hipocampo de rata (Szapiro y col, 2000; Szapiro y col, 2002) y si bien están relacionados y/o gatillados por la evocación no pueden atribuirse a la evocación *per se* ya que se registran una vez que la evocación finalizó. Algunos de estos cambios incluyen cambios en PKA, PKC, ERK, CamKII (Szapiro y col, 2000; Szapiro y col, 2002). Una de las visiones más aceptadas es que estas enzimas influyen el estado de fosforilación de distintos receptores glutamatérgicos involucrados en la transmisión sináptica (Micheau y Riedel, 1999; Riedel y col, 2003). Dado que la reactivación de la traza durante la evocación es casi instantánea, es lógico pensar, entonces, que dependa del mantenimiento de la actividad transitoria de ciertas vías de señalización más que en activaciones de las mismas inducidas por estímulos, por más rápidas que sean.

Uno de los dogmas principales de la neurobiología de la memoria indica que la formación y/o consolidación de la MLT requiere de síntesis proteica, pero que su expresión no la necesita. Este dogma se basa en parte en la escasa información existente sobre los requerimientos moleculares de la evocación, que en consecuencia la describieron históricamente como una etapa pasiva que era el mero resultado de la recolección de información almacenada. Los experimentos preliminares que disponíamos en el laboratorio que han servido para comenzar esta tesis iban en contra de ese dogma e indicaban que la

evocación de la memoria requiere de síntesis proteica. Además, y teniendo en cuenta antecedentes de nuestro laboratorio que indican que la señalización de mTORC1 en el hipocampo juega un rol importante en la consolidación de memorias de largo término en la tarea de EI, propusimos como hipótesis de trabajo que la evocación de una memoria de largo término requiere de síntesis proteica mediada por la vía de mTORC1.

mTORC1

La “proteína blanco de rapamicina en mamíferos/mecanística” (mTOR) es una proteína quinasa serina/treonina multifuncional y altamente conservada que, en los últimos años, ha sido reconocida como un integrador crítico de la señalización celular; tanto es así que la nomenclatura TOR original de "mamíferos" ha cambiado a TOR "mecanística" (Graber y col, 2013). mTOR dirige el crecimiento general de todas las células del organismo principalmente a través de la homeostasis proteica, controlando tanto la síntesis de proteínas a través de la regulación de la traducción del ARNm como la degradación de las proteínas a través de la regulación de la autofagia. Además, mTOR es capaz de sensar una gran cantidad de señales extracelulares, como oxígeno, estrés, estado de energía o disponibilidad de aminoácidos (Laplante y Sabatini, 2012). En las neuronas mTOR está presente en la región sináptica (ver Figura I.3) donde modula la síntesis de proteínas localmente traducidas, es regulada río arriba de manera actividad dependiente y es crítica para diferentes formas de plasticidad sináptica, incluida LTP (Tang y col, 2002).

mTOR se asocia en dos complejos multiproteicos distintos, mTORC1 y mTORC2 para controlar el crecimiento celular, la proliferación y migración (Saxton y Sabatini, 2017). Tanto los sustratos de mTOR como los procesos celulares posteriores que afecta son diferentes

dependiendo de su asociación como mTORC1 o mTORC2 (Wullschleger y col, 2006). Bioquímicamente, mTORC1 y mTORC2 se distinguen por su composición proteica. Ambos complejos tienen en común a mLST8 (proteína letal en mamíferos) y DEPTOR (proteína de interacción con mTOR con dominio DEP1), ésta última es un inhibidor de mTOR. Ambos complejos tienen una proteína característica esencial para el ensamblaje de todo el complejo (Raptor para mTORC1 y Rictor para mTORC2) e interacciones específicas con otras proteínas reguladoras. En cuanto a su función, resumidamente mTORC1 está involucrado principalmente en la regulación del inicio de la traducción “cap”-dependiente (“cap” se refiere al nucleótido guanina del extremo 5’ del ARNm modificado que le confiere estabilidad y ayuda a que madure el ARNm), mientras que mTORC2 está implicado en modificaciones estructurales como rearrreglos del citoesqueleto (Jacinto y Hall, 2003; Hay y Sonenberg, 2004). En particular, en esta tesis, abordaremos el estudio de mTORC1.

mTORC1 juega un rol central en el crecimiento celular regulando la síntesis proteica, así como también el metabolismo de lípidos, nucleótidos y glucosa (Saxton y Sabatini 2017). El rol de mTORC1 en el SNC es muy variado: desde el control de crecimiento, síntesis proteica, expresión génica, balance metabólico hasta aprendizaje y memoria (Lipton y Sahin 2014). En neuronas, mTORC1 regula la síntesis proteica durante los procesos de memoria y plasticidad sináptica de larga duración (Costa-Mattioli y col, 2009; Ran y col, 2009).

Una vez activado, mTORC1 fosforila y activa a p70S6K (quinasa de S6 de 70 kDa) en treonina 308. A su vez, p70S6K fosforila directamente a la proteína 40S ribosomal S6 en las serinas 235 y 236, activando tanto la iniciación como la elongación del proceso de traducción y el crecimiento celular. Por otro lado, mTORC1 inactiva por fosforilación a 4E-BP (proteína de unión al factor eucariótico de iniciación). Existen tres isoformas de 4E-BPs, pero la más

predominante en el cerebro de mamíferos es la 4E-BP2 (Banko y col, 2005), como se esquematiza en la Figura 1.3. 4E-BP2 en su estado no fosforilado, inhibe la traducción del ARNm dependiente de “cap” mediante su unión con el factor eucariótico de iniciación a la traducción eIF-4E. La fosforilación de 4E-BP2 (por parte de mTORC1) libera a eIF-4E para restablecer la traducción dependiente de “cap”, que es particularmente importante para la traducción de ARNm con 5’UTRs altamente estructurados (Hara y col, 1997).

Una de las características fundamentales que diferencian a los complejos de mTOR es su dispar sensibilidad al compuesto que, paradójicamente, les da nombre; la rapamicina. Mientras que mTORC1 es inhibido por rapamicina, mTORC2 es rapamicina-insensible. Cabe destacar que en ciertas líneas celulares se ha observado inhibición de mTORC2 tras tratamiento prolongado con rapamicina (Sarbasov, 2006).

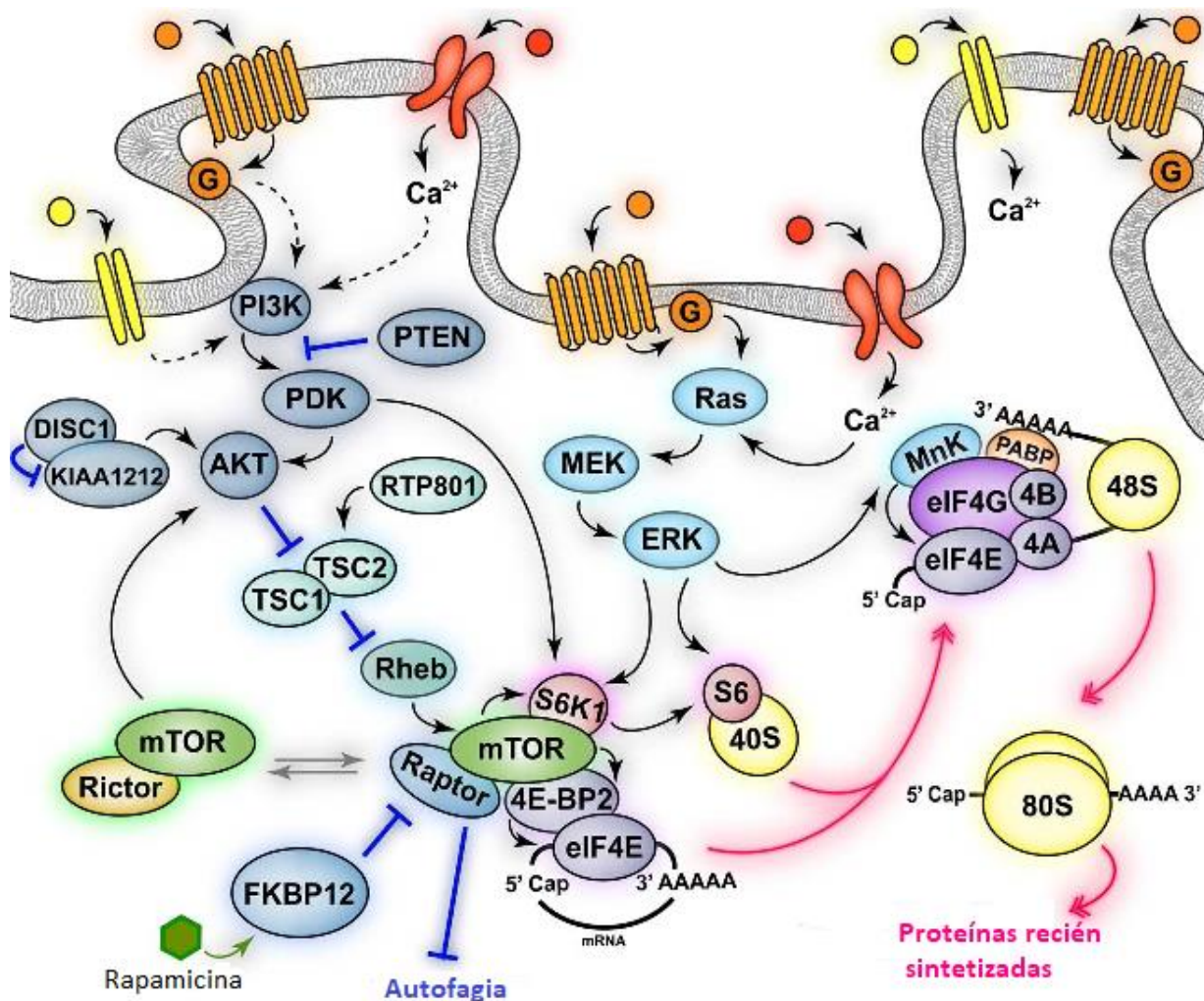


Figura I.3. Vías de señalización de mTORC1. La activación de receptores y canales neuronales conduce a la activación del complejo mTORC1. La activación de mTORC1 gatilla algunos procesos neuronales como la síntesis proteica mientras inhibe otros como la autofagia. mTORC1 regula la actividad de efectores río abajo implicados en la traducción como S6K1 y 4EB-P2. La fosforilación de 4E-BP2 dependiente de mTORC1 da como resultado la asociación de eIF4E con eIF4G y la formación del complejo eIF4F activo (eIF4E-eIF4A-eIF4G). eIF4F recluta eIF4B y a Mnk promoviendo así la unión de los ARNms al complejo de pre-iniciación 43S para formar el complejo de iniciación 48S. El complejo eIF4F y la cola poliA (la adición de la cola poliA es un proceso que ocurre cuando finaliza la síntesis del ARNm maduro) actúan de manera sinérgica junto con la fosforilación de eIF4F dependiente de Mnk para estimular el inicio de la traducción cap-dependiente. Las vías de señalización que activan a mTORC2 y sus efectores río abajo así como sus funciones fisiológicas son desconocidas. Las flechas negras indican activación/fosforilación directa, las flechas rosas dobles indican asociación/disociación y las líneas azules indican inhibición. Adaptado de Santini y Klann, 2011.

Rapamicina

La rapamicina fue el primer inhibidor de mTOR en ser desarrollado, y fue aislado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* en la isla Rapa Nui en 1965 por una expedición científica canadiense. La rapamicina se une a mTOR únicamente cuando ésta está unido a componentes del complejo mTORC1. Por esta razón, la rapamicina es un inhibidor alostérico específico de mTORC1 (Chiarini y col, 2015). Sin embargo, exposiciones prolongadas o altas concentraciones de rapamicina pueden resultar inhibitorias de mTORC2 (Sarbasov y col, 2006; Efeyan y Sabatini 2010). En la actualidad, la rapamicina está siendo estudiada en ensayos clínicos como potencial tratamiento para algunos tipos de cáncer (en particular para cáncer de riñón y algunos tipos de cáncer de mama, aunque, en líneas generales, alrededor de 60% de los tumores malignos tienen su origen en problemas de la señalización de mTOR), es ampliamente utilizada en cardiología (para prevenir restenosis vascular o reducción del vaso sanguíneo cuando se coloca un stent) y en trasplantes de órganos (por sus efectos inmunosupresores, para prevenir reacciones inmunes en órganos transplantados) (Sarbasov y col, 2006). Además, la rapamicina está siendo extensamente evaluada por sus posibles usos en patologías asociadas al envejecimiento y para “retrasar” el mismo (Harrison y col, 2009; Cao y col, 2011; Liu y Sabatini, 2020).

Plasticidad sináptica y memoria

La noción de que la memoria se almacena a través de cambios duraderos en el cerebro no es nueva: data de los tiempos de Platón y Aristóteles. Sin embargo, su postulación a nivel científico se remonta al siglo XX cuando Semon introdujo el concepto de engrama como

sustrato neuronal para almacenar y evocar las memorias. Semon propuso que un evento vivenciado por un organismo activa una población neuronal específica que experimenta cambios químicos y/o físicos persistentes hasta convertirse en un engrama. Reactivaciones posteriores del engrama por claves presentes en el momento en que se codificó la experiencia inducen la evocación. Por más que hoy se utilice ampliamente el término engrama la relación causal entre los cambios duraderos a nivel de engramas y cambios identificables a nivel comportamental relacionados con procesos de memoria no está aún hoy validada (Josselyn y Tonegawa, 2020).

Actualmente, sí se considera y acepta que la dinámica de las conexiones entre neuronas combinada con alteraciones estructurales y funcionales mediadas por procesos de plasticidad proveen los sustratos moleculares del aprendizaje y la memoria (Bazzari y col, 2019). Esta idea se corresponde con la hipótesis de plasticidad sináptica y memoria que fuera postulada en 2002 por Morris y Martin según la cual “la plasticidad sináptica dependiente de actividad es inducida en ciertas sinapsis durante la formación de la memoria y es necesaria y suficiente para el almacenamiento de la información que subyace al tipo de memoria mediada por la región del cerebro donde la plasticidad se observa”.

En todas estas definiciones, se nombran los términos “plasticidad” y “procesos de plasticidad” que refieren a los fenómenos de potenciación de largo término (LTP) y a la depresión de largo término (LTD). El fenómeno de LTP fue descubierto utilizando breves estimulaciones de alta frecuencia que inducían aumentos duraderos en la eficacia sináptica (Bliss y Lomo, 1973). Estos hallazgos se encontraban en consistencia con los postulados de Hebb de 1949 que señalaban que tanto un aumento en la fuerza sináptica como en la conectividad neuronal eran necesarios para la formación de la memoria. Por otra parte, se ha

descrito que la fuerza de la sinapsis puede a su vez ser modulada negativamente en el hipocampo mediante patrones de estímulo que generan una LTD (Martin y Morris, 2002) proveyendo un mecanismo para evitar que las sinapsis se saturen lo cual es adecuado para el funcionamiento de las redes neuronales. Hoy se sabe que las modificaciones dependientes de la experiencia implicadas en la formación de la memoria comparten muchos mecanismos moleculares con procesos de plasticidad sináptica dependientes de la actividad como el LTP y LTD (Martin y Morris, 2002; Izquierdo y col, 2006).

La información se codifica y almacena en el cerebro a nivel de sinapsis individuales que representan la “unidad celular de las memorias” (Hoeffler y Klann, 2010). Las sinapsis se definen como “plásticas” en el sentido de que su eficacia fisiológica (la fuerza sináptica) cambia y dura más allá de los eventos que la desencadenan. Estos cambios persistentes y dependientes de la actividad sináptica son provocados por la síntesis *de novo* de proteínas (Klann y Sweatt, 2008).

En las últimas dos décadas, distintos estudios con enfoques farmacológicos, bioquímicos y genéticos han demostrado que se requiere un control preciso de la traducción proteica para los procesos de plasticidad sináptica de largo término y formación de memorias de largo término. Además, estudios más recientes indican que las alteraciones en el control de la traducción constituyen una característica fisiopatológica común de múltiples trastornos neurológicos humanos, incluidos trastornos del desarrollo, desórdenes psiquiátricos y enfermedades neurodegenerativas (Buffington y col, 2014). Finalmente, los mecanismos de control de la traducción son susceptibles a modificación por drogas psicoactivas. Estos hallazgos apuntan a un rol central del control de la traducción en la regulación de la función sináptica y del comportamiento (Santini y Klann, 2011).

La síntesis proteica se regula por distintos factores, entre ellos por la actividad de proteínas quinasas, enzimas que transfieren grupos fosfato a las cadenas laterales de aminoácidos particulares (serina/treonina o tirosina) de proteínas blanco. Además, los procesos de plasticidad en general requieren la actividad de quinasas. La fosforilación en uno o más sitios se cree que altera la conformación de proteínas blanco que impactan en el funcionamiento o interacción con otras proteínas. Este es un proceso reversible que permite una señalización flexible (Giese y Mizuno, 2013). En esta tesis nos propusimos estudiar el rol en la evocación de una quinasa particular, mTOR (en particular, cuando se haya asociada en el complejo mTORC1), su función reguladora de la síntesis proteica *de novo* y sus implicancias en procesos de plasticidad asociados a memoria.

Debido al vínculo entre mTOR, la síntesis de proteínas, y plasticidad sináptica a largo plazo, varios estudios han analizado y demostrado la necesidad de la función intacta de mTOR en procesos de LTD y LTP (Huang y col, 2013; Stoica y col, 2011; Tang y col, 2002). A nivel molecular, la señalización de mTOR y sus blancos río abajo son conocidos por regular la expresión de los receptores AMPA y el número de sinapsis (Ran y col, 2013; Wang y col, 2006).

Receptores AMPA

Una variedad de factores pre y postsinápticos puede modular la fuerza sináptica, pero está muy aceptado que la plasticidad sináptica se expresa predominantemente a través de cambios en el número, localización y propiedades de receptores postsinápticos (Henley y Wilkinson, 2013).

El neurotransmisor más prevalente en el cerebro es el glutamato que mayoritariamente activa receptores de glutamato tipo AMPA (AMPA). Los AMPAR consisten en cuatro

subunidades homólogas que forman el poro (GluA1-4) que en general se ensamblan en heterómeros. La presencia de GluA2 es de importancia funcional porque le confiere impermeabilidad al calcio al canal AMPAR (Isaac y col, 2007). En el área CA1 del hipocampo, los heterómeros GluA1/GluA2 y los GluA2/GluA3 representan aproximadamente el 80 y 20% respectivamente de la respuesta postsináptica en condiciones basales (Buonarati y col, 2019).

Los AMPAR son sintetizados en el retículo endoplasmático donde las subunidades se ensamblan en su gran mayoría en heterómeros (formados por dímeros de dímeros). El ensamblaje del dímero inicial es llevado por los dominios N-terminales que tienen mayor afinidad por otros dominios N-terminales de otras subunidades que por las de la misma subunidad (Rossmann, 2011). Por ejemplo, el dominio N-terminal de la subunidad GluA1 tiene más de 100 veces mayor afinidad por el dominio N-terminal de la subunidad GluA2 que por otro dominio N-terminal de GluA1 en un sistema de expresión heteróloga, dando lugar predominantemente a receptores heteroméricos.

La plasticidad de la transmisión sináptica excitatoria está mediada en gran parte por los cambios en el contenido de AMPAR en la membrana plasmática postsináptica (Kerchner y Nicoll, 2008). Los AMPAR no se encuentran estáticos en la densidad postsináptica (PSD) sino que están constantemente siendo intercambiados a través del tráfico (trafficking) entre la PSD, la membrana extrasináptica (SPM) y los compartimentos intracelulares (Fig. 1.4). La expresión dinámica de los AMPAR en la membrana postsináptica está relacionada con la inducción y mantenimiento de LTP y LTD y a su vez está involucrada en la regulación de procesos de plasticidad sináptica y aprendizaje y memoria (Choquet, 2018; Henley y Wilkinson, 2016). La fuerza sináptica, relacionada con el número y organización de AMPAR en la PSD resulta de un equilibrio dinámico entre los AMPAR en sub-compartimentos y su

estabilización reversible en la PSD por interacciones con elementos de andamiaje. La distribución sináptica de los receptores AMPA involucra el tráfico intracelular, la inserción a la membrana plasmática por exocitosis y la difusión lateral (Zhang y col, 2018). En particular, la difusión lateral es crucial para mantener una población móvil de AMPAR de membrana que pueden ser llevados a la sinapsis y ser reclutados por incrementos en la fuerza sináptica ante el estímulo apropiado (Petrini y col, 2009).

Como ya hemos señalado, dado que los AMPAR facilitan la mayor parte de la neurotransmisión excitadora rápida en el cerebro, los cambios en su abundancia en las sinapsis pueden fortalecer o debilitar significativamente la transmisión sináptica (Malinow y Malenka, 2002). Se piensa que la plasticidad sináptica a largo plazo es un correlato molecular y celular del aprendizaje y la memoria al desempeñar un papel crítico en la regulación de circuitos neuronales que codifican recuerdos o comportamientos que dependen de la experiencia (Mayford y col, 2012; Takeuchi y col, 2013). En particular, las primeras evidencias del rol de los AMPAR en la evocación de la memoria fueron aportadas por nuestro grupo y el de Davis en memorias aversivas (Bianchin y col, 1993; Kim y col, 1993). Ambos trabajos dan cuenta del papel de AMPAR en evocación tanto en el hipocampo como en la amígdala. Años más tarde, el grupo de Morris ha señalado el papel de AMPAR en evocación en una tarea espacial (Riedel y col, 1999).

En esta tesis nos centramos en estudiar el rol de la vía de mTORC1 y la regulación que ejerce sobre la síntesis proteica local durante la evocación de la memoria de largo término, con particular énfasis en la potencial relación de la vía de mTORC1 y la síntesis de distintas subunidades del receptor AMPA durante la evocación.

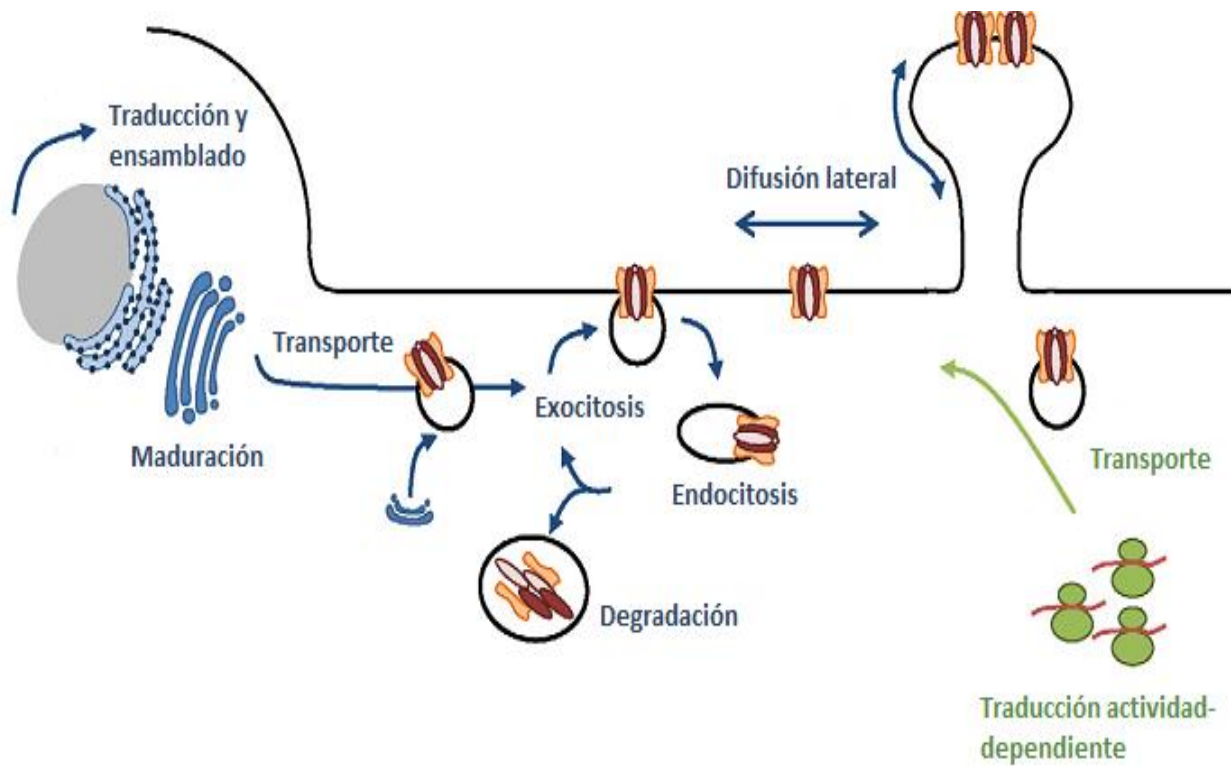


Figura I.4. Mecanismos generales implicados en el ciclo de receptores AMPA. La densidad de los receptores AMPA en membrana se establece mediante un equilibrio dinámico entre la síntesis (local y no local), transporte a membrana, endocitosis, reciclaje endosómico y degradación. Adaptado de Czöndör y Thoumine, 2013.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Se propone como hipótesis de trabajo que la evocación de una memoria de largo término requiere de síntesis proteica local, mediada por la vía de mTORC1.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es estudiar el rol de la vía de mTORC1 en la evocación de la memoria.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Estudiar el rol de la síntesis proteica controlada por mTORC1 en la expresión de la MLT en el hipocampo dorsal de la rata.
- 2) Evaluar las características y limitaciones de la amnesia inducida por el bloqueo de la vía de mTORC1.
- 3) Estudiar el curso temporal de acción de la rapamicina, inhibidor selectivo de la vía de mTORC1, sobre la fase de evocación de la memoria.
- 4) Evaluar si el fenómeno de bloqueo de la expresión por inhibición de la vía de mTORC1 depende de la edad de la memoria a ser evocada.
- 5) Determinar si el efecto de la rapamicina se puede observar en otras estructuras involucradas en la evocación.
- 6) Analizar si el fenómeno de bloqueo de la expresión de la memoria por inhibición de la

vía de mTORC1 es particular de las memorias aversivas o se puede generalizar a otras experiencias como memorias espaciales.

- 7) Determinar en particular el rol de la síntesis *de novo* de distintas subunidades del receptor AMPA en la evocación de MLT.
- 8) Estudiar la posible relación entre la vía de mTORC1 y la dinámica de los receptores AMPA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos experimentales

Para todos los experimentos se utilizaron ratas Wistar macho (2-3 meses de edad, peso aproximado 200-230 g al inicio de los experimentos) criadas en el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron mantenidos en grupos de a 3 por jaulas, con agua y comida *ad libitum*, bajo un ciclo luz/oscuridad de 12 horas (encendiéndose la luz a las 7:00 am) a una temperatura constante de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Tres días previos al experimento los animales fueron manipulados (handling) durante 2 minutos cada día para disminuir el estrés. Para los distintos experimentos todos los grupos experimentales se encontraban representados en cada una de las jaulas. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a las normas internacionales establecidas por la "Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio" (CICUAL), tomando los recaudos necesarios para reducir al mínimo el número de animales utilizados en cada experimento.

Cirugía

Los animales utilizados para los experimentos farmacológicos con infusión intracerebral de drogas fueron sometidos a una cirugía para la implantación bilateral de cánulas guía de calibre de 0,7 mm (22G) de 1 cm de longitud. Para el procedimiento quirúrgico las ratas fueron anestesiadas con una combinación de 80 mg/kg de ketamina (Holliday) y 5 mg/kg de xilacina (Konig) intraperitoneal (i.p.) y colocadas luego en un marco estereotáxico (Figura M.1). Se expuso el cráneo y se procedió a nivelarlo (puntos lambda y bregma a la misma altura en el

eje dorsoventral). Las cánulas fueron implantadas bilateralmente (Figura M.1) en la región CA1 del hipocampo dorsal utilizando las siguientes coordenadas estereotáxicas (con respecto a bregma): anteroposterior (AP): -3,9 mm, lateral (LL): $\pm 3,0$ mm y dorsoventral (DV): -3,0 mm (Paxinos y Watson, 1997) (Figura M.3, izquierda). Para los experimentos que se especifican, las cánulas fueron implantadas sobre la región anterior de la corteza retrosplenial utilizando las coordenadas estereotáxicas (con respecto a bregma): AP: -3,9 mm, LL: $\pm 0,5$ mm y DV: -1,8 mm (Figura M.3, derecha). Las cánulas fueron fijadas al cráneo con acrílico dental (Figura M.1) y para evitar la obstrucción, se colocaron obturadores (agujas con calibre de 0,3 mm (30G) cortadas para quedar del mismo tamaño que las cánulas guía y con un extremo que sobresaliera para facilitar su posterior remoción) dentro de cada cánula que permanecieron allí hasta el momento de las infusiones. Para los experimentos donde la memoria se testeó a 28 días, se agregaron dos tornillos para darle más estabilidad al casco. Terminado el procedimiento quirúrgico se les administró a los animales una dosis del analgésico Meloxicam (0,2 mg/kg) y de antibiótico Gentamicina (3 mg/kg) de forma subcutánea. Los animales permanecieron en sus jaulas para su recuperación post-operatoria al menos durante 5 días, antes de comenzar con los experimentos conductuales.

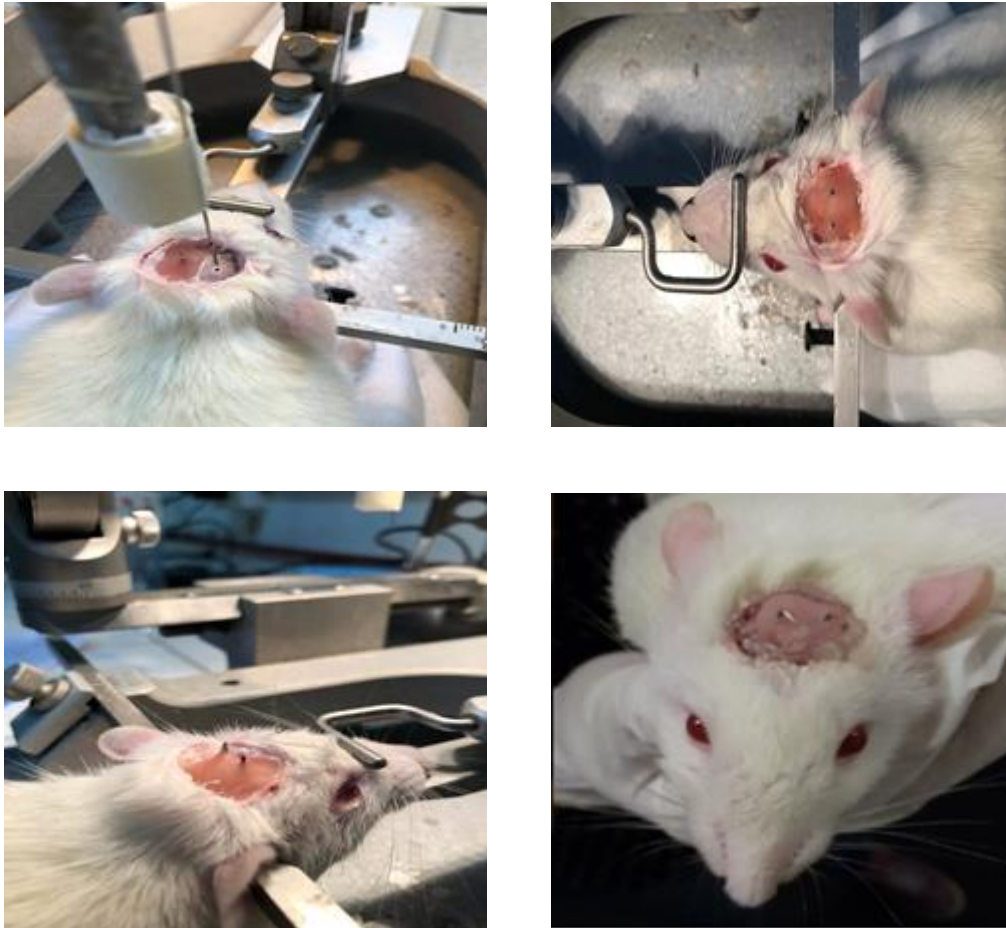


Figura M.1. Cirugía de implantación de cánulas guía. Las cánulas fueron implantadas en la región CA1 del hipocampo dorsal según las coordenadas AP: -3,90 mm, LL: \pm 3,00 mm y DV: -3,00 mm dorsoventral. En las fotografías se muestra el procedimiento de implantación de las cánulas y el casco terminado del animal luego de la cirugía.

Infusión de drogas

Las drogas fueron administradas mediante una cánula de infusión (1,1 cm de longitud y 0,3 mm de calibre (30G)), la cual se insertó en la cánula guía y cuya punta sobresalía 1 mm de la cánula guía (Figura M.2). Las agujas de infusión fueron conectadas mediante una manguera de polietileno de 0,015" a una microjeringa Hamilton para infundir los volúmenes correspondientes de cada droga. La manipulación durante la inyección fue realizada

delicadamente para disminuir el estrés de los animales. El procedimiento de microinfusión tomó aproximadamente 3 minutos: 1 minuto y medio por lado para permitir la infusión gradual de la droga y dejar la aguja un tiempo residual para permitir la correcta difusión y evitar el reflujo.



Figura M.2. Infusión de drogas durante los experimentos. Durante la realización de los experimentos se administraron drogas insertando la aguja de infusión, la cual estaba conectada a la microjeringa Hamilton, en cada cánula.

Drogas

Se utilizó Rapamicina (Rapa, Sigma Aldrich), un inhibidor selectivo de mTORC1, en una concentración de 120 nM/ μ l que fue disuelta en DMSO 0,012%. Se infundieron 0,5 μ l por lado en el Hp y en la RSC. Como control se utilizó solución fisiológica (vehículo).

Se utilizó Emetina (Eme 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ /lado, Sigma Aldrich), un inhibidor general de la síntesis proteica que fue disuelto en solución fisiológica. Se infundió 1 μl por lado en el Hp. Como control se utilizó solución fisiológica.

Los oligonucleótidos (Genbiotech S.R.L, Buenos Aires, Argentina) utilizados consistieron en secuencias que estaban fosforotiodadas en las tres primeras y últimas bases (“end-capped”). Esta modificación fue utilizada porque incrementa la estabilidad y disminuye la toxicidad de los compuestos. Se utilizaron oligonucleótidos antisentido (ASO) para GluA1 (GluA1 ASO, secuencia: 5'-TAAGCATCACGTAAGGATC-3'), basándonos en el trabajo previo del laboratorio (Slipczuk y col, 2009) y ASO para GluA2 (GluA2 ASO, secuencia: 5'-AACCATTTTATCCACTTCACT-3') basándonos en diversos trabajos (Wenthold y col, 1992; Friedman y Veliskova, 1999; Oguro y col, 1999). Como controles, se utilizaron los respectivos oligonucleótidos sin sentido (MSO) para GluA1 (GluA1 MSO, secuencia: 5'-AGCGTATCACAGTATAGAC-3') y MSO para GluA2 (GluA2 MSO, secuencia: 5'-CTAACCTCCAATCTTATTCTA-3'). Tanto los ASO como los MSO para GluA1 y GluA2 se infundieron en una concentración de 2nmol/ μl , con un volumen de 1 μl por lado en el hipocampo.

Se utilizó GluR23 γ (Tat-GluR32 γ , secuencia de extremo N-terminal a C-terminal: H-YGR KKR RQR KEG YNV YG-OH, Eurogentec, Anaspec), un péptido que bloquea selectivamente la endocitosis de los receptores AMPA que contienen la subunidad GluA2 (Brebner y col, 2005; Fox y col, 2007; Van den Oever, 2008; López y col, 2015; Migues y col, 2016) en una concentración de 15 pmol/ μl disuelto en solución fisiológica. Se infundió 1 μl por lado en el hipocampo. Como control se utilizó solución fisiológica.

Corroboración de la correcta localización de las cánulas

Una vez finalizados los experimentos fármaco-conductuales se infundió de 1 μ l por lado de una solución de azul de metileno 4% disuelto en solución fisiológica. Los animales fueron decapitados 15 minutos después. Se analizó la localización de las cánulas mediante examinación histológica. Solo se utilizaron datos de animales cuyas cánulas se encontraran correctamente implantadas (ver Figura M.3, donde se detalla el sitio de infusión correcto aproximado para cada estructura).

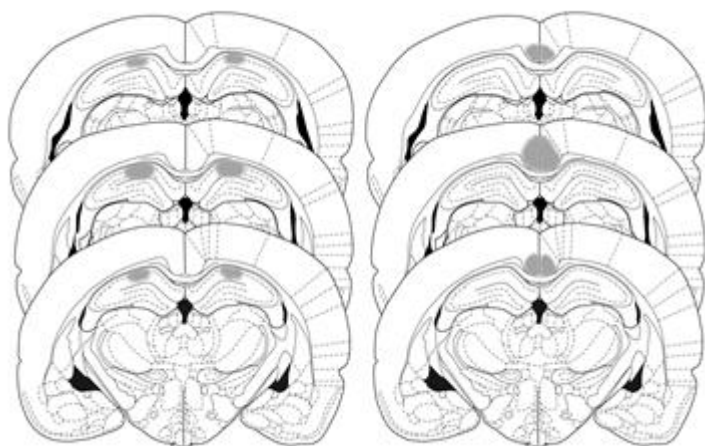


Figura M.3. Representación esquemática de sitios de infusión de las drogas. Se representan tres planos coronales (-3,80 mm, -4,30 mm y -4.80 mm del bregma). En gris sombreado se representa el área aproximada de difusión en el hipocampo (izquierda) o en la corteza retrosplenial (derecha). Adaptado de (Paxinos y Watson, 2007).

Procedimientos conductuales

Tarea de evitación inhibitoria

La memoria de evitación inhibitoria (EI) representa la capacidad de aprender sobre el ambiente e inhibir el comportamiento innato de exploración por la llegada de estímulos aversivos. En este paradigma las ratas se colocan sobre una pequeña plataforma dentro de una caja y cuando descienden para explorar el ambiente reciben un shock eléctrico; de este modo cuando son colocadas nuevamente en la plataforma, inhibirán el comportamiento de descenso, eludiendo así la llegada del estímulo negativo (Izquierdo y col, 1997; Giovaninni, 2015). Se eligió esta tarea porque es adquirida en una sola sesión corta de entrenamiento que la hace ideal para investigar los mecanismos de evocación sin interferencia de expresión previa de comportamientos aprendidos que ocurren en tareas con múltiples sesiones de entrenamiento.

Caja de evitación inhibitoria

La caja de evitación inhibitoria tiene paredes de metal y acrílico de 62,4 cm de largo x 25,4 cm de ancho x 32,8 cm de alto y el techo es un panel móvil de acrílico (Figura M.4). El piso consta de dos grillas desmontables hechas de barras de acero inoxidable paralelas de 0,5 cm de diámetro, separadas por 1,5 cm entre sí. Las paredes frontales son de acrílico transparente con un grosor de 0,5 cm. En el extremo izquierdo de la caja hay una plataforma de acrílico de 23,8 cm de largo x 9,5 cm de ancho x 5 cm de alto.

Entrenamiento y testeo

Para el entrenamiento (TR) en la tarea de El las ratas se colocaron sobre la plataforma elevada e inmediatamente después de bajar de la misma, los animales recibieron una descarga de 0,55 mA en las patas durante 3 segundos. Este entrenamiento genera una memoria de largo término (MLT) perdurable (Bekinschtein y col, 2007). En la sesión de testeo (TS) el procedimiento fue similar, excepto que la descarga eléctrica fue omitida. En el TS, se consideró que las ratas bajaban de la plataforma sólo cuando apoyaban las cuatro patas sobre la grilla. Tanto en el TR como en el TS se cuantificó la latencia de las ratas a descender de la plataforma y se consideró que los animales habían aprendido la tarea cuando la latencia a descender de la plataforma en el TS fue significativamente diferente a la latencia durante el TR. Eso es interpretado como una evitación del animal a descender, eludiendo así la llegada del estímulo aversivo, e inhibiendo por lo tanto un comportamiento exploratorio innato de esta especie en un ambiente novedoso.

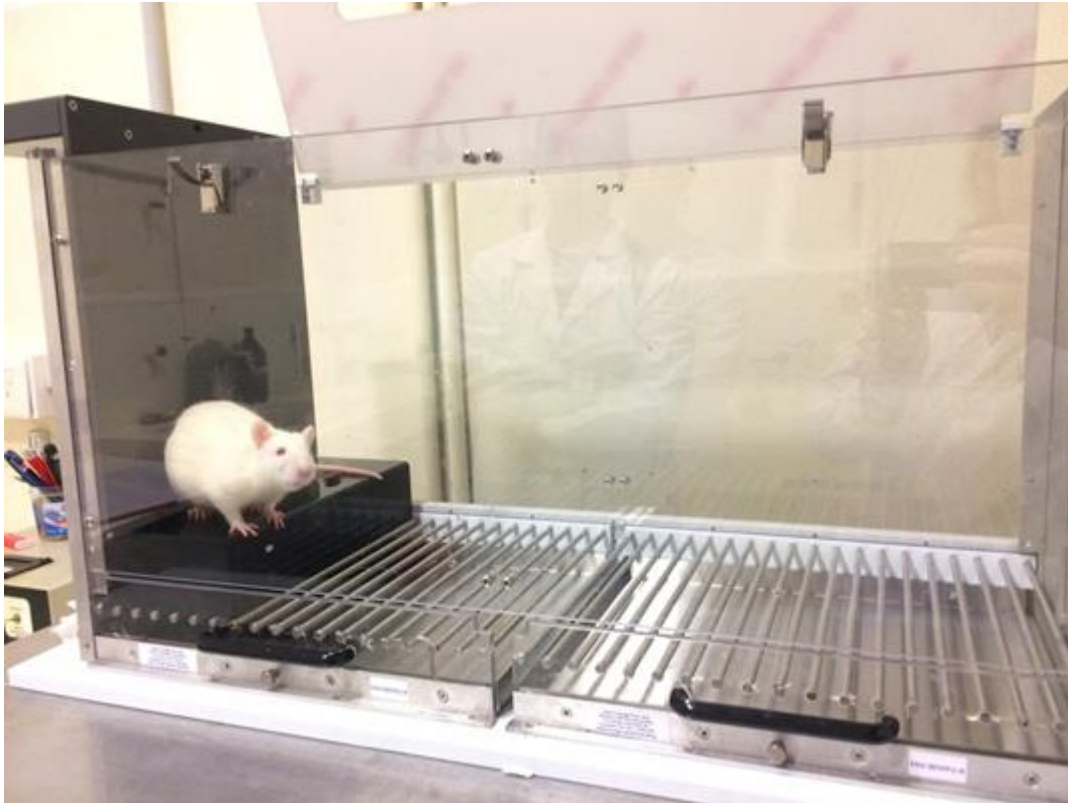


Figura M.4. Caja utilizada en el paradigma de evitación inhibitoria. Se observa una rata sobre la plataforma elevada negra situada en el extremo izquierdo de la caja, por encima de la grilla de varillas que conforman el suelo.

Tarea de Reconocimiento espacial de objetos

En la tarea de reconocimiento espacial de objetos (REO) se evalúa la habilidad de aprender y detectar el desplazamiento de un objeto familiar a una ubicación novedosa dentro de un contexto. Este paradigma se basa en la conducta espontánea de los roedores de explorar objetos y contextos novedosos cuando estos no parecen ser peligrosos. Si a una rata se le presentan objetos conocidos en una posición familiar (ya explorada) o novedosa (no utilizada anteriormente), pasará más tiempo explorando el objeto desplazado (nueva posición) en relación con aquel que nunca se movió (Dere y col, 2005).

Caja de reconocimiento espacial de objetos

Para el desarrollo de estos experimentos se utilizó una caja en la cual se presentaron a los roedores objetos modificándose durante la sesión de testeo la localización de uno solo de ellos.

La caja utilizada es de acrílico, con 60 cm de largo x 40 cm de profundidad x 50 cm de altura (Figura M.5). La caja tiene una pared frontal transparente mientras que la pared trasera es rayada con líneas blancas y negras y las paredes laterales blancas y con diferentes claves visuales. La habitación donde tuvo lugar el protocolo estuvo débilmente iluminada gracias a la utilización de una cortina móvil que atenuaba la intensidad del tubo de luz.



Figura M.5. Tarea de Reconocimiento Espacial de Objetos. Se observa el contexto con los objetos en la parte izquierda de la foto y la rata explorando uno de ellos en la parte derecha de la foto.

Habitación, entrenamiento y testeo

Al inicio del experimento, los animales fueron habituados al contexto vacío por tres días consecutivos previos al entrenamiento durante 20 minutos cada día. Las sesiones de

habituaación se realizaron con el fin de familiarizar a las ratas con los contextos en los cuales se realizó el entrenamiento. En el día del entrenamiento (TR REO), dos objetos idénticos (se utilizaron en forma aleatoria objetos de vidrio, metal o plástico, todos con dimensiones similares para los cuales los animales presentan preferencias similares) se colocaron dentro de la caja, cercanos a las dos esquinas adyacentes de la misma. Se dejó a los animales explorar la arena por 8 minutos y el tiempo de exploración a cada objeto fue registrado con cronómetros manuales. Se consideró que la rata exploraba el objeto cuando orientaba su cabeza hacia el objeto con su nariz a una distancia menor o igual a 1 cm del objeto olfateando o tocando el mismo con su nariz o patas delanteras. No se consideró que la rata explorara el objeto si se sentaba sobre el mismo, o si se trepaba al mismo mirando para arriba o si se apoyaba en el mismo, pero con su cabeza direccionada a otro lugar. Se excluyeron de los análisis aquellas ratas que durante el TR REO exploraron uno de los objetos más del 65% del tiempo total de exploración (es decir el dedicado a ambos objetos), ya que es requisito en esta sesión no mostrar preferencias por alguno de los objetos y/o sus localizaciones. Durante la sesión de testeo (TS REO), realizada 24 horas después, uno de los objetos fue cambiado a una posición nueva y el tiempo de exploración de cada uno de ellos se registró durante 3 minutos. En el TR REO se excluyeron los animales que presentaran tiempos de exploración por objeto menor a 20 segundos mientras que en el TS REO se excluyeron a los animales que presentaran tiempos de exploración total de los dos objetos menor a 20 segundos. Los resultados se expresan como Índice de Preferencia: $(T_n - T_f) / (T_n + T_f)$ donde T_n es Tiempo de exploración de la posición novedosa y T_f es Tiempo de exploración de la posición familiar. Un índice positivo y significativamente distinto de cero indica memoria. Para cada uno de los sujetos experimentales, las posiciones de los objetos en el TR REO y su condición de familiar

o novedosa durante el TS REO fue balanceada. La caja y los objetos fueron limpiados entre ensayos con una solución de alcohol, agua y detergente.

Tarea de exploración en campo abierto

El campo abierto es un test utilizado habitualmente en roedores para evaluar actividad locomotora y exploratoria (Viola y col, 2000).

Caja de campo abierto

El dispositivo consiste en una caja con el piso color negro de 50 cm x 50 cm de ancho y 40 cm de alto dividido en 9 cuadrantes iguales (aprox. 16,7 cm por lado cada uno). Las paredes son negras y alcanzan una altura de 40 cm (Figura M.6).

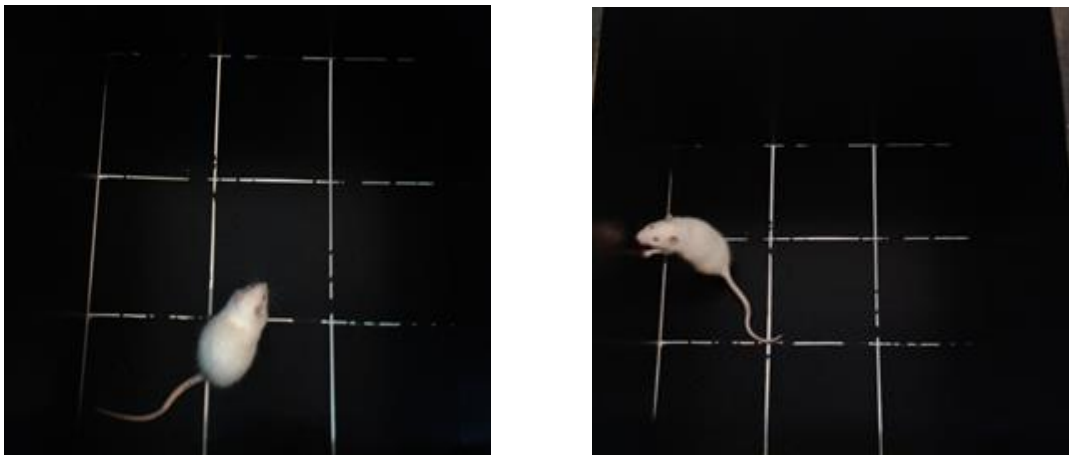


Figura M.6. Caja de campo abierto. La actividad exploratoria del animal se determinó registrando el número de cruces (izquierda) y exploraciones aéreas (derecha) que realizó durante una sesión de 5 minutos.

Habitación

Al comienzo del ensayo se colocó a la rata en un cuadrante perimetral y se registró la actividad locomotora y exploratoria durante 5 minutos. El registro consistió en medir la cantidad de veces que el animal cruza los cuadrantes (cruces) y el número de episodios en los que hace exploraciones aéreas (posición vertical que adopta el roedor apoyándose sobre sus patas traseras, con la que examina el ambiente). El grado de habitación del animal al campo abierto se considera inverso al de exploración.

Ensayos bioquímicos

En los experimentos en que se indica, se practicó eutanasia de los animales inmediatamente después del testeo de la tarea de EI. Se utilizaron dos grupos de animales: infundidos con vehículo e infundidos con rapamicina. La eutanasia se realizó por decapitación, se extrajo el cerebro y se disecó, congeló y almacenó a -20°C la región dorsal del hipocampo hasta su utilización en tiempos cercanos a esa extracción.

Obtención de fracciones subcelulares

A fin de evaluar los niveles proteicos de interés en el área del hipocampo dorsal que rodea el sitio de infusión de una droga, luego de la eutanasia de los animales inmediatamente post-testeo, se extrajeron los cerebros y se cortaron rebanadas de 5 mm rodeando el área donde se localizan las cánulas, y se utilizaron volúmenes de homogeneización acordes al peso de la sección (10% peso en volumen).

Los hipocampos fueron homogeneizados en buffer de homogeneización a 4 °C [20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,32 M sacarosa, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinina, 15 µg/ml leupeptina, 50 mM fluoruro de sodio (NaF), y 1 mM ortovanadato de sodio (Na₃VO₄)]. La homogeneización del tejido se realizó mediante una serie de 20 subidas y bajadas cada una en un homogeneizador de vidrio en hielo. A esta primera fracción celular se la denominó homogenato total y se guardaron 80 µl de esta muestra. Luego, se centrifugó la muestra remanente a 4°C a 1,16 rcf (unidades de fuerza centrífuga relativa) durante diez minutos. Los sedimentos (pellets) se lavaron dos veces en buffer de homogeneización y luego fueron desechados. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 4°C a 14,5 rcf durante media hora. El nuevo pellet obtenido fue resuspendido en agua bidestilada (pH 6,8) fría (shock osmótico), se incubó durante treinta minutos y posteriormente se sometió la muestra a tres series de veinte subidas y bajadas cada una en homogeneizador de vidrio en hielo. La muestra fue centrifugada a 4°C a 20,26 rcf durante 40 minutos. Del pellet resultante, enriquecido en membrana sináptica (esta fracción subcelular es llamada de membrana sináptica, SPM), una parte se resuspendió en buffer de resuspensión (Tris-HCl 20 mM, 1 mM PMSF, NaF 20mM, EDTA 0,2 mM, o-vanadato de sodio 0,5 mM, 10 µg/ml aprotinina, 15 µg/ml leupeptina, 50 mM NaF, y 1 mM Na₃VO₄) para su posterior análisis y otra parte se utilizó para obtener la fracción siguiente. Este remanente se resuspendió en un buffer TNE (50 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 137 mM NaCl, 1mM PMSF, 0,2mM, o-vanadato de sodio 0,5 mM, 10 µg/ml aprotinina, 15 µg/ml leupeptina, 50 mM NaF, y 1 mM Na₃VO₄) que contenía 0,5% de Tritón X-100 y se sometió la muestra a una serie de diez subidas y bajadas. Luego se agitaron las muestras durante cuarenta minutos a una velocidad de 70 revoluciones por minuto (rpm) en un bloque horizontal en frío. Por último, se centrifugaron las muestras durante 1 hora a 20,26 rcf. Se obtuvo un pellet que se resuspendió en buffer de resuspensión, homogeneizando con un

micro-homogeneizador. Esta última fracción obtenida se denomina PSD (fracción enriquecida en membranas postsinápticas).

Todos los procedimientos fueron realizados en hielo. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

Western Blot

La concentración de proteína de cada fracción se midió mediante el kit (ThermoFisher) de ensayo de proteína de BCA (ácido biconconínico, el cual genera una reacción colorimétrica detectable a 562 nm). Las muestras de homogenato (7,5 µg de proteína) o de fracciones de SPM o de PSD (6 µg de proteína) fueron sometidas, por duplicado, a una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE; geles al 10 %) y, luego, las proteínas fueron transferidas electroforéticamente (16 horas, 40 V a 4 °C) a membranas de PVDF. Luego de una preincubación en buffer de bloqueo (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 % leche en polvo, 150 mM NaCl, 0,05 % v/v Tween 20), estas membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-GluA1 (1:1000; Cell Signaling); anti GluA2 (1:1000; Cell Signaling) y anti-Actina (1:10000; SCBT). El anticuerpo de Actina se utilizó para evaluar los niveles de carga de proteína. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 5 veces durante 20 minutos en buffer TTBS 1X (20 mM Tris-HCL, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05 % v/v Tween 20) y luego incubadas con un anticuerpo secundario anti-conejo o anti-cabra acoplados a fosfatasa alcalina (1:40000, SCBT, en ambos casos) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Luego de esta incubación, las membranas fueron nuevamente lavadas en buffer TTBS 1X 5 veces durante 20 minutos. Finalmente, se visualizaron los complejos antígeno-anticuerpo por un método de fluorescencia utilizando el sustrato ECF (GE

Healthcare Life Sciences) y un equipo de medición de fluorescencia (STORM, GE Healthcare Life Sciences). El análisis densitométrico de los inmunoblots fue realizado en un sistema de análisis de imágenes (ImageQuant). Cada valor obtenido de densidad óptica (de cada banda) se normalizó a su correspondiente valor de Actina (control de carga) y luego, los valores resultantes fueron a su vez relativizados al promedio del grupo Vehículo.

Remoción de anticuerpos para re-incubación

Para remover los anticuerpos, las membranas fueron incubadas durante 2 horas 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 durante 20 minutos, secadas a temperatura ambiente (TA) y almacenadas a 4 °C hasta su re-incubación con otro anticuerpo.

Diseño Experimental y Estadística

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

Los datos comportamentales fueron analizados mediante un test *t* de Student no pareado cuando se comparaban dos grupos independientes o un test *t* de Student pareado cuando se comparaba el mismo grupo en dos momentos distintos, o un ANOVA de un factor seguido de un test de Newman-Keuls de comparaciones múltiples cuando se comparaban tres o más grupos independientes. En los gráficos de EI, las barras de los gráficos representan la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o testeo. En todos los casos, el efecto del entrenamiento fue siempre significativo, pero por cuestiones de simplicidad visual los

símbolos indicando diferencias significativas entre las latencias del entrenamiento y el testeo fueron omitidos. En los gráficos de REO, las barras representan la media \pm SEM del índice de discriminación.

Los valores obtenidos al realizar la medición de los blots en los experimentos bioquímicos fueron normalizados al grupo Vehículo y relativizados a los niveles de Actina. El análisis de datos se realizó mediante ANOVA de dos factores (considerando los factores tratamiento (droga) y membrana).

El análisis de datos se realizó mediante los programas de GraphPad Prism 6 e Infostat. En todos los casos el valor de α fue seteado en 0,05.

RESULTADOS

CAPITULO 1

CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA CONDUCTUAL DEL BLOQUEO DE LA VÍA DE mTORC1 EN LA EVOCACIÓN DE MEMORIAS DE LARGO TÉRMINO

La síntesis proteica es requerida al momento de la evocación para una normal expresión de una memoria de largo término

Como ha sido previamente descrito en la Introducción, durante las últimas décadas, el estudio de la memoria ha permitido esclarecer varios de los mecanismos neurales, celulares y moleculares de la adquisición y consolidación de la memoria de largo plazo y la de su reconsolidación y extinción (McGaugh, 2000; Kandel, 2001; Pedreira y Maldonado, 2003; Dudai y Eisenberg, 2004). De esta manera, existe hoy un panorama de cómo, dónde y cuándo se establecen las principales etapas del aprendizaje y la memoria. Por el contrario, poco se conoce sobre los mecanismos de expresión de la memoria. La información sobre estructuras neurales, receptores y cascadas de señalización involucradas en la evocación de la memoria (Kim y col, 1993; Izquierdo y col, 1993; De Quervain y col, 1998, Szapiro y col, 2000; Szapiro y col, 2001; Szapiro y col, 2002; Hall y col, 2001; Lopez y col, 2015; Thomas, 2015) es fragmentaria e incompleta.

La síntesis de nuevas proteínas es un requisito clave para los procesos de plasticidad sináptica y formación de memorias de largo término. Las proteínas que son sintetizadas durante la formación de la memoria se cree que están involucradas en la estabilización y fortalecimiento de las modificaciones sinápticas que permiten la persistencia de la memoria. Además, tanto la consolidación como la reconsolidación son afectadas por inhibidores generales de la síntesis proteica en distintos paradigmas (Flexner y col, 1965; Nader y col, 2000). Sin embargo, diversos trabajos indican que los mecanismos necesarios para la evocación de la memoria no dependerían de la síntesis de proteínas.

A pesar de esto, han emergido estudios recientes que sugieren que la síntesis de proteínas podría ser importante también durante el proceso de evocación. En particular, se encontró que microinfusiones de distintos inhibidores de síntesis proteica (entre ellos rapamicina) en la amígdala durante la evocación afectaron la normal retención de la memoria de miedo auditiva (López y col, 2015).

Como hemos señalado en la Introducción, mTOR es una quinasa que se encuentra asociada con otras proteínas formando el complejo mTORC1 que tiene un papel clave en la regulación de la síntesis proteica. Existen numerosas evidencias en la literatura sobre la importancia de la vía de mTORC1 en procesos de aprendizaje y memoria (Bekinschtein y col, 2007; Slipczuk y col, 2009; Gafford y col, 2011; Jobim y col, 2012). Sin embargo, no existe información suficiente sobre el rol de esta vía en la evocación de la memoria. Teniendo en cuenta datos previos del laboratorio que indican el requerimiento de la actividad de mTORC1 durante la consolidación de la memoria en el hipocampo (Slipczuk y col, 2009) y resultados de otros autores durante la evocación (López y col, 2015), nos propusimos estudiar el requerimiento de la síntesis proteica en el hipocampo durante la evocación en la tarea de evitación inhibitoria.

En particular, nos propusimos estudiar el rol de la vía de mTORC1 durante la evocación de la tarea de EI. Esta tarea ha sido ampliamente utilizada en el estudio de la memoria por su rápida adquisición y porque permite distinguir entre las distintas etapas de la memoria, incluida la evocación (Izquierdo y col, 1997). Para abordar este primer objetivo, bloqueamos la actividad de esta vía infundiendo rapamicina en el hipocampo dorsal 15 minutos antes del testeo realizado a 24 horas y comparamos el comportamiento con animales infundidos con solución fisiológica (vehículo). Como puede verse en la Figura 1.1, los animales infundidos con

rapamicina presentaron un bloqueo en la expresión de la memoria con respecto a los animales controles infundidos con vehículo (Fig 1.1, Veh vs. Rapa, $p=0,007$, Prueba *t* de Student no pareada, $n=5-6$). Sorprendentemente, el efecto de la rapamicina resultó ser transitorio ya que se observó una normal expresión de la memoria en el retesteo llevado a cabo 5 horas posteriores al primer testeo en animales infundidos con rapamicina (Fig 1.1, Rapa vs. reTS, $p=0,0071$, Prueba *t* de Student para muestras pareadas, $n=6$). Esto indica que las ratas que presentaban un déficit de la retención de la memoria por haber sido infundidas con rapamicina pueden evocar normalmente luego de un tiempo, sugiriendo que la amnesia inducida por rapamicina no es debida a un efecto no específico (por ejemplo, lesión) en los circuitos hipocampales. Además, el hecho de que el déficit en la retención de la memoria se evidencie en el primer test y no en el retest sugiere que la inhibición de la vía de mTORC1 afecta específicamente la evocación y no el almacenamiento de la memoria.

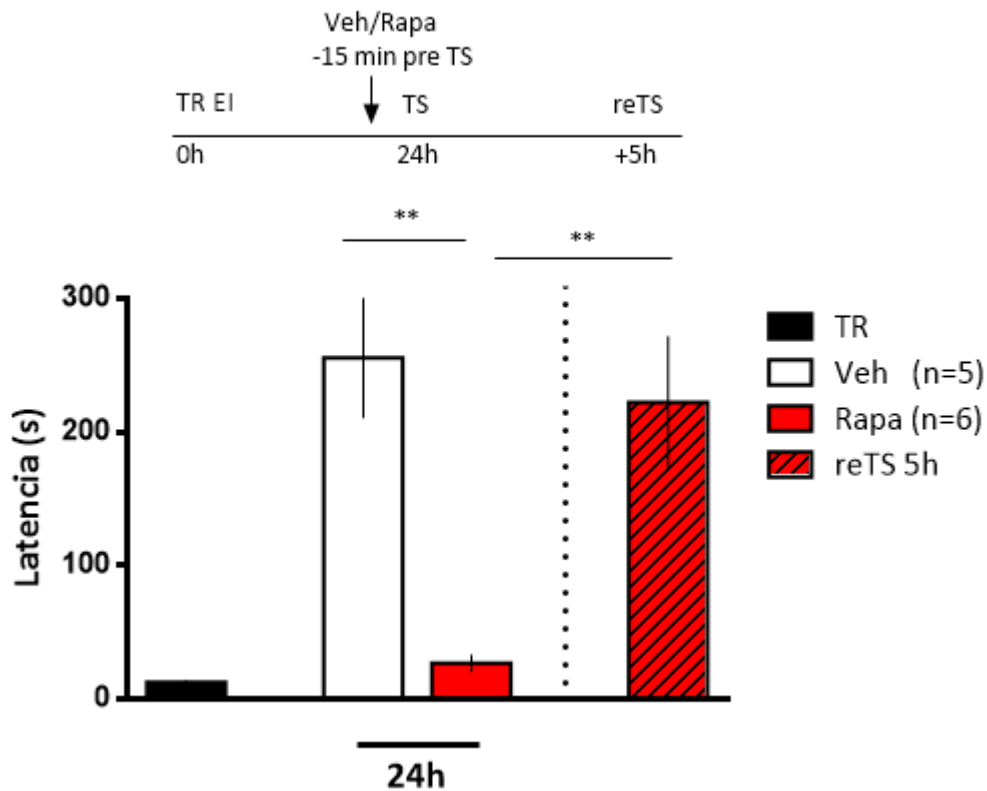


Figura 1.1. El bloqueo de la actividad de la vía de mTORC1 impide la normal expresión de una MLT. La infusión intrahipocampal de rapamicina 15 minutos antes del testeo llevado a cabo 24 horas después del entrenamiento en la tarea de EI bloquea la expresión de una MLT. Los animales fueron infundidos con vehículo o rapamicina 15 minutos antes del testeo llevado a cabo 24 horas luego del entrenamiento en la tarea de EI. 5 horas posteriores al primer testeo, los animales que habían sido infundidos con rapamicina fueron retesteados (reTS). Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. Veh vs. Rapa, $p=0,007$, Prueba *t* de Student no pareada $n=5-6$ y $p=0,0071$ para Rapa vs. reTS, Prueba *t* de Student para muestras pareadas, $n=6$. Asteriscos indican diferencias significativas entre grupos. $**p<0,01$.

Para confirmar si la regulación de síntesis proteica estaba siendo afectada con la infusión de rapamicina, infundimos emetina, un inhibidor general de la síntesis proteica, en el hipocampo dorsal 15 minutos antes del testeo en EI llevado a cabo 24 horas luego del entrenamiento. Como se observa en la Figura 1.2 los animales infundidos con emetina

presentaron un déficit en la retención de la memoria comparados con el grupo vehículo (Fig 1.2, Veh vs. Eme, $p=0,0207$, Prueba t de Student no pareada, $n=6$). En este caso, el efecto de la emetina no fue reversible, ya que no se observó una normal expresión de la memoria en el retesteo llevado a cabo 5 horas posteriores al primer testeo (Fig 1.2, $p>0,05$, Eme vs. reTS, Prueba t de Student para muestras pareadas, $n=6$).

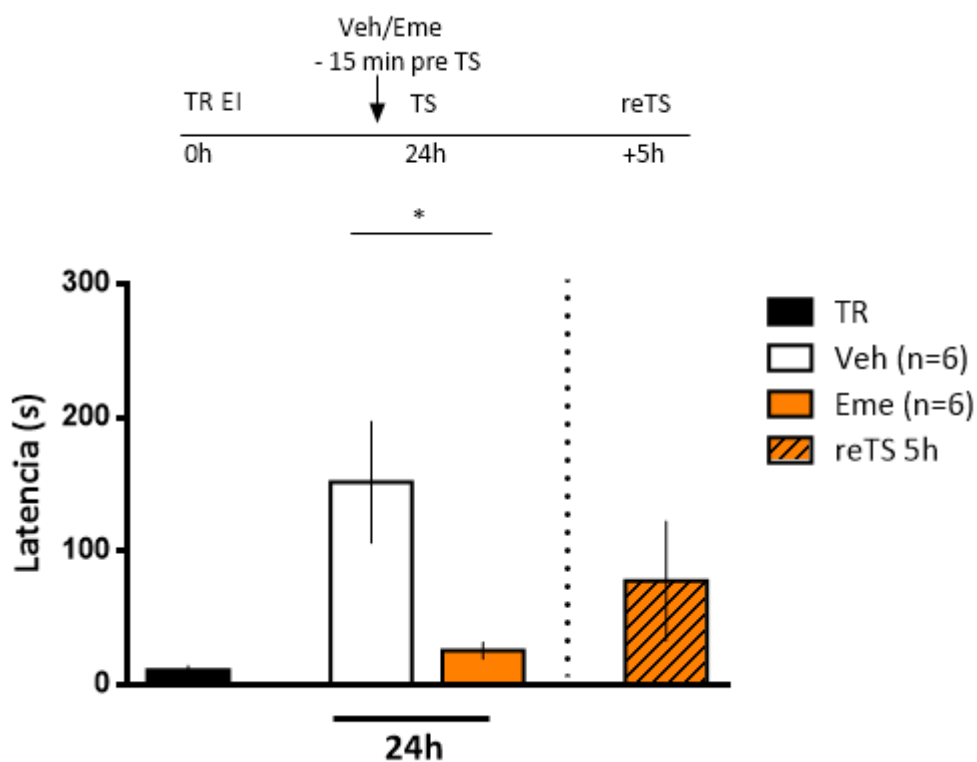


Figura 1.2. El bloqueo de la síntesis proteica imposibilita la expresión de una MLT. Infusión intrahipocampal de emetina 15 minutos previos al testeo realizado 24 horas luego del entrenamiento, bloquea la expresión de la MLT de la tarea de EI. Los animales fueron infundidos con vehículo o emetina 15 minutos antes del testeo llevado a cabo 24 horas luego del entrenamiento en la tarea de EI. 5 horas posteriores al primer testeo, los animales que habían sido infundidos con emetina fueron retesteados (reTS). Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. Veh vs. Eme, $p=0,0207$, Prueba t de Student no pareada, $n=6$. Asteriscos indican diferencias significativas entre grupos. * $p<0,05$.

Estos dos primeros resultados similares obtenidos con dos inhibidores de la síntesis proteica distintos apuntan a que el déficit observado en ambos casos en la evocación de la memoria se debe específicamente a la inhibición de la síntesis proteica. En suma, estos resultados indican que la síntesis proteica continua (*ongoing*) es requerida para la normal expresión de la memoria.

El bloqueo de la vía de mTORC1 impide la evocación de memorias previamente expresadas

Luego quisimos estudiar si el efecto de la rapamicina se podía observar también en memorias que ya hubieran sido expresadas. Es decir, nos propusimos dilucidar si una memoria que había sido evocada en un primer testeo era susceptible de ser afectada en un siguiente testeo por el bloqueo de la vía de mTORC1. Para ello, entrenamos a los animales en la tarea de EI y testeamos a los animales a las 24 horas sin realizar ninguna infusión. 15 minutos antes de llevar a cabo un segundo testeo, 24 horas después del primero, infundimos vehículo o rapamicina. En este caso los animales infundidos con rapamicina presentaron un bloqueo de la expresión de la memoria que fue transitorio, ya que al retestear 5 horas después del segundo testeo, los animales presentaban una normal expresión de la memoria (Fig 1.3, Veh vs. Rapa $p=0,0017$, Prueba *t* de Student, $n=8-9$ y Rapa vs. reTS, $p=0,0018$, Prueba *t* de Student para datos pareados, $n=9$). Con este experimento confirmamos que los animales infundidos con rapamicina presentaban una capacidad de aprendizaje y de expresión de la memoria normal, que luego se ve alterada por la infusión de rapamicina 15 minutos antes del segundo testeo llevado a cabo 24 horas luego del primero. De esta manera podemos

reafirmar que el efecto de la rapamicina es específico sobre la expresión de la memoria y podemos descartar que los animales infundidos con rapamicina presenten algún tipo de déficit locomotor o de otra naturaleza que pueda confundirse con un efecto de déficit de memoria. De todas maneras, luego realizamos experimentos controles de locomoción más específicos.

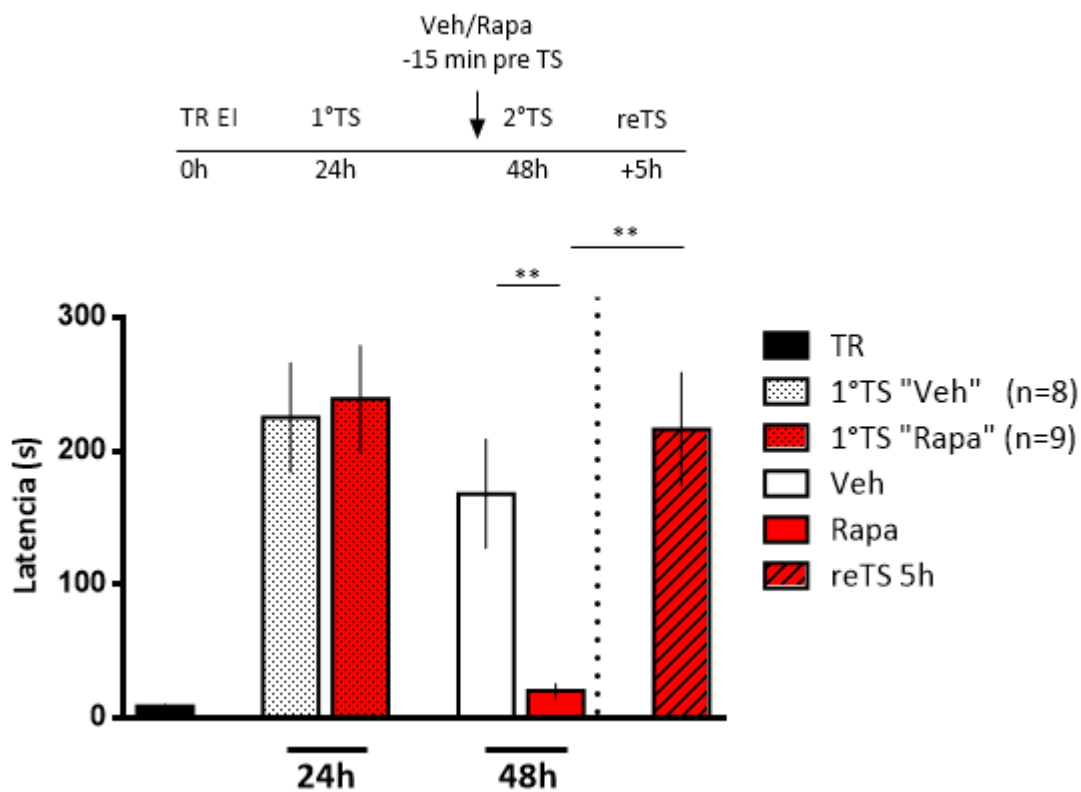


Figura 1.3. La actividad de la vía de mTORC1 es requerida para la expresión de memorias que ya han sido expresadas previamente. Las ratas fueron entrenadas en la tarea de EI y testeadas por primera vez 24 horas más tarde. 15 minutos antes de llevar a cabo un segundo test, 24 horas después del primero, las ratas fueron bilateralmente infundidas con vehículo o rapamicina. 5 horas posteriores al primer testeo, los animales que habían sido infundidos con rapamicina fueron retesteados (reTS). Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. Veh vs. Rapa, $p=0,0017$, Prueba t de Student, $n=8-9$ y $p=0,0018$ Rapa vs. reTS, Prueba t de Student para datos pareados $n=9$. Asteriscos indican diferencias significativas entre grupos. $**p<0,01$.

La vía de mTORC1 tiene una ventana temporal de acción específica en la evocación de la memoria

Considerando que el tiempo de administración de una droga es importante para evaluar su efecto, nos dispusimos a estudiar el curso temporal de acción de la rapamicina sobre la expresión de la MLT. En primer lugar, realizamos un experimento corriendo el tiempo de infusión de la rapamicina a 40 minutos previos al testeo. En este caso, como a los 15 minutos, también se observó un bloqueo en la expresión de la MLT (Fig 1.4, Veh vs. Rapa -40 min, $p < 0,05$, ANOVA de un factor, seguido de comparaciones de Newman-Keuls, $n=9$). Luego, corrimos aún más el tiempo de infusión de la rapamicina a 3 horas previas al testeo. En este caso, la inactivación de la vía de mTORC1 no tuvo ningún efecto en la expresión de la memoria, lo que indica que la rapamicina posee una ventana temporal de acción restringida (Fig. 1.4, Veh vs. Rapa-3h, $p > 0,05$, ANOVA de 1 factor seguido de comparaciones múltiples de Newman-Keuls, $n=9$). Este resultado puede estar relacionado con el hecho de que las proteínas necesarias para la evocación puedan tener una tasa de recambio alta (Job y Eberwine, 2001) y que una inactivación de esta maquinaria proteica 40 minutos previos al testeo aún pueda tener efecto sobre esa tasa rápida de recambio mientras que 3 horas previas al testeo no.

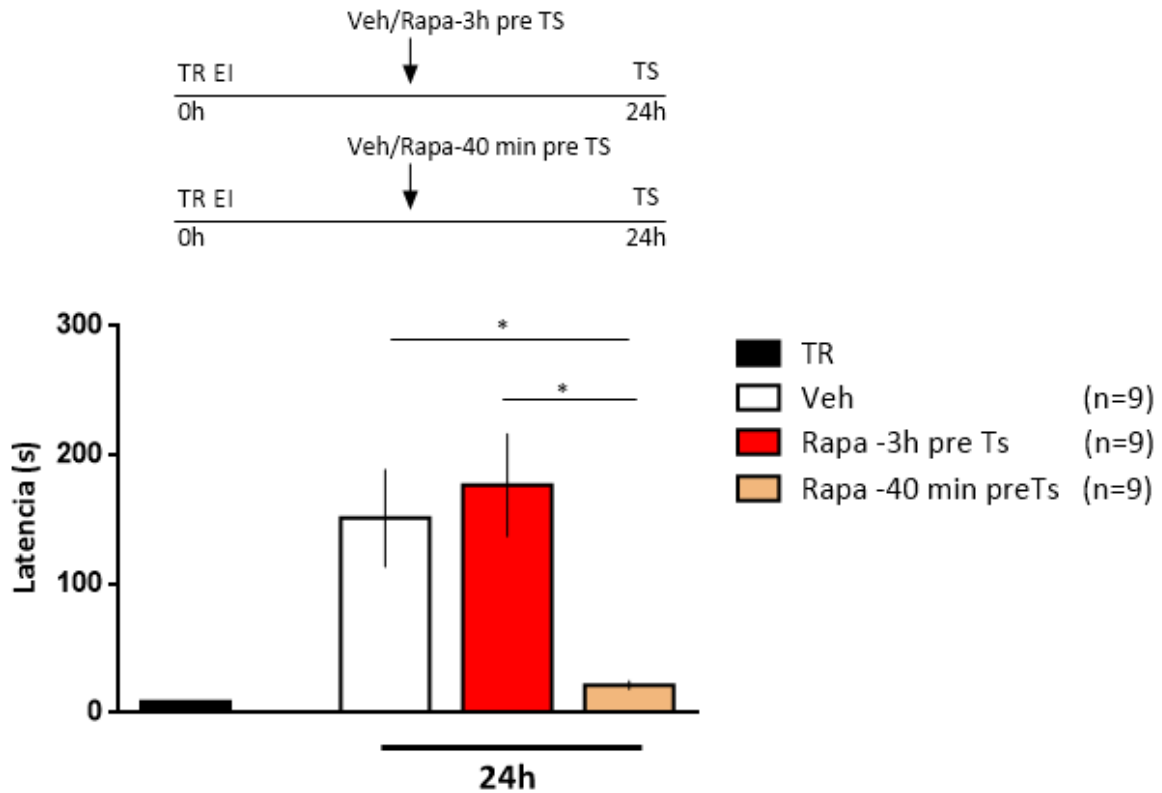


Figura 1.4. El bloqueo de la actividad de la vía de mTORC1 40 minutos previos al testeo impide la normal expresión de una MLT mientras que 3 horas previos no tiene efecto. Las ratas fueron bilateralmente infundidas con vehículo o rapamicina en el hipocampo 3 horas o 40 minutos previos al testeo realizado 24 horas luego del entrenamiento. Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. Veh vs. Rapa -40 min preTs, Rapa -3h preTs vs. Rapa-40 min preTs, $p < 0,05$, ANOVA de 1 factor seguido de comparaciones múltiples de Newman-Keuls, $n=9$. Asteriscos indican diferencias significativas entre grupos. * $p < 0,05$.

La vía de mTORC1 no participa en la evocación de la memoria de corto término

Con el objeto de estudiar si el efecto de la rapamicina era dependiente de la edad de la memoria a ser evocada, estudiamos en primer lugar la participación de la vía de mTORC1 en una memoria de corto término.

Como hemos señalado en la Introducción, las memorias se clasifican en cuanto a su duración en MCT y MLT (McGaugh, 2000). Las MLT atraviesan un proceso de consolidación que requiere cambios plásticos dependientes de síntesis proteica (Izquierdo y col, 2002) mientras que las MCT no requieren en su procesamiento de síntesis proteica y son por lo tanto insensibles a manipulaciones que afecten la transcripción y/o traducción.

Para abordar el objetivo de esta sección, realizamos un experimento en el cual infundimos la rapamicina 15 minutos antes de un testeo realizado 2 horas después del entrenamiento en la tarea de EI. En este caso, como puede apreciarse en la Figura 1.5, la rapamicina no produjo ningún efecto. Teniendo en cuenta los resultados previos y este resultado se desprende que el efecto amnésico de la rapamicina es específico para la evocación de la memoria de largo y no de corto término. Este resultado concuerda con los diferentes requerimientos publicados en la literatura en la formación de las memorias de largo y corto término (McGaugh, 2000; Kandel, 2001), y extiende estas diferencias a la fase de evocación de estas memorias.

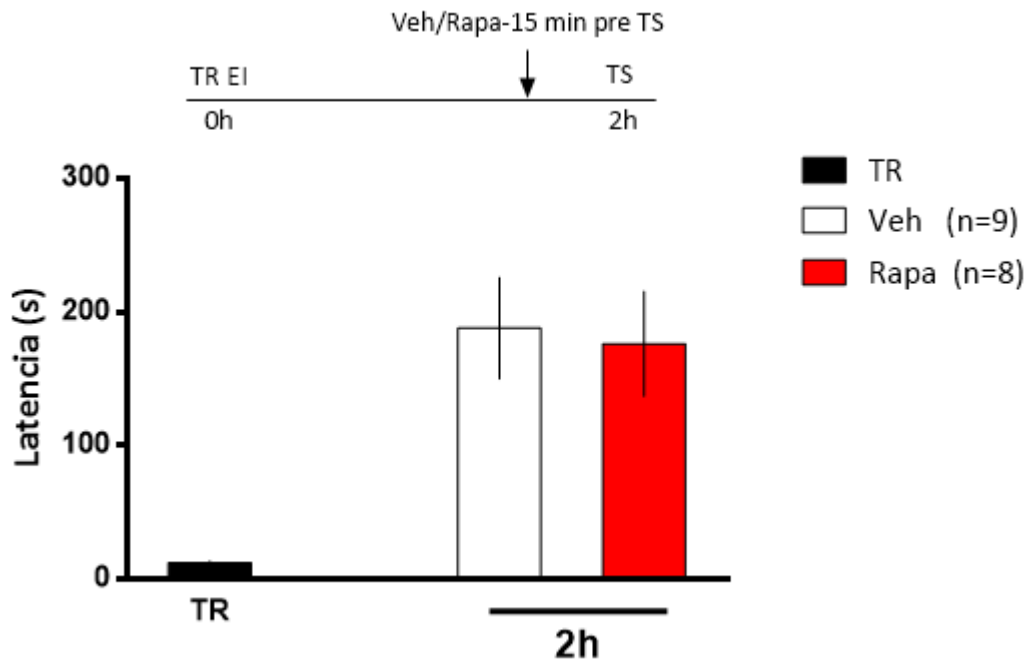


Figura 1.5. La vía de mTORC1 no participa en la evocación de la memoria de corto término. Las ratas fueron infundidas bilateralmente en el hipocampo dorsal con vehículo o rapamicina 15 minutos antes de un testeo llevado a cabo 2 horas luego del entrenamiento. Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. $p > 0,05$, Prueba *t* de Student, $n = 8-9$.

La vía de mTORC1 está involucrada en la expresión de memorias persistentes cuya evocación depende del hipocampo

Luego, quisimos analizar el efecto del bloqueo de la vía de mTORC1 sobre la evocación de memorias persistentes. Para ello, en primer lugar, realizamos otro experimento en el cual infundimos rapamicina 15 minutos antes de un testeo realizado 7 días posteriores al entrenamiento en EI.

Como puede observarse en la Figura 1.6, la infusión de rapamicina impidió la normal expresión de una MLT testada a 7 días (Fig 1.6, Veh vs. Rapa, $p=0,0201$, Prueba *t* de Student, $n=12$). Como en el testeo a 24 horas, en el retesteo de las ratas que habían sido infundidas con rapamicina 5 horas posteriores al primer testeo se observó una normal expresión de la memoria (Fig 1.6, Rapa vs. reTS, $p=0,0064$, Prueba *t* de Student para muestras pareadas, $n=12$).

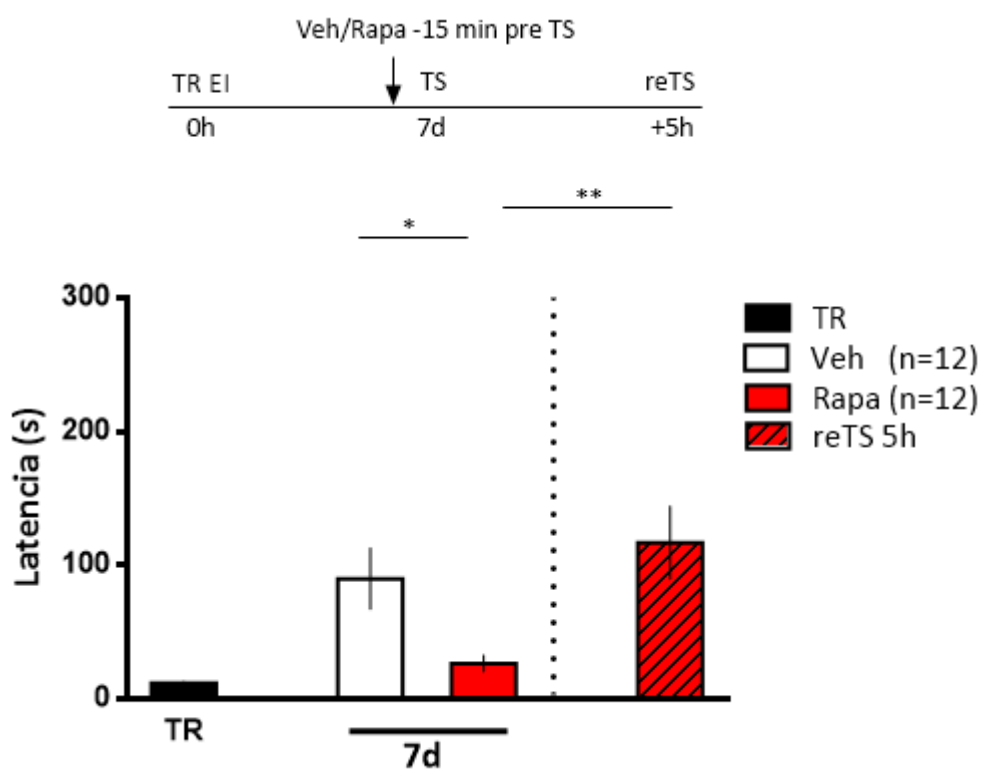


Figura 1.6. La vía de mTORC1 está involucrada en la evocación de una memoria de 7 días. Las ratas fueron infundidas bilateralmente en el hipocampo dorsal con vehículo o rapamicina 15 minutos antes de un testeo llevado a cabo 7 días luego del entrenamiento en la tarea de EI. 5 horas posteriores al primer testeo, los animales que habían sido infundidos con rapamicina fueron retesteados (reTS). Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. Veh vs. Rapa, $p=0,0201$, Prueba *t* de Student y Rapa vs. reTS, $p=0,0064$, Prueba *t* de Student para muestras pareadas, $n=12$. Asteriscos indican diferencias significativas entre grupos. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

En segundo lugar, analizamos el efecto del bloqueo de la vía de mTORC1 en la evocación de una memoria testeada a 14 días. En este caso, la infusión de rapamicina 15 minutos previos al testeo, también impidió la normal expresión de la MLT (Fig 1.7, Veh vs. Rapa, $p=0,0167$, Prueba t de Student, $n=5-7$). Al igual que los resultados obtenidos a 7 días, en el retesteo llevado a cabo 5 horas posteriores al primer testeo a 14 días, hubo una recuperación de la normal expresión de la memoria (Fig 1.7, Rapa vs. reTS, $p=0,048$, Prueba t de Student para muestras pareadas, $n=5$).

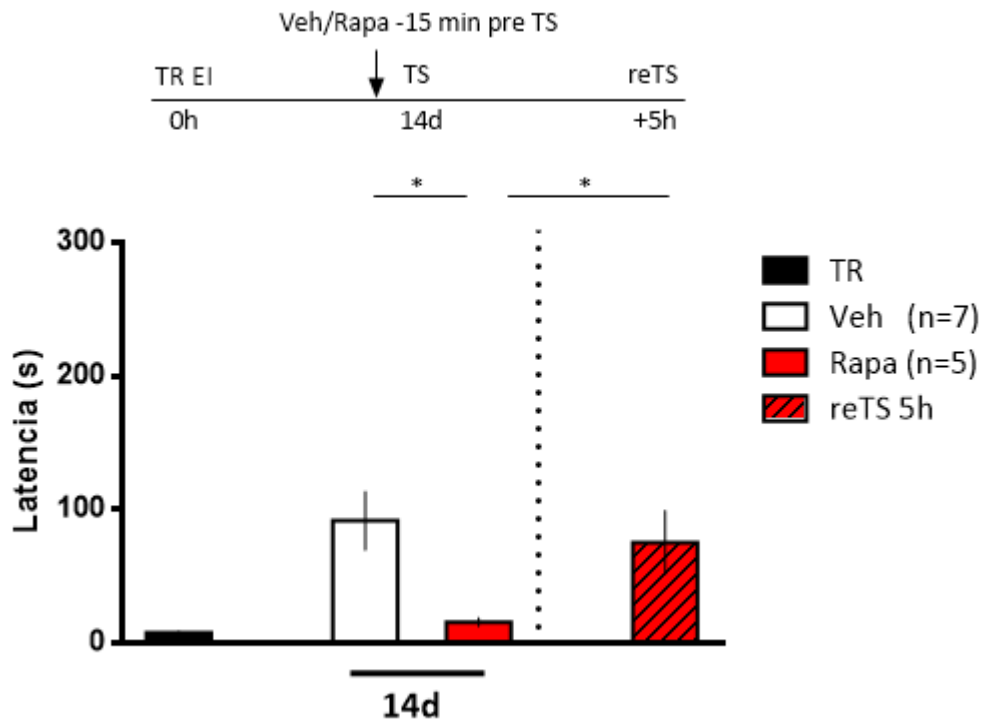


Figura 1.7. La vía de mTORC1 está involucrada en la evocación de una memoria de 14 días. Las ratas fueron infundidas bilateralmente en el hipocampo dorsal con vehículo o rapamicina 15 minutos antes de un testeo llevado a cabo 14 días luego del entrenamiento en la tarea de EI. 5 horas posteriores al primer testeo, los animales que habían sido infundidos con rapamicina fueron retesteados (reTS). Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. Veh vs. Rapa, $p=0,0167$, Prueba t de Student y Rapa vs. reTS, $p=0,048$, Prueba t de Student para muestras pareadas, $n=5$. Asteriscos indican diferencias significativas entre grupos. $*p<0,05$.

Estos dos resultados están en línea y extienden los resultados previos sobre el requerimiento de la actividad de la vía de mTORC1 al momento de la evocación, incluso en memorias persistentes de 7 y 14 días respectivamente.

Según la teoría de consolidación sistémica, la información se codifica inicialmente en el hipocampo y la corteza en paralelo. La posterior reactivación del hipocampo instala nuevamente la actividad en las regiones corticales y la reactivación sucesiva lleva al

fortalecimiento de las conexiones córtico-corticales. De este modo, la nueva traza se va integrando gradualmente con las memorias corticales ya existentes y eventualmente se vuelve independiente del hipocampo para su evocación (Squire y Alvarez, 1995; McClelland y col., 1995; Dudai, 2004; Morris, 2006). En este modelo, las memorias decaen más rápidamente en el hipocampo que en la corteza. Varios experimentos han sugerido que la disrupción de la función del hipocampo afecta preferentemente las memorias recientes, mientras que las remotas se mantienen intactas (Frankland y Bontempi, 2005).

Coincidentes con esta teoría, datos previos del laboratorio indicaron que la inactivación del hipocampo dorsal impide la evocación de memorias recientes, pero no de memorias remotas (González y col, 2015).

A fin de evaluar la participación de la vía de mTORC1 en el hipocampo en memorias de largo término en un punto temporal más distante del entrenamiento que los evaluados en los experimentos anteriores, infundimos rapamicina 15 minutos antes de un testeo llevado a cabo 28 días posteriores al entrenamiento. Como puede apreciarse en la Figura 1.8, no se observaron diferencias en este caso entre los grupos control (vehículo) y rapamicina. Este resultado y los obtenidos a 7 y 14 días están en concordancia con la teoría de consolidación sistémica que postula el requerimiento de la integridad hipocampal para la evocación de memorias dentro de un período limitado en el tiempo, e indican que la dependencia de síntesis de proteínas en el hipocampo para la evocación de la memoria de evitación inhibitoria se da dentro de una ventana temporal limitada de al menos 14 días.

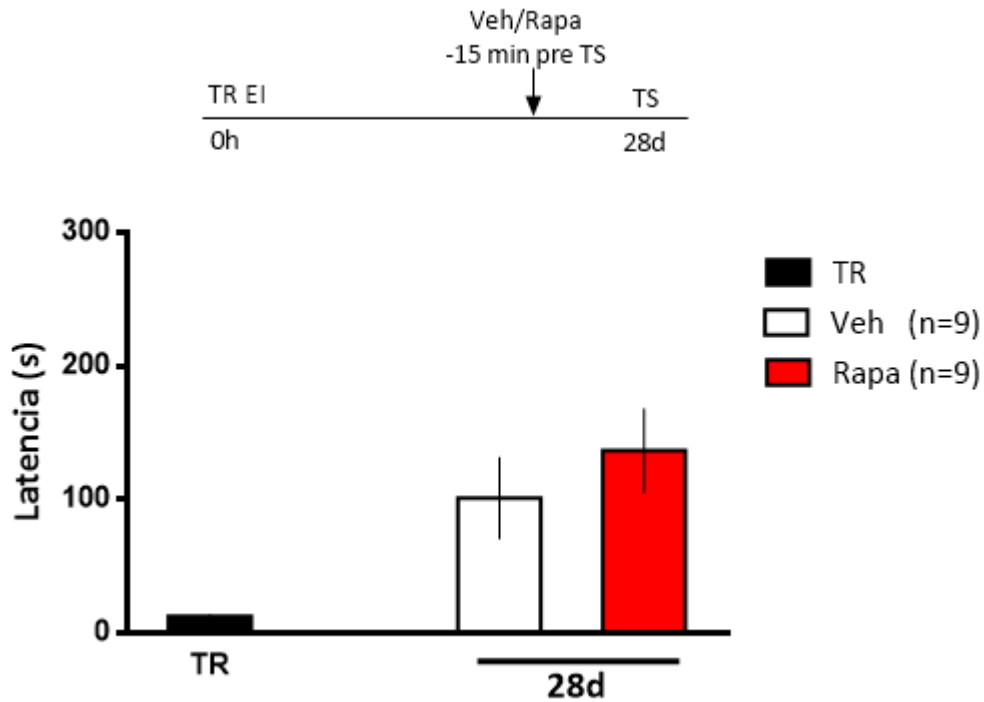


Figura 1.8. La disrupción de la vía de mTORC1 cercana al momento de la evocación días no afecta la expresión de una memoria de 28 días. Los animales fueron entrenados en la tarea de EI y 15 minutos previos al testeo realizado 28 días posteriores al entrenamiento, se les infundió bilateralmente en el hipocampo dorsal vehículo o rapamicina. Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. Veh vs. Rapa, $p > 0,05$, Prueba *t* de Student, $n=9$.

La actividad de la vía de mTORC1 es requerida para la evocación de una MLT en la corteza retrosplenial

Luego quisimos estudiar si el efecto del bloqueo de la actividad de mTORC1 en la evocación de una MLT se podía extender a otras estructuras cerebrales que también estuvieran involucradas en la memoria asociada a la tarea de EI. Una de estas estructuras es la corteza retrosplenial, que en la rata representa una de las mayores regiones corticales que se halla

interconectada con la formación hipocampal, la región parahipocampal y parte de la corteza prefrontal (Kobayashi y Amaral, 2003; Kobayashi y Amaral, 2007). Esta estructura y su rol en la memoria de la tarea de EI han sido extensamente estudiadas en el laboratorio (Katche y col, 2013). Los datos existentes indican que la activación de la corteza retrosplenial es requerida tanto para la formación de la memoria asociada a la tarea de EI como para la evocación de memorias recientes y remotas (Katche y col, 2013). Teniendo en cuenta estos antecedentes, llevamos a cabo un experimento en el cual infundimos vehículo o rapamicina en la corteza retrosplenial 15 minutos previos al testeado llevado a cabo 24 horas posteriores al entrenamiento en la tarea de EI. Como puede observarse en la Figura 1.9, la infusión de rapamicina en la RSC impidió la normal expresión de la MLT, al igual que en el hipocampo (Fig 1.9, Veh vs. Rapa, $p=0,0084$, Prueba t de Student, $n=5$). En concordancia con los resultados obtenidos en hipocampo, un retesteado llevado a cabo 5 horas después del primero, también mostró una normal expresión de la MLT en la RSC (Fig 1.9, Rapa vs. reTS, $p=0,0282$, Prueba de t de Student para muestras pareadas, $n=5$).

De este último resultado se desprende que el rol de la vía de mTORC1 en la evocación de la MLT no se limita a una estructura en particular, el hipocampo, sino que puede ser extendida a otras que también participen de la evocación de esa misma memoria.

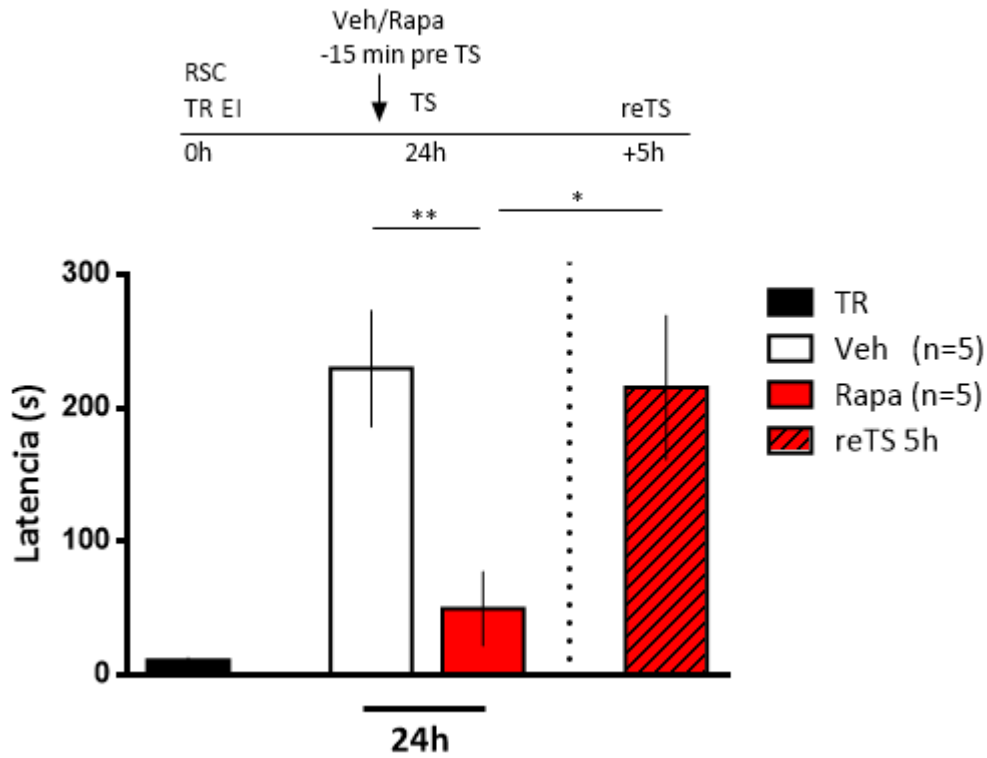


Figura 1.9. El bloqueo de la actividad de la vía de mTORC1 en la corteza retrosplenial impide la normal expresión de una MLT. La infusión intrahipocampal de rapamicina 15 minutos antes del testeo llevado a cabo 24h después del entrenamiento en la tarea de EI bloquea la expresión de una MLT. Los animales fueron infundidos en la corteza retrosplenial con vehículo o rapamicina 15 minutos antes del testeo llevado a cabo 24 horas luego del entrenamiento en la tarea de EI. 5 horas posteriores al primer testeo, los animales que habían sido infundidos con rapamicina fueron retesteados (reTS). Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. Veh vs. Rapa, $p=0,0084$, Prueba *t* de Student y Rapa vs. reTS, $p=0,0282$, Prueba *t* de Student para muestras pareadas, $n=5$. Asteriscos indican diferencias significativas entre grupos. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

La actividad de la vía de mTORC1 es requerida para la evocación de una MLT y no de una MCT en la tarea de reconocimiento espacial de objetos

Luego quisimos estudiar si el efecto amnésico del bloqueo de la actividad de mTORC1 en la evocación de una MLT estaba relacionado con la valencia de la tarea. Para ello, utilizamos el paradigma de reconocimiento espacial de objetos, que es equivalente a la de EI en cuanto a dependencia hipocampal, pero sin una carga aversiva. Infundimos vehículo o rapamicina 30 minutos previos al testeo llevado a cabo 24 horas posteriores al entrenamiento de la tarea de REO. Como puede verse en la Figura 1.10, los animales infundidos con rapamicina presentaron un bloqueo de la expresión de la memoria de REO comparados con los infundidos con vehículo (Veh vs. Rapa, $p=0,0214$, Prueba t de Student, $n=7-8$).

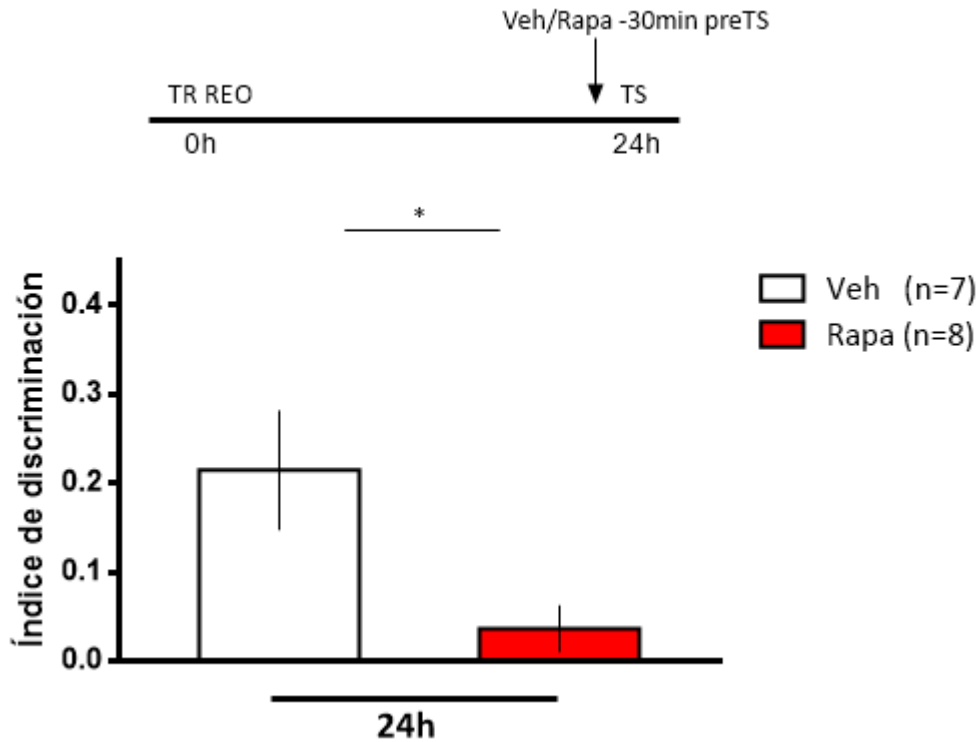


Figura 1.10. El bloqueo de la actividad de la vía de mTORC1 impide la normal expresión de una MLT asociada a la tarea de REO. Los animales fueron infundidos en el hipocampo con vehículo o rapamicina 30 minutos antes del testeo llevado a cabo 24 horas luego del entrenamiento en la tarea de REO. Los datos se expresan como la media \pm SEM del índice de discriminación. Veh vs. Rapa, $p=0,0214$, Prueba *t* de Student no pareada, $n=7-8$. Asteriscos indican diferencias significativas entre grupos. $*p<0,05$.

Teniendo en cuenta los resultados en la tarea de EI, decidimos estudiar si el bloqueo de la actividad de mTORC1 afectaba una MCT en la tarea de REO. Para ello, infundimos vehículo o rapamicina 30 minutos previos al testeo llevado a cabo 90 minutos posteriores al entrenamiento de la tarea de REO. Como se observa en la Figura 1.11, no hubo diferencias significativas entre los animales infundidos con rapamicina y con vehículo en la expresión de una MCT en la tarea de REO.

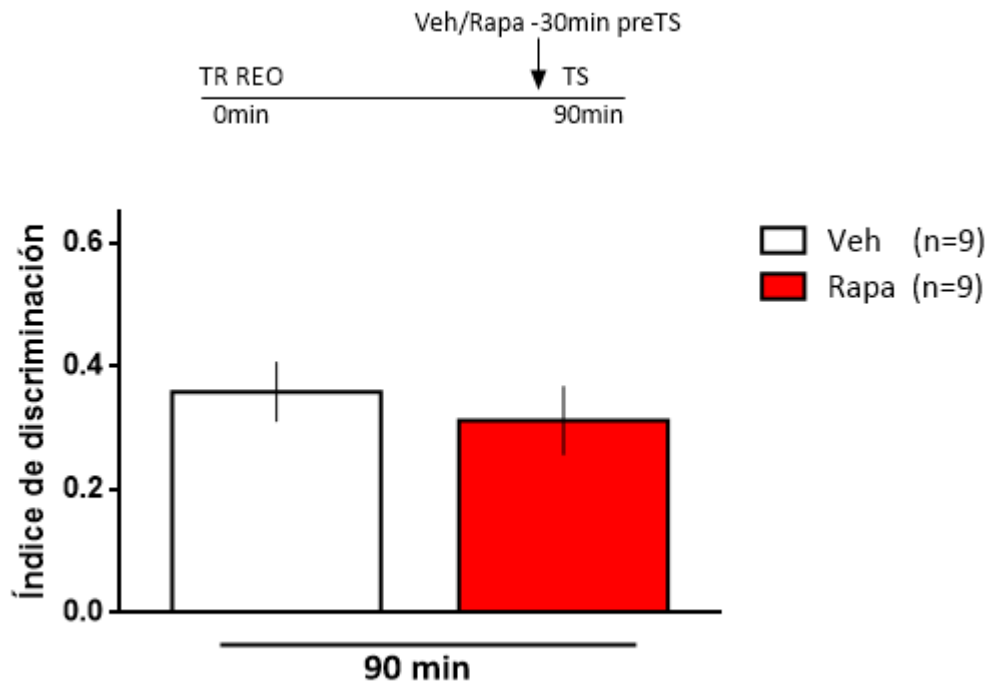


Figura 1.11. La actividad de la vía de mTORC1 no es requerida para la normal expresión de una MCT asociada a la tarea de REO. Los animales fueron infundidos en el hipocampo con vehículo o rapamicina 30 minutos antes del testeo llevado a cabo 90 minutos luego del entrenamiento en la tarea de REO. Los datos se expresan como la media \pm SEM del índice de discriminación. Veh vs. Rapa, $p > 0,05$, Prueba *t* de Student, $n=9$.

En conjunto, estos resultados confirman y extienden los datos obtenidos en la tarea de EI y apuntan a un efecto más general de la vía de mTORC1 sobre la MLT que no es exclusivo de memorias aversivas.

El bloqueo de la expresión de una MLT por inhibición de la vía de mTORC1 no se debe a un efecto de dependencia de estado

Muchos autores han sugerido que la retención afectada de la memoria por agentes amnésicos se debe a una diferencia del estado interno entre la fase de aprendizaje y la fase de retención (testeo). De acuerdo a la hipótesis de dependencia de estado (también llamada hipótesis de integración, Gisquet-Verrier, 2015), la evocación se ve afectada cuando alguna de las claves que gatillan este proceso no están presentes en el momento del testeo. Basados en esta hipótesis, quisimos estudiar si el efecto observado con la rapamicina podía ser atribuido a un fenómeno de dependencia de estado, es decir una incongruencia (*missmatch*) entre el estado farmacológico del animal en el que la información fue adquirida y el estado en el cual esa información es evocada más que a la consecuencia de una disrupción de los mecanismos moleculares necesarios para el proceso de la evocación. Para ello, cuatro grupos de ratas recibieron infusiones de vehículo o rapamicina, una administrada inmediatamente post-entrenamiento y otra 15 minutos previos al testeo (Veh-Veh, Veh-Rapa, Rapa-Veh y Rapa-Rapa). Como puede observarse en la Figura 1.12, la rapamicina afectó la expresión de la memoria tanto cuando fue administrada inmediatamente después del entrenamiento (grupo Rapa-Veh) como cuando fue administrada 15 minutos antes del testeo (grupo Veh-Rapa) o cuando fue administrada en ambos tiempos (grupo Rapa-Rapa) (Fig 1.12, $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido de comparaciones de Newman-Keuls, $n=7-8$). De estos resultados se desprende que el efecto evaluado de la rapamicina no se explica por un fenómeno de dependencia de estado.

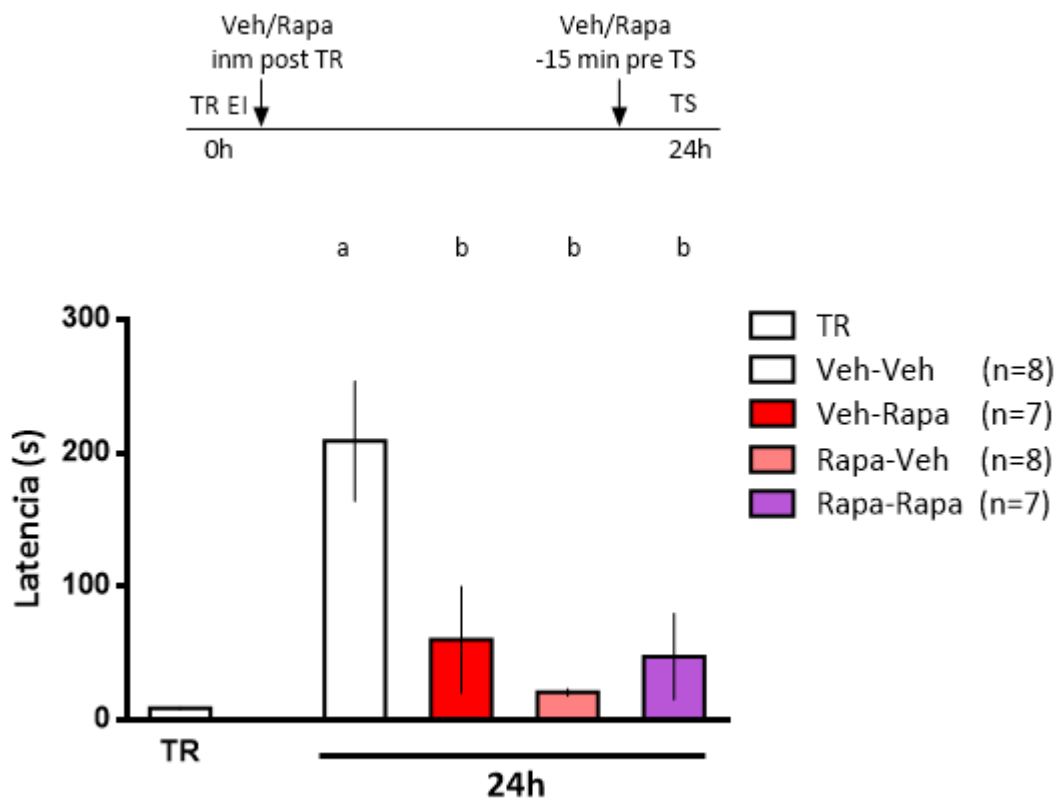


Figura 1.12. La infusión intrahipocampal de rapamicina 15 minutos antes del testeo no tiene efectos de dependencia de estado. Las ratas fueron infundidas bilateralmente con vehículo o rapamicina en el área CA1 del hipocampo dorsal en dos momentos distintos: inmediatamente después del entrenamiento y 15 minutos antes del testeo llevado a cabo 24 horas posteriores al entrenamiento. Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. Letras distintas indican diferencias significativas. $p < 0,05$, ANOVA de 1 factor, seguido del test post hoc de Newman-Keuls, $n=7-8$.

El bloqueo de la vía de mTORC1 no afecta la función locomotora en la rata

Los trabajos que estudian la evocación de la memoria se enfrentan al desafío de distinguir entre los efectos de una manipulación en la evocación de la memoria de aquellos relacionados con el desempeño (performance) de la tarea comportamental. Para descartar cualquier efecto deletéreo que pudiera tener la rapamicina sobre el estado locomotor o conducta exploratoria de la rata que pudiera estar siendo confundido con un efecto de déficit de memoria infundimos vehículo o rapamicina 15 minutos antes del entrenamiento en la tarea de exploración de campo abierto. Como puede verse en la Figura 1.13, no encontramos diferencias entre los dos grupos en los parámetros de exploración analizados (número de exploraciones aéreas y número de cruces). Esto refuerza el efecto específico de la rapamicina sobre la memoria del animal y descarta efectos no deseados que pueda tener la droga que afecten su desplazamiento durante la sesión de testeo de la tarea de EI.

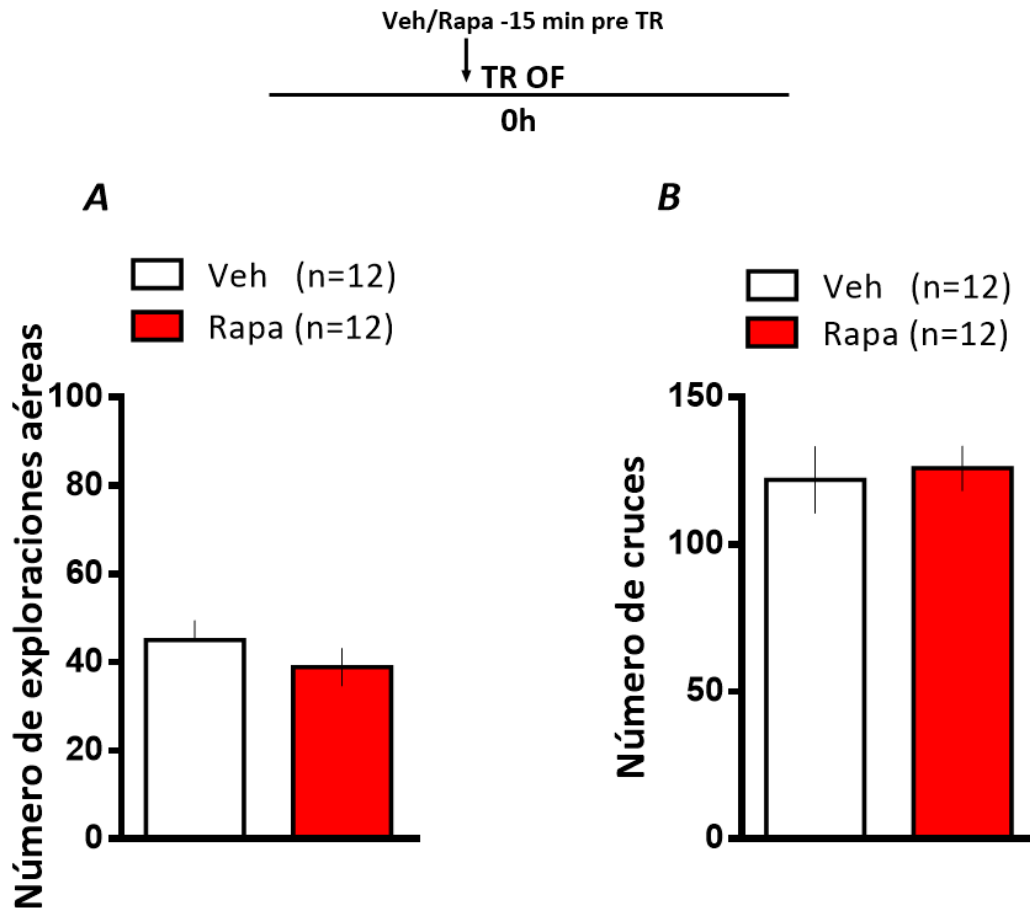


Figura 1.13. El bloqueo de la vía de mTORC1 no afecta la función locomotora ni exploratoria de la rata. Las ratas fueron infundidas bilateralmente con vehículo o rapamicina en el área CA1 del hipocampo dorsal 15 minutos antes del entrenamiento en la tarea de exploración de campo abierto. Los datos se expresan como la media \pm SEM del número de exploraciones áreas (A) o del número de cruces (B). $p > 0,05$, Prueba *t* de Student.

En resumen, en este capítulo se ha mostrado que la síntesis proteica mediada por la vía de mTORC1 es necesaria para la evocación de una MLT y no para MCT en el hipocampo. La expresión de las memorias que ya han sido previamente expresadas también es susceptible de ser afectada por la inhibición de la vía de mTORC1, así como también cualquier MLT dependiente de hipocampo. El requerimiento de la síntesis proteica mediada por la vía de mTORC1 también se observó en otras estructuras involucradas en la evocación de la tarea de

El, como la RSC. Además, hemos extendido los experimentos a memorias no aversivas (de la tarea de REO) obteniendo los mismos resultados. Por último, demostramos que existe una ventana temporal de acción específica para bloquear la vía de mTORC1 con rapamicina antes de la evocación y hemos hallado que este fenómeno no es dependiente de estado y que las infusiones con rapamicina no afectan la conducta exploratoria de la rata.

CAPÍTULO 2

REQUERIMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES AMPA DURANTE LA EVOCACIÓN DE LA MEMORIA DE LARGO TÉRMINO Y SU RELACIÓN CON LA VÍA DE mTORC1

La síntesis *de novo* de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA es requerida para la evocación de una MLT

Como ha sido abordado en la Introducción, la principal función de la vía de mTORC1 en el sistema nervioso es la regulación de la síntesis de proteínas relacionadas con procesos de plasticidad sináptica, entre ellas receptores de membrana. En particular, el glutamato es el neurotransmisor excitatorio predominante en el cerebro cuya liberación induce respuestas postsinápticas en su mayoría mediadas por AMPAR (Buonarati, 2019). Entonces, resulta evidente que las neuronas necesitan una regulación fina del número de AMPAR especialmente en el contexto de todos los eventos de plasticidad sináptica asociados a estos receptores, que a su vez están implicados en funciones cognitivas como memoria y aprendizaje (Moretto y Passafaro, 2018). En particular, la regulación del tráfico de AMPAR desde y hacia las sinapsis se cree que es un mecanismo clave que subyace la plasticidad sináptica glutamatérgica. Los estudios en animales muestran que el tráfico juega un rol importante en la plasticidad sináptica impulsada por la experiencia y en la modificación del comportamiento.

La abundancia de los AMPAR en la superficie de las sinapsis excitatorias depende de procesos de síntesis de subunidades del receptor y procesos dinámicos de tráfico a través de los cuales los AMPAR son constantemente intercambiados entre la densidad postsináptica (PSD), la membrana plasmática sináptica (SPM) y los compartimentos intracelulares. Estas vías de tráfico involucran difusión lateral en el plano de la membrana plasmática y tráfico vesicular entre compartimentos intracelulares y la superficie neuronal. La fuerza sináptica

definida por el número y organización de los AMPAR en la PSD resulta de un equilibrio dinámico de los AMPAR entre los distintos sub-compartmentos (Humeau y Choquet, 2019).

La actividad de los AMPAR ha sido ampliamente implicada en procesos de memoria (Riedel y col, 1999). En particular, se ha demostrado el requerimiento de la actividad de los AMPAR en el hipocampo y en la amígdala para la formación de la memoria de una tarea de EI (Izquierdo y col, 1992; Bianchin y col, 1994; Izquierdo y Medina, 1995; Izquierdo y Medina, 1997; Roesler y col, 1998; Cammarota y col, 2000). Al mismo tiempo, el aprendizaje de la tarea de EI induce cambios reversibles en las propiedades de unión de los AMPAR en el hipocampo y un incremento en la expresión de la subunidad GluA1 de los AMPAR (Cammarota y col, 1996; Cammarota y col, 1998). Además, datos previos del laboratorio indicaban que la traducción proteica mediada por la actividad de mTORC1 es necesaria para incrementar los niveles de GluA1 en la sinapsis durante la consolidación de la memoria de la tarea de EI (Slipczuk y col, 2009). Con el objeto de estudiar si la síntesis proteica *de novo* de la subunidad GluA1 de los receptores AMPA era necesaria para la evocación de una memoria de EI, se infundieron oligonucleótidos antisentido para la subunidad GluA1 de los receptores AMPA (GluA1 ASO) en el hipocampo dorsal 3 horas previo al testeo realizado 48 horas después del entrenamiento en la tarea de EI. Como puede verse en la Figura 2.1, el grupo infundido con ASO GluA1 mostró un déficit en la evocación de la memoria, comparado con el grupo control infundido con oligonucleótidos sin sentido (GluA1 MSO) (Fig 2.1, GluA1 MSO vs. GluA1 ASO, $p=0,0158$, Prueba *t* de Student, $n=7$). Este resultado indica la necesidad de la síntesis de GluA1 cercana al momento de la evocación.

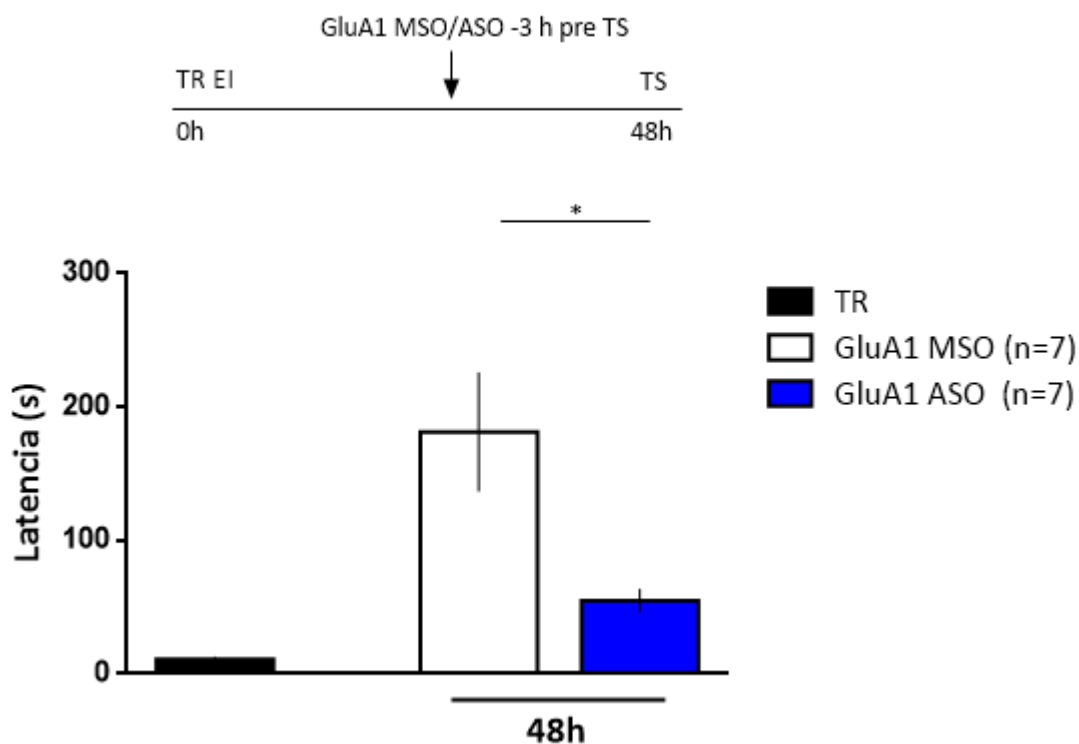


Figura 2.1. La síntesis de novo de la subunidad GluA1 del receptor AMPA es requerida para la evocación de una MLT. La infusión intrahipocampal de GluA1 ASO, pero no de GluA1 MSO 3 horas antes de la sesión de testeo llevada a cabo 48 horas posteriores al entrenamiento en la tarea de EI impide la normal expresión de la memoria. Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. GluA1 MSO vs. GluA1 ASO, $p=0,0158$, Prueba t de Student, $n=7$. Asteriscos indican diferencias significativas entre grupos. $*p<0,05$.

Como se ha señalado en la Introducción, la mayoría de los AMPAR en el hipocampo son heterómeros formados por subunidades GluA1 y GluA2. A pesar de que el rol de la subunidad GluA1 en procesos de memoria y aprendizaje ha sido más extensamente reportado, varios trabajos en el último tiempo han señalado la importancia de GluA2 para el mantenimiento de memorias establecidas en distintas regiones cerebrales (Migues y col, 2016). Teniendo en cuenta estos antecedentes y la conformación de los AMPAR, nos propusimos estudiar el requerimiento de la síntesis *de novo* de la subunidad GluA2 de los receptores AMPA durante

la evocación. Para ello, infundimos oligonucleótidos antisentido para la subunidad GluA2 de los receptores AMPA (GluA2 ASO) en el hipocampo 3 horas previo al testeo en la tarea de EI, realizado 48 horas después del entrenamiento. Como puede verse en la Figura 2.2, el grupo infundido con GluA2 ASO también mostró un déficit en la evocación de la memoria como en el caso de GluA1 ASO, evidenciado como una menor latencia a descender de la plataforma comparado con el grupo GluA2 MSO (Fig 2.2, GluA2 MSO vs. GluA2 ASO, $p=0,0071$, Prueba t de Student, $n=9$).

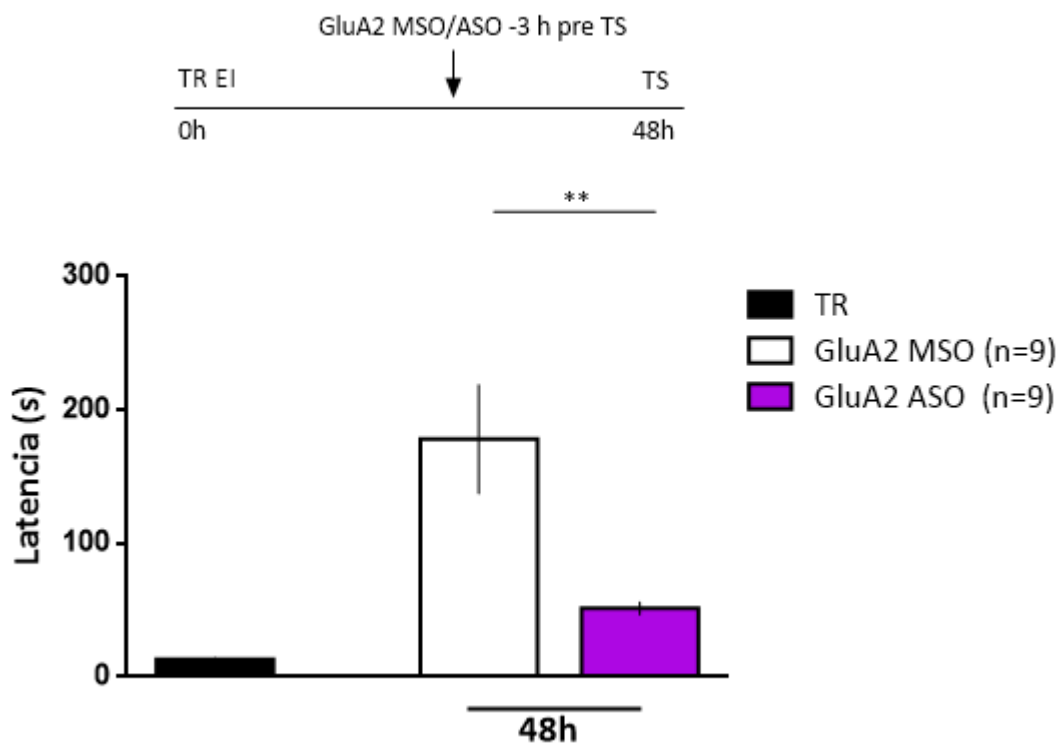


Figura 2.2. La síntesis de novo de la subunidad GluA2 del receptor AMPA es requerida para la evocación de una MLT.

La infusión intrahipocampal de GluA2 ASO, pero no de GluA2 MSO 3 horas antes de la sesión de testeo llevada a cabo 48 horas posteriores al entrenamiento en la tarea de EI impide la normal expresión de la memoria. Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. GluA2 MSO vs. GluA2 ASO, $p=0,0071$, Prueba t de Student, $n=9$. Asteriscos indican diferencias significativas entre grupos. ** $p<0,01$.

Estos dos primeros resultados del capítulo dan cuenta de la necesidad de la síntesis de ambas subunidades del receptor cercano al momento de la evocación para una normal expresión de la MLT.

La amnesia inducida por bloqueo de la síntesis *de novo* de GluA2, pero no de GluA1, es revertida por la inhibición de endocitosis de AMPAR

Teniendo en cuenta estos resultados y los procesos implicados en el ciclo de los AMPAR en las neuronas, nos preguntamos, en primer lugar, si era posible revertir el efecto observado con la inhibición de la síntesis proteica *de novo* de la subunidad GluA2. Esta inhibición de la síntesis estaría provocando que un número menor de receptores estén presentes en la membrana postsináptica al momento de la evocación. Una posible manera de compensar esta situación sería impedir que los receptores ya expresados en membrana se endociten. Para ello, llevamos a cabo un experimento de doble infusión en el cual infundimos en primer lugar los GluA2 MSO o los GluA2 ASO 3 horas antes del testeo (realizado 48 horas posteriores al entrenamiento de la tarea de EI) seguido por una infusión de vehículo o GluR23γ, un péptido que bloquea selectivamente la endocitosis de receptores AMPA que contienen GluA2, o vehículo 1 hora antes del testeo. De esta manera, quedaron conformados cuatro grupos experimentales: GluA2 MSO/Veh, GluA2 MSO/GluR23γ, GluA2 ASO/Veh y GluA2 ASO/GluR23γ. Como puede verse en la Figura 2.3, el grupo GluA2 MSO/Veh presentó una expresión normal de la memoria. El grupo GluA2 MSO/GluR23γ también mostró una expresión normal, evidenciando que el péptido GluR23γ no posee *per se* un efecto sobre la evocación de la memoria. El grupo GluA2 ASO/Veh mostró un déficit en la evocación de la

memoria (Fig 2.3, GluA2 MSO/Veh vs. GluA2 ASO/Veh, $p < 0,05$, ANOVA de 1 factor seguido de comparaciones múltiples de Newman-Keuls, $n=5-7$) de acuerdo a lo esperado y coincidente con los resultados anteriores (Fig. 2.2). La infusión del péptido GluR23 γ logró revertir el efecto amnésico de la infusión del GluA2 ASO (Fig 2.3, GluA2 ASO/GluR23 γ vs. GluA2 ASO/Veh, $p < 0.001$, ANOVA de 1 factor seguido de comparaciones múltiples de Newman-Keuls, $n=5-7$). Este resultado indica que el efecto amnésico del GluA2 ASO estaría mediado efectivamente por un cambio en los niveles de GluA2 en la membrana.

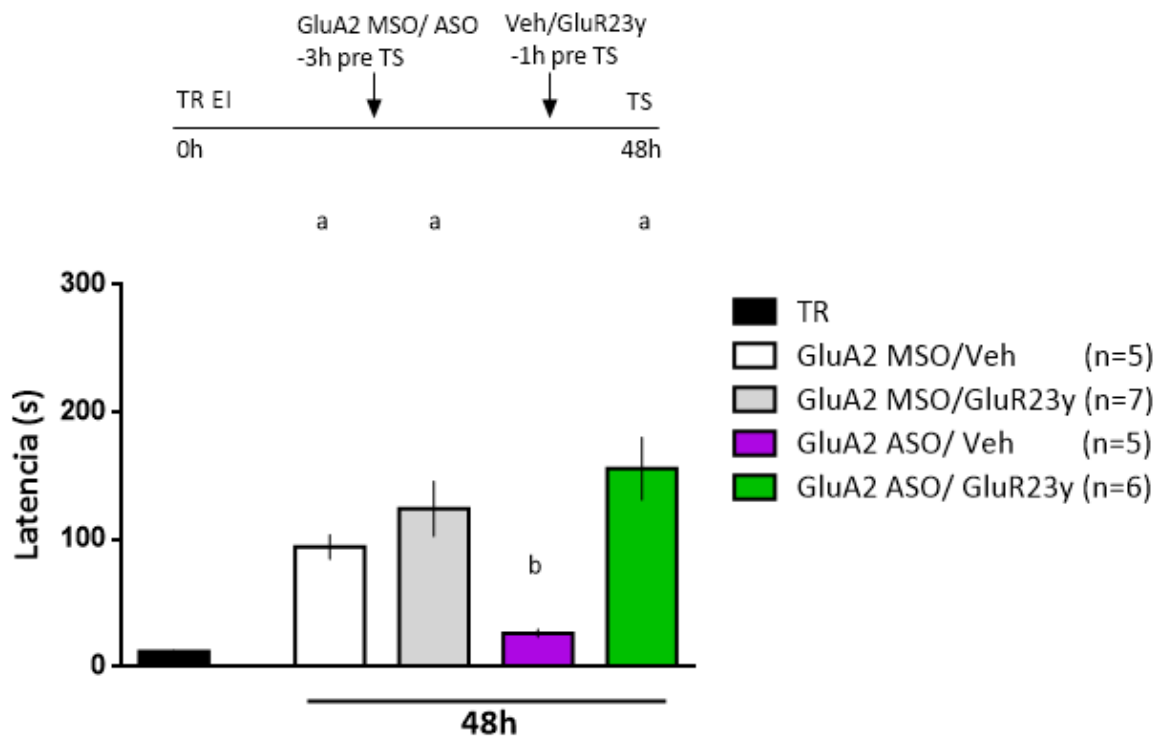


Figura 2.3. El bloqueo de la endocitosis de receptores AMPA revierte el efecto de la inhibición de la síntesis de novo de la subunidad GluA2 del receptor AMPA en la evocación de una MLT. Las ratas fueron infundidas en el hipocampo dorsal 3 horas previas al testeo realizado 48 horas posteriores al entrenamiento en la tarea de EI con GluA2 MSO o GluA2 ASO y luego 1 hora previa al testeo se les administró Veh o GluR23 γ . Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. Letras distintas indican diferencias significativas. $p < 0,05$ GluA2 ASO/Veh vs. GluA2 MSO/Veh, $p < 0.01$ GluA2 ASO/Veh vs. GluA2 MSO/GluR23 γ y $p < 0.001$ GluA2 ASO/Veh vs. GluA2 ASO/GluR23 γ . ANOVA de 1 factor seguido de comparaciones múltiples de Newman-Keuls, $n=5-7$.

Luego, quisimos evaluar si el bloqueo de la endocitosis de los AMPAR podía también revertir el efecto de inhibición de la síntesis de la subunidad GluA1. Para ello, realizamos un experimento de doble infusión en el cual infundimos en primer lugar los GluA1 MSO o los GluA1 ASO 3 horas antes del testeo (realizado 48 horas posteriores al entrenamiento de la tarea de EI) seguido por una infusión de vehículo o GluR23γ 1 hora antes del testeo. De esta manera, quedaron conformados cuatro grupos experimentales: GluA1 MSO/Veh, GluA1 MSO/GluR23γ, GluA1 ASO/Veh y GluA1 ASO/GluR23γ. Nuevamente, el grupo control (GluA1 MSO/Veh) presentó una normal expresión de la memoria a 48 horas. En este caso, el péptido GluR23γ tampoco mostró efecto *per se* en la evocación de la memoria. Como se observó también en el experimento de la Figura 2.1, la infusión de ASO GluA1 (seguida por Veh) bloqueó la expresión de la memoria. Sorprendentemente, en este caso la infusión del péptido GluR23γ no revirtió el efecto amnésico causado por el ASO GluA1, indicando que el bloqueo de la endocitosis no es suficiente para compensar la falta de síntesis *de novo* de las subunidades GluA1 (Fig 2.4, GluA1 ASO/GluR23γ vs. GluA1 ASO/Veh, $p > 0,05$, ANOVA de 1 factor seguido de comparaciones múltiples de Newman-Keuls, $n=6-9$). Por lo tanto, la subunidad GluA1 pareciera tener un rol diferente a la de la subunidad GluA2 durante la expresión de la memoria.

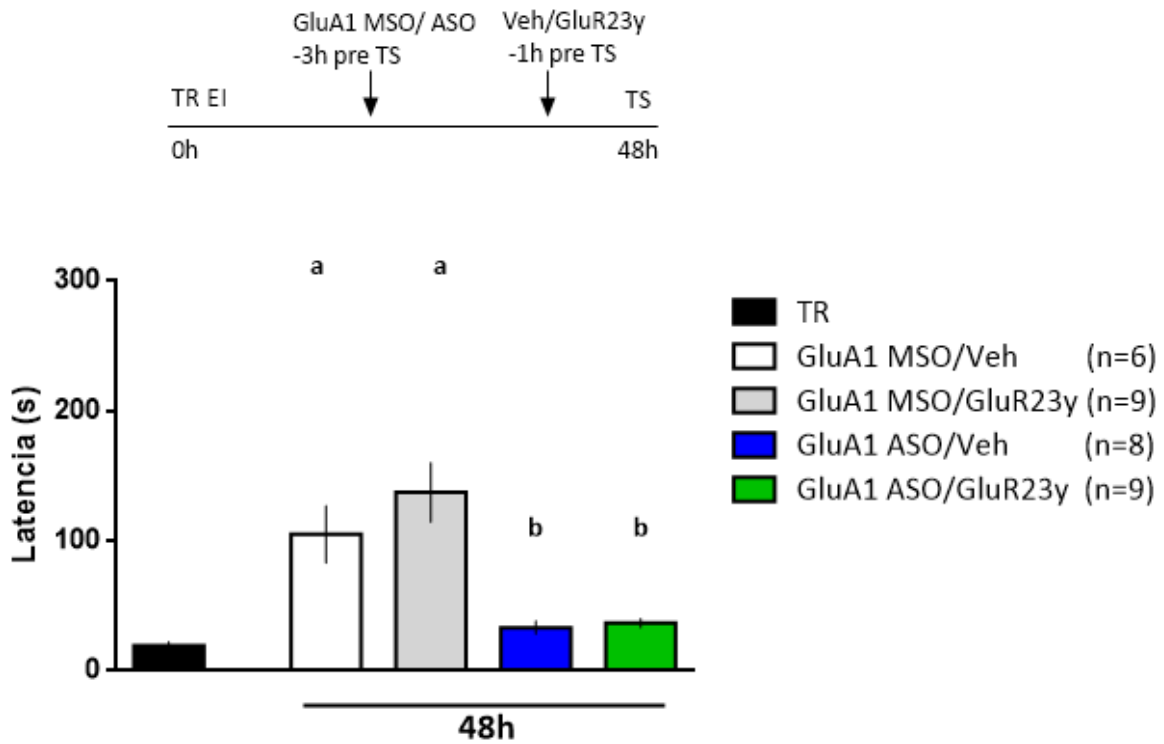


Figura 2.4. El bloqueo de la endocitosis de receptores AMPA no revierte el efecto de la inhibición de la síntesis de novo de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en la evocación de una MLT. Las ratas fueron infundidas en el hipocampo dorsal 3 horas previas al testeo realizado 48 horas posteriores al entrenamiento en la tarea de EI con GluA1 MSO o GluA1 ASO y luego 1 hora previa al testeo se les administró Veh o GluR23y. Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. Letras distintas indican diferencias significativas. $p < 0,05$ GluA1 MSO/Veh vs. GluA1 ASO/ Veh, $p < 0,01$ GluA1 MSO/Veh vs. GluA1 ASO/GluR23y y $p < 0,001$ GluA1 ASO/Veh vs. GluA1 MSO/GluR23y y GluA1 MSO/GluR23y vs. GluA1 ASO/GluR23y. ANOVA de 1 factor seguido de comparaciones múltiples de Newman-Keuls, $n=6-9$.

La inhibición de la endocitosis de AMPAR previene el efecto amnésico de la rapamicina en la evocación de una MLT

Dado que el péptido GluR23 γ logró revertir el efecto amnésico provocado por la inhibición de la síntesis *de novo* de la subunidad GluA2 y considerando el rol de la vía de mTORC1 en la síntesis proteica, nos preguntamos si el péptido GluR23 γ podría también impedir el efecto amnésico provocado por la rapamicina en la evocación de una MLT. Realizamos un experimento de doble infusión en el cual infundimos primero vehículo o el péptido GluR23 γ 1 hora antes del testeo (llevado a cabo a las 48 horas) seguido de una infusión de vehículo o rapamicina 30 minutos pre-testeo en la tarea de EI. Como se observa en la Figura 2.5, los animales infundidos con Veh/Veh mostraron una normal expresión de la memoria al igual que los animales infundidos con GluR23 γ /Veh. Los animales infundidos con Veh/Rapa mostraron un déficit en la retención de la memoria. La infusión de GluR23 γ previno el efecto amnésico de la rapamicina (Fig 2.5, GluR23 γ /Veh vs. Rapa/Veh, $p < 0,05$, ANOVA de 1 factor seguido de comparaciones múltiples de Newman-Keuls, $n = 7-9$). Este resultado marca un paralelismo entre el efecto de la inhibición de la síntesis *de novo* de la subunidad GluA2 de los AMPAR y el efecto de la inhibición de la vía de mTORC1 en la evocación de una MLT.

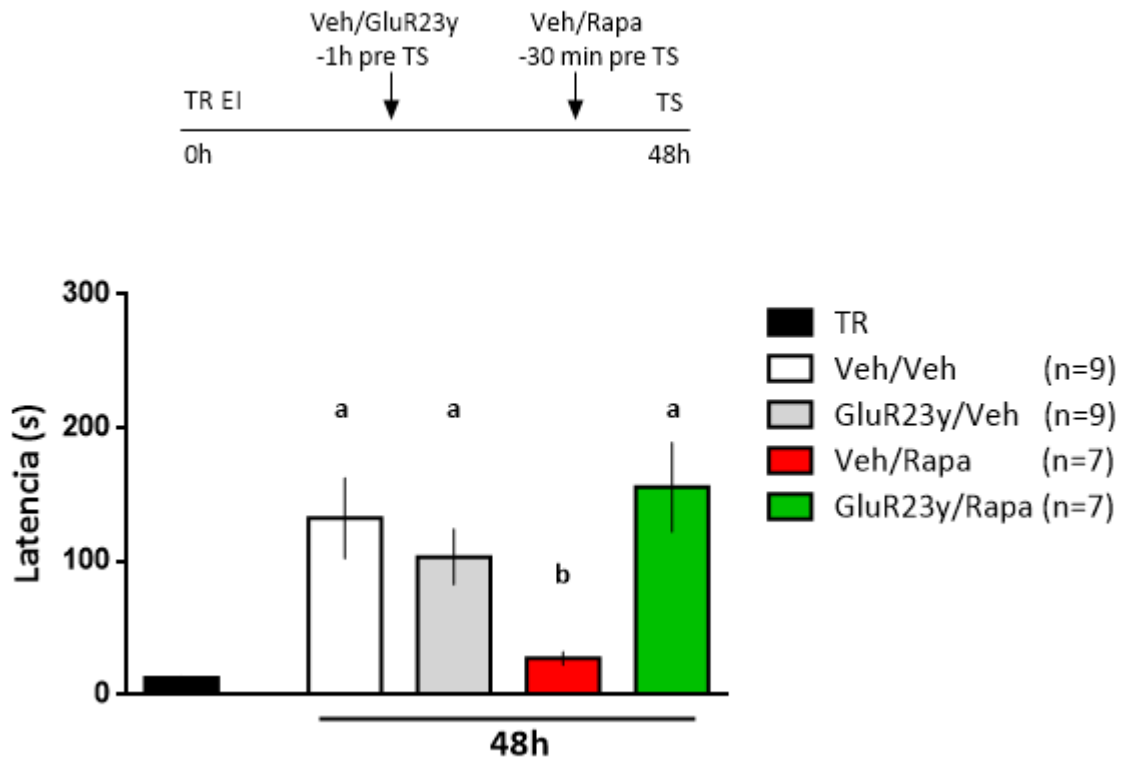


Figura 2.5. El bloqueo de la endocitosis de receptores AMPA previene el efecto amnésico de la rapamicina en la evocación de una MLT. Las ratas fueron infundidas primero con vehículo o GluR23y 1 hora antes del testeo realizado 48 horas posteriores al entrenamiento en la tarea de EI. Luego, 30 minutos antes del testeo se las infundió con vehículo o rapamicina. Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeo. Letras distintas indican diferencias significativas. Veh/Rapa vs. Veh/Veh, Veh/Rapa vs. GluR23y/Veh y Veh/Rapa vs. GluR23y/Rapa, $p < 0,05$, ANOVA de 1 factor seguido por comparaciones múltiples de Newman-Keuls, $n = 7-9$.

Cambios en la expresión de GluA1 y GluA2 asociados a la inhibición de la vía de mTORC1 durante la evocación de una MLT

Con el objetivo de explorar la potencial relación entre la vía de mTORC1 y la síntesis de las subunidades de los AMPAR, realizamos un experimento combinando abordajes farmacológicos y bioquímicos, para medir los niveles de las distintas subunidades luego de la inhibición de la vía de mTORC1 cercana al momento de la evocación de una MLT. Se entrenó a los animales en la tarea de EI y luego se infundió vehículo o rapamicina 30 minutos antes de un testeo realizado a 48 horas (Fig 2.6). Inmediatamente terminado el testeo, se procedió a eutanasiar a los animales y se extrajo el hipocampo dorsal. Luego, se procedió a hacer un análisis bioquímico de los niveles de GluA1 y GluA2 en las distintas fracciones subcelulares de interés: densidad postsináptica (PSD), membrana plasmática sináptica (SPM) y homogenato total. Los resultados en cada caso serán descritos en las siguientes subsecciones.

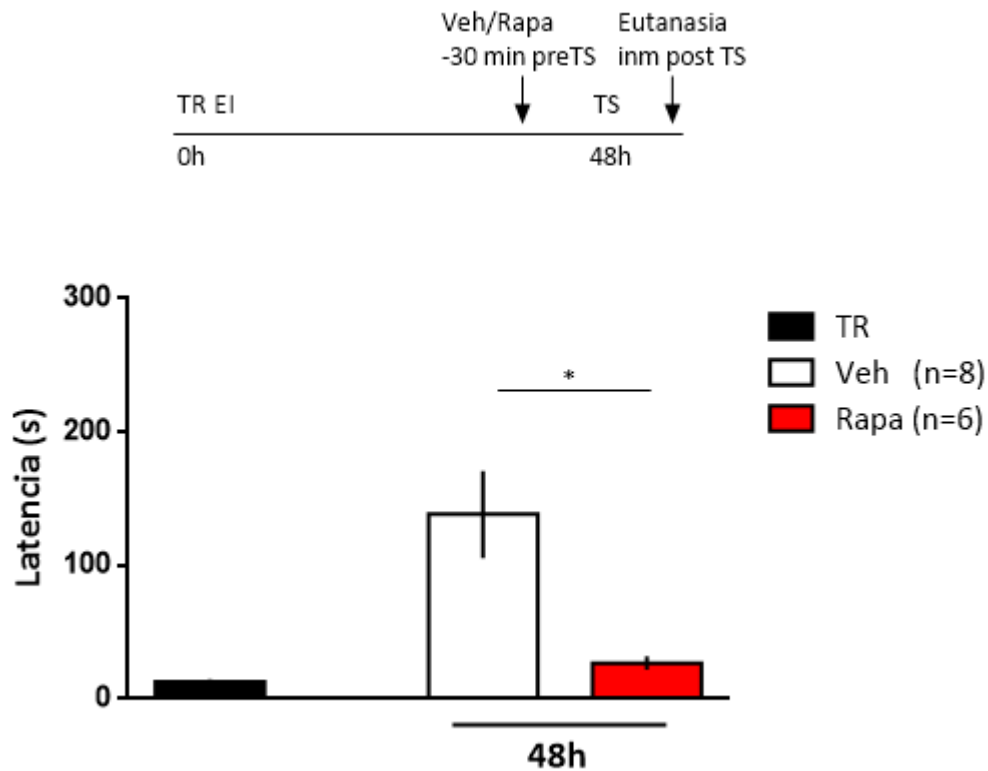


Figura 2.6. Experimento conductual bloqueando la vía de mTORC1 antes de la evocación de una MLT realizado para extraer muestras para análisis bioquímicos de los niveles de los receptores AMPAR. Las ratas fueron infundidas con vehículo o rapamicina 30 minutos antes del testeado realizado 48 horas posteriores al entrenamiento en la tarea de EI. Luego, inmediatamente después de testearlas se procedió a realizar eutanasia para realizar mediciones bioquímicas de los niveles de expresión de las distintas subunidades del AMPAR. Los datos se expresan como la media \pm SEM de la latencia del entrenamiento o el testeado. *, $p < 0,05$, Prueba t de Student, $n = 6-8$.

Disminución en los niveles de GluA1 en la PSD asociada a la inhibición de mTORC1 durante la evocación de una MLT

En primer lugar, quisimos determinar si la inhibición de la señalización de mTORC1 en el hipocampo tenía algún efecto sobre los niveles de la subunidad GluA1 de los AMPAR en la PSD. Como puede apreciarse en la Figura 2.7, se registró una caída en los niveles de GluA1 en

la PSD en animales que habían sido infundidos con rapamicina en comparación con el grupo vehículo (Fig.2.7, $p < 0,05$, Veh vs Rapa, ANOVA de 2 factores, $n=6-8$).

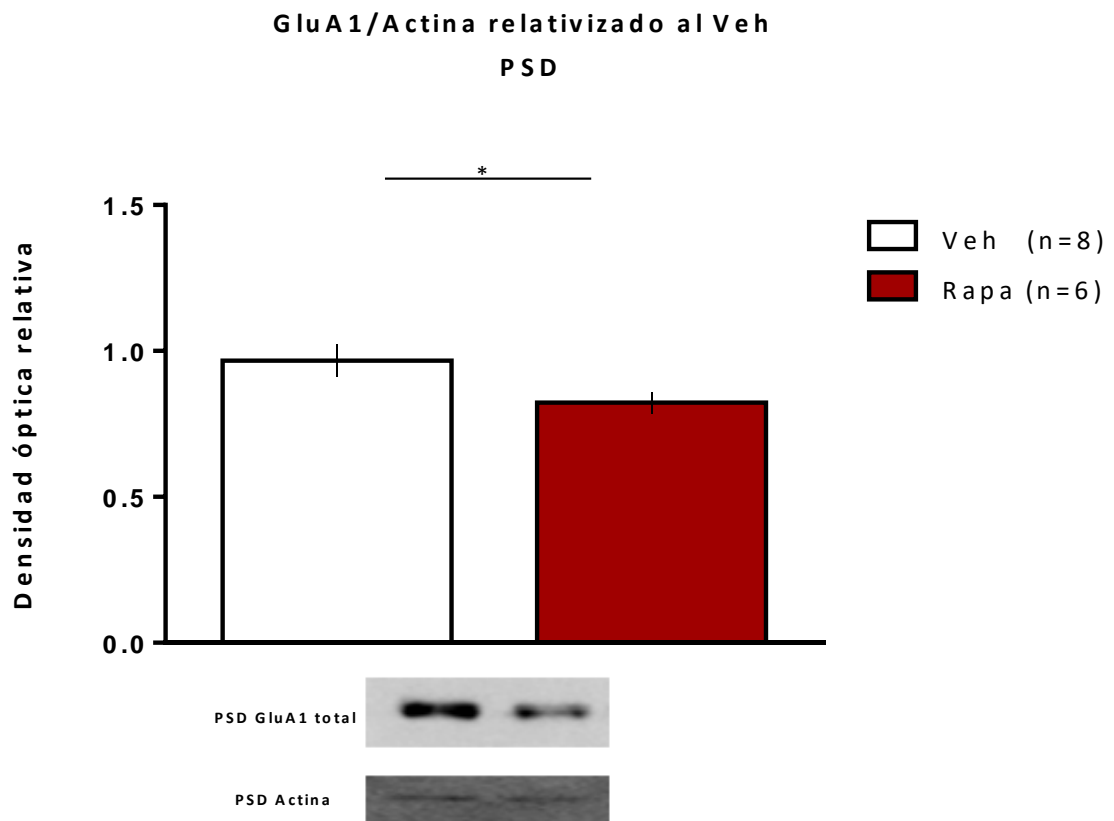


Figura 2.7. Niveles de GluA1 en la fracción de PSD. Niveles proteicos de GluA1 totales relativos al Veh y a los niveles de actina. Abajo se muestran bandas representativas de los *western blots* correspondientes a Veh (izquierda) y a Rapa (derecha) tanto para GluA1 total como para Actina. Los datos se expresan como la media \pm SEM de los niveles de GluA1.

* , $p < 0,05$, Veh vs. Rapa, ANOVA de 2 factores, $n=6-8$.

Incremento en los niveles de GluA2 en la PSD asociado a la inhibición de mTORC1 durante la evocación de una MLT

Luego, quisimos estudiar si la inhibición de la vía de mTORC1 inducía alteraciones en los niveles de la subunidad GluA2 de los AMPAR en la fracción de PSD. La infusión de rapamicina 30 minutos antes del testeo en la tarea de El provocó un incremento en los niveles de de la subunidad GluA2 de los AMPAR en la PSD en comparación con los animales infundidos con vehículo (Fig 2.8, $p < 0.05$, Veh vs. Rapa, ANOVA de 2 factores, $n=10$). Este resultado podría deberse a un efecto compensatorio en respuesta a la caída de los niveles de GluA1 observados en la Figura 2.7.

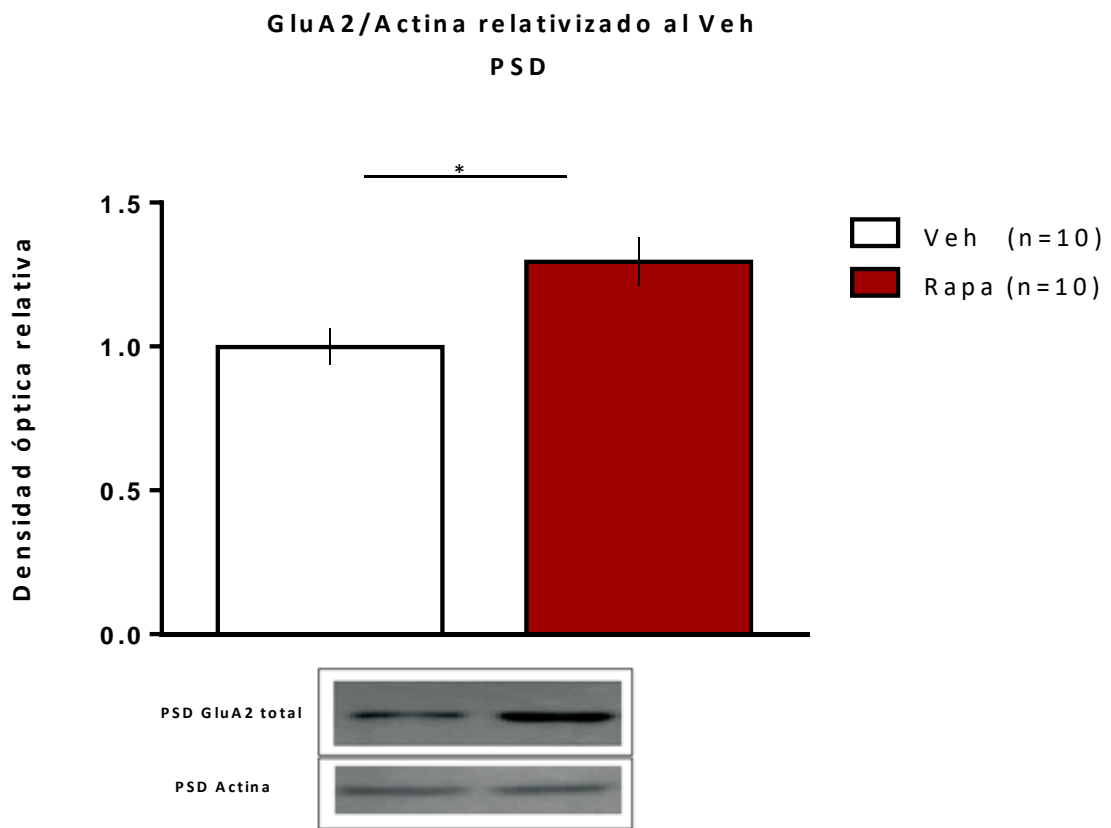


Figura 2.8. Niveles de GluA2 totales en la fracción de PSD. Niveles proteicos (densidad óptica) de GluA2 totales relativos al Veh y a los niveles de Actina. Abajo se muestran bandas representativas de los *western blots* correspondientes a Veh (izquierda) y a Rapa (derecha) tanto para GluA2 total como para Actina. Los datos se expresan como la media \pm SEM de los niveles de GluA2. *, $p < 0.05$, Veh vs. Rapa, ANOVA de 2 factores, $n = 10$.

Disminución en los niveles de GluA1 en la SPM asociada a la inhibición de mTORC1 durante la evocación de una MLT

Posteriormente, quisimos evaluar si los niveles de la subunidad GluA1 de los AMPAR sufrían modificaciones luego de la inhibición de la vía de mTORC1 durante la evocación en la fracción de SPM. Como se ve en la Figura 2.9, los animales infundidos con rapamicina presentaron niveles de GluA1 significativamente menores que los infundidos con vehículo en

la SPM (Fig.2.9, $p < 0,05$, Veh vs Rapa, ANOVA de 2 factores, $n=8$). Este resultado es consistente con la caída en los niveles de GluA1 en la fracción de la PSD (Fig.2.7).

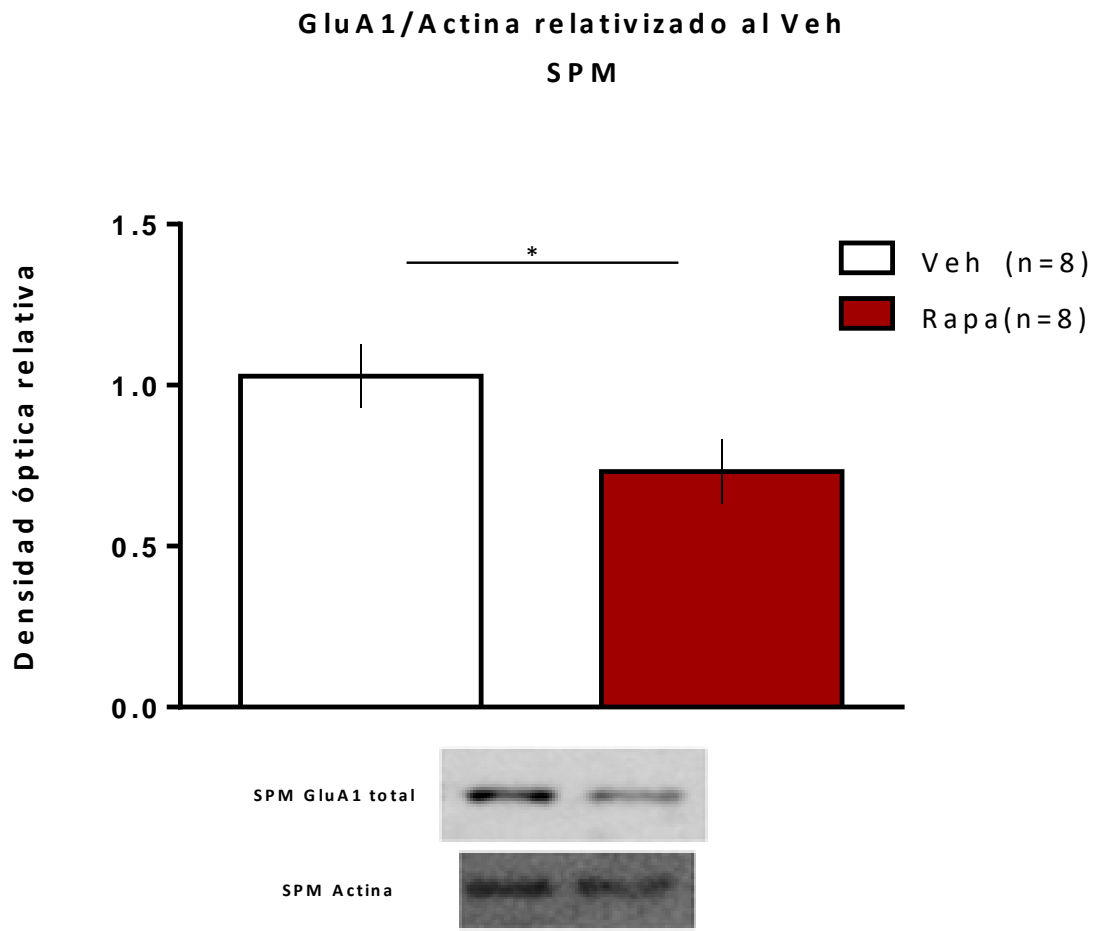


Figura 2.9. Niveles de GluA1 totales en la fracción de SPM. Niveles proteicos de GluA1 totales relativos al Veh y a los niveles de Actina. Abajo se muestran bandas representativas de los *western blots* correspondientes a Veh (izquierda) y a Rapa (derecha) tanto para GluA1 total como para Actina. Los datos se expresan como la media \pm SEM de los niveles de GluA1. Veh vs. Rapa *, $p < 0.05$, Veh vs. Rapa, ANOVA de 2 factores, $n=8$.

Los niveles de GluA2 en la SPM no se vieron alterados con la inhibición de mTORC1 durante la evocación de una MLT

Al analizar si los niveles de la subunidad GluA2 de los AMPAR se alteraban luego de la inhibición de la vía de mTORC1 durante la evocación en la fracción de SPM, no encontramos diferencias significativas en los niveles proteicos de GluA2 entre el grupo vehículo y rapamicina (Fig 2.10, $p > 0.05$, Veh vs. Rapa, ANOVA de 2 factores, $n=8$). Teniendo en cuenta los hallazgos reportados con GluA1, este resultado puede estar asociado a un cambio en los niveles de la subunidad GluA1 mucho más marcado que en la subunidad GluA2, donde el cambio registrado en la PSD no se observa en la fracción de la SPM.

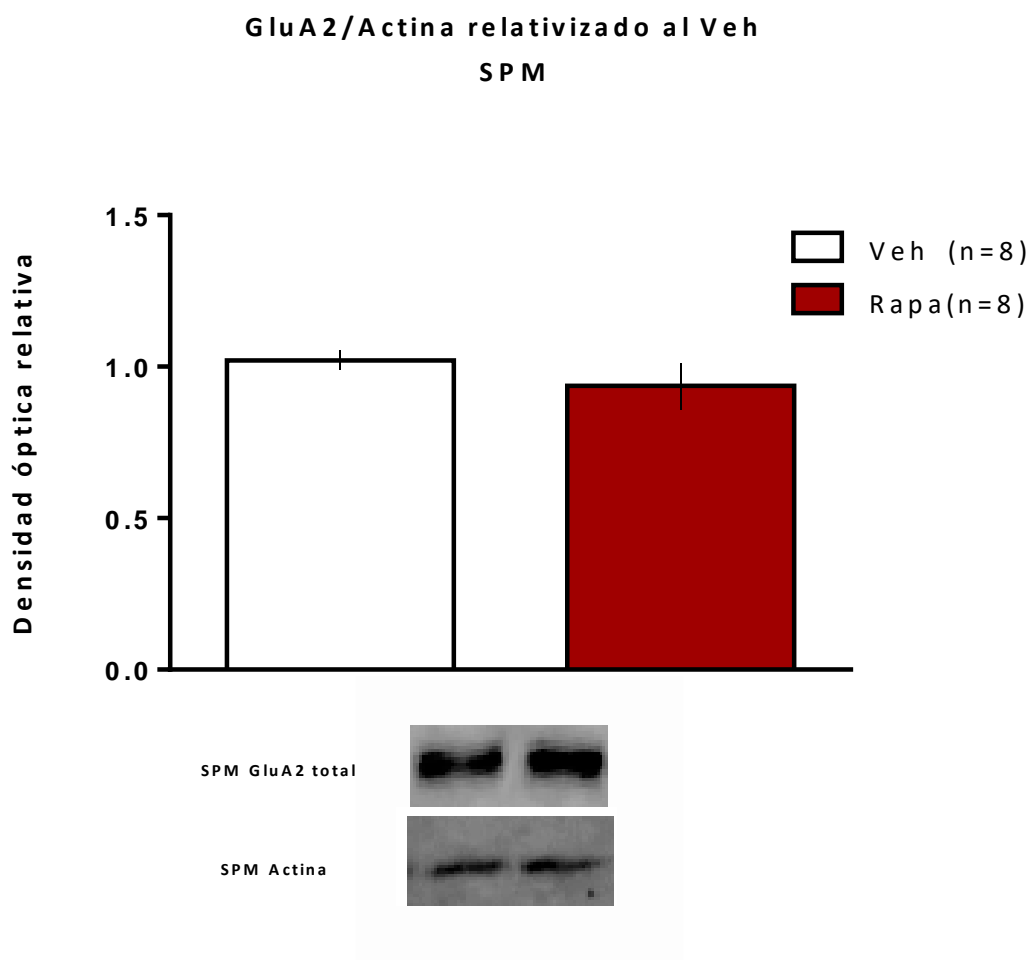


Figura 2.10. Niveles de GluA2 totales en la fracción de SPM. Niveles proteicos de GluA2 totales relativos al Veh y a los niveles de Actina. Abajo se muestran bandas representativas de los *western blots* correspondientes a Veh (izquierda) y a Rapa (derecha) tanto para GluA2 total como para Actina. Los datos se expresan como la media \pm SEM de los niveles de GluA2. Veh vs. Rapa *, $p > 0.05$, Veh vs. Rapa, ANOVA de 2 factores, $n = 8$.

Los niveles de GluA1 y GluA2 en el homogenato total permanecieron inalterados con la inhibición de mTORC1 durante la evocación de una MLT

Por último, procedimos a evaluar los niveles de ambas subunidades (GluA1 y GluA2) de los AMPAR en la fracción de homogenato total luego de la inhibición de la vía de mTORC1 durante la evocación. Como puede verse tanto en la Figura 2.11 como en la Figura 2.12 los niveles de las subunidades no difirieron entre los grupos infundidos con vehículo o rapamicina ($p > 0.05$, Veh vs. Rapa, ANOVA de 2 factores, $n=9$ para GluA1 y $n=10-11$ para GluA2).

**GluA1/Actina relativizado al Veh
Homogenato total**

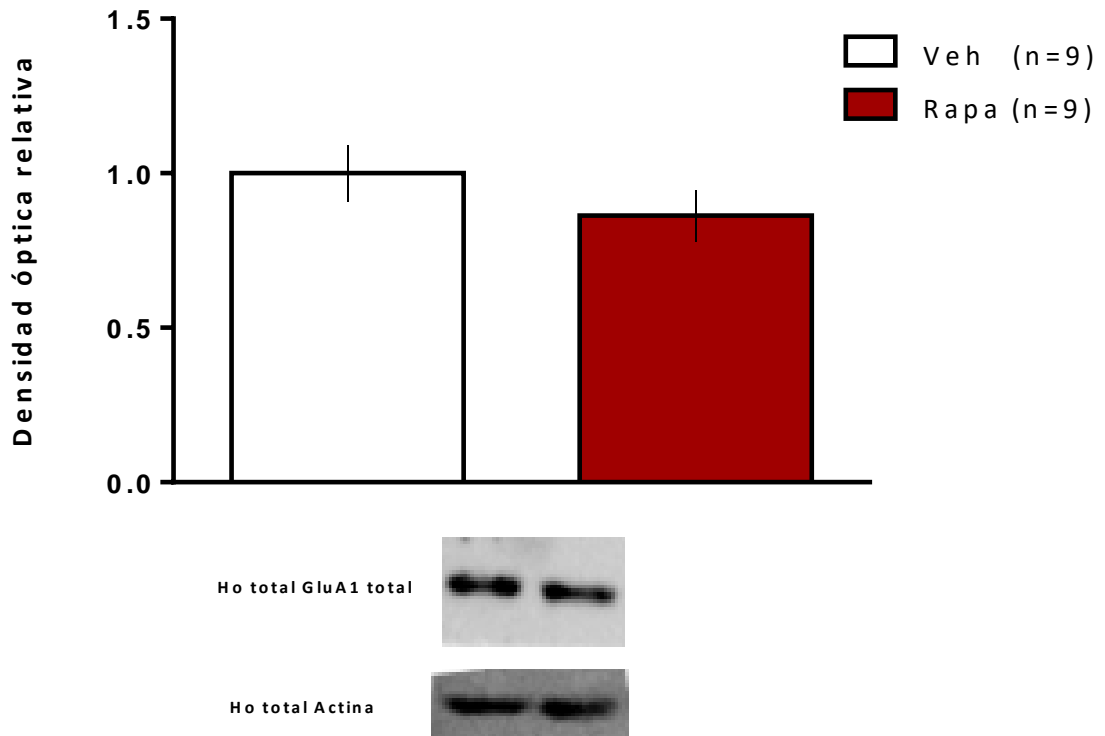


Figura 2.11. Niveles de GluA1 totales en la fracción de Ho total. Niveles proteicos de GluA1 totales relativos al Veh y a los niveles de actina. Abajo se muestran bandas representativas de los *western blots* correspondientes a Veh (izquierda) y a Rapa (derecha) tanto para GluA1 total como para Actina. Los datos se expresan como la media \pm SEM de los niveles de GluA2. $p > 0.05$, Veh vs. Rapa, ANOVA de 2 factores, $n = 9$.

GluA2/Actina relativizado al Veh
Homogenato total

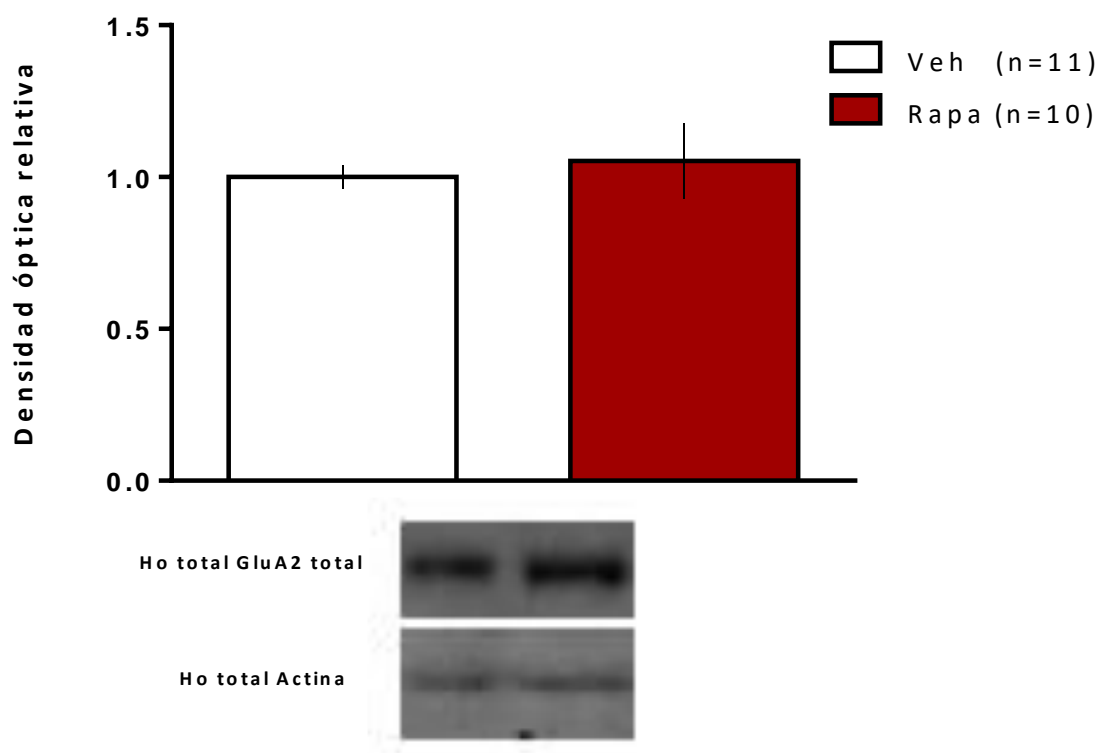


Figura 2.12. Niveles de GluA2 totales en la fracción de Ho total. Niveles proteicos de GluA2 totales relativos al Veh y a los niveles de Actina. Abajo se muestran bandas representativas de los *western blots* correspondientes a Veh (izquierda) y a Rapa (derecha) tanto para GluA2 total como para Actina. Los datos se expresan como la media \pm SEM de los niveles de GluA2. $p > 0.05$, Veh vs. Rapa, ANOVA de 2 factores, $n = 10-11$.

En resumen, en este capítulo demostramos en primer lugar, el requerimiento de la síntesis *de novo* tanto de la subunidad GluA1 como de la subunidad GluA2 al momento de la evocación de una MLT en una tarea de EI. La amnesia generada por la falta de síntesis *de novo* de la subunidad GluA2 pudo ser revertida con la infusión del péptido GluR23 γ , que bloquea la endocitosis de los AMPAR que contienen GluA2. En contraposición, la amnesia generada por

la falta de síntesis *de novo* de la subunidad GluA1 no pudo ser revertida con la infusión del péptido GluR23γ, indicando distintos roles de las subunidades GluA1 y GluA2 en la evocación de la memoria y sugiriendo que la subunidad GluA1 podría ser la limitante en el ensamblado de los AMPAR GluA1/GluA2. Cabe destacar que en ambos experimentos hemos podido corroborar que el péptido GluR23γ no tiene efecto *per se* en la evocación de una MLT. De manera similar a lo que ocurría con la reversión de la amnesia generada por la falta de síntesis *de novo* de la subunidad GluA2, la amnesia generada por la inhibición de la vía de mTORC1 pudo ser prevenida por la infusión del péptido GluR23γ. Finalmente, evaluamos los niveles proteicos de cada subunidad luego de la inhibición de la vía de mTORC1 durante la evocación de la MLT. En la fracción de PSD, en animales infundidos con rapamicina registramos una caída en los niveles de GluA1 y un incremento en los niveles de GluA2. En la fracción de SPM, la caída de GluA1 se mantuvo en los animales infundidos con rapamicina, evidenciando que el cambio en esta subunidad podría ser más rotundo o estar afectando a la sinapsis de manera más contundente. En cambio, en la fracción de la SPM, los niveles de la subunidad GluA2 no se vieron alterados. En la fracción de homogenato total, no observamos diferencias en los niveles de ninguna de las subunidades entre los grupos vehículo y rapamicina.

DISCUSIÓN

La actividad de mTORC1 es necesaria para la evocación de una MLT

La capacidad de recordar eventos pasados es de gran importancia para nuestra singularidad como individuos. En este sentido, la evocación es crítica para estudiar la memoria: sin evocación no es posible afirmar que tengamos una memoria determinada.

En esta tesis nos propusimos comprender el rol de la vía de mTORC1 en la evocación de la memoria, así como también explorar la relación de la vía de mTORC1 con los eventos moleculares críticos asociados a cambios en los AMPAR subyacentes al proceso de evocación. En la primera parte de este trabajo estudiamos los efectos de la administración de rapamicina en tiempos cercanos al testeo con un abordaje fármaco-conductual. Encontramos que la actividad de mTORC1, a través de su acción sobre la síntesis proteica, es necesaria al momento de la evocación y que el efecto amnésico de la rapamicina es transitorio. Posteriormente, ahondamos en la caracterización de la amnesia generada por la inhibición de la vía de mTORC1, delimitando la ventana temporal de acción de la rapamicina y determinando qué tipos de memorias son susceptibles a su efecto. En el segundo capítulo, describimos el rol de distintas subunidades de los AMPAR en la evocación, así como su posible regulación por mTORC1. Así, reportamos el papel crucial de la síntesis *de novo* de las subunidades GluA1 y GluA2 de los AMPAR al momento de la evocación, postulando su rol como posibles mediadores de cambios plásticos que subyacen la evocación de una MLT. Complementamos el estudio con técnicas de Western Blot para evaluar los niveles de estas subunidades durante el tratamiento amnésico con rapamicina cerca del momento de la

evocación y encontramos cambios en los niveles de las subunidades en las fracciones de la PSD y la SPM.

Uno de los principales hallazgos de la presente tesis es que dos inhibidores de la síntesis proteica mecánica y estructuralmente distintos infundidos en el hipocampo dorsal antes del testeo impidieron la evocación de la memoria de la tarea de EI. Las amnesias generadas tanto por un inhibidor de la síntesis proteica general, emetina como por un inhibidor selectivo de mTORC1, rapamicina, fueron similares. Estos resultados son novedosos porque como mencionamos en la Introducción, existen en la bibliografía muy pocos trabajos sobre el papel de mTORC1 y más específicamente de la síntesis proteica durante la evocación de la memoria. El efecto de la rapamicina sobre la evocación de la MLT no puede explicarse por alteraciones en la actividad locomotora o exploratoria, ya que la rapamicina no tuvo un efecto perceptible sobre la locomoción y la exploración en un campo abierto. Nuestros resultados son consistentes con los reportados por el grupo de Nader (2015) en amígdala en otra tarea también aversiva (condicionamiento auditivo de miedo) con la infusión de rapamicina realizada también un tiempo muy corto antes de la evocación (López y col, 2015). En contraposición, otros autores infundieron rapamicina 15 minutos antes de un testeo realizado a las 24 horas en la tarea de evitación inhibitoria tanto en la amígdala como en el hipocampo y no encontraron diferencias entre los grupos rapamicina y vehículo (Jobim y col, 2012). Estas diferencias con nuestros resultados pueden ser debidas a la concentración de rapamicina utilizada (en este caso, ellos utilizan una dosis 5 veces mayor a la nuestra), al peso distinto de las ratas (ellos utilizan la misma cepa que nosotros pero con un peso mayor, que oscila los 400g, un hecho que tiene sentido con la mayor concentración de la droga administrada), distintas condiciones experimentales informadas (aquí la duración del shock es de 2 segundos

mientras que en nuestros experimentos es de 3 segundos) u otros detalles que no se informan y que puedan alterar a los animales o estresarlos. Por último, otros autores infundieron vehículo o rapamicina 30 minutos antes de un testeo realizado 48 horas posteriores al entrenamiento en la tarea de condicionamiento auditivo de miedo y no observaron diferencias entre los grupos (MacCallum y col, 2014). Sin embargo, aquí las diferencias encontradas con nuestros datos pueden deberse a que la infusión de rapamicina era sistémica y los animales utilizados eran ratones.

Dado que nos interesaba caracterizar el rol de la síntesis proteica local y transitoria en el procesamiento de la evocación de la memoria, elegimos usar el inhibidor específico de la vía de mTORC1, la rapamicina, que además presenta menos efectos inespecíficos que la emetina.

Otro hallazgo importante radica en el hecho de que un retesteo llevado a cabo 5 horas posteriores al primer test mostró una recuperación en la evocación de la memoria de largo término en animales que habían sido infundidos con rapamicina 15 minutos antes del primer testeo. Este resultado es original ya que existen pocos reportes en la literatura sobre el efecto de corto plazo de la rapamicina sobre la memoria en general y menos aún en la evocación. Otros autores que trabajaron con la tarea de condicionamiento auditivo de miedo en amígdala en ratas también realizaron un retesteo, pero 3 horas posteriores al primero y obtuvieron resultados similares (López y col, 2015). En cambio, cuando realizamos un retesteo con animales que habían sido infundidos con emetina no vimos una reversión del efecto sobre la evocación de la memoria. Esto puede deberse en parte al efecto irreversible de la emetina reportado por algunos autores (Alberini, 2008). Si bien nosotros vemos que la media de la latencia en el retesteo es mayor que la media en el testeo, aunque esta diferencia no sea significativa, creemos que esa diferencia aparente no tiene relevancia biológica en nuestros

datos dado que, al comparar punto a punto, animal por animal, solo 2 animales de 6 pudieron volver a evocar de la memoria.

Confirmamos que incluso memorias que ya habían sido expresadas eran susceptibles al efecto del bloqueo de la vía de mTORC1. Esto nos permitió validar que la rapamicina estaba actuando sobre una memoria con normal expresión plausible de ser afectada y que los resultados observados se deben a que la evocación está siendo bloqueada.

Luego estudiamos el curso temporal de acción de la rapamicina corriendo el tiempo de infusión a puntos más lejanos. Hallamos que existe una ventana temporal de acción acotada para el efecto de la rapamicina que llega hasta por lo menos los 40 minutos previos al testeo, pero no a las 3 horas antes del testeo donde no observamos ningún efecto conductual sobre la evocación de la memoria. Este resultado sugiere que la maquinaria de la vía de mTORC1 es necesaria en tiempos cercanos a la evocación para garantizar la síntesis proteica local que de lugar a un pool necesario y suficiente de proteínas relacionadas con plasticidad para que la evocación tenga lugar. Infundiendo 3 horas antes del testeo, la rapamicina no se encontraría más en el sistema al momento de la evocación o aún con la rapamicina remanente en sistema el número de ribosomas afectados sería bajo y permitiría niveles de síntesis proteica apropiados para que la evocación tenga lugar.

Encontramos que el efecto amnésico de rapamicina es selectivo para memorias de largo término tanto para la tarea de EI como para la de REO dado que la evocación de MCT no se vio afectada por las infusiones de rapamicina en el hipocampo dorsal, lo que sugiere que la actividad de mTORC1 no es necesaria para la expresión de la memoria cuando se testea en tiempos cortos después del entrenamiento. Este resultado es consistente con los trabajos que indican que la MCT no depende de la nueva síntesis de proteínas (Quevedo y col, 2004). Es

interesante observar que varios experimentos de comportamiento en roedores indican la participación de la vía de mTORC1 en la formación, consolidación y reconsolidación de MLT, pero no en MCT, confirmando los distintos requerimientos de los dos tipos de memorias en cuanto a síntesis de proteínas (Quevedo y col, 2004).

Al evaluar MLT a tiempos más lejanos del aprendizaje hallamos que infundiendo rapamicina antes de un testeado realizado a 7 o 14 días, la retención de estas memorias se veía afectada. Sorprendentemente, en cada punto de tiempo testeado, el efecto de la infusión de rapamicina en la evocación de la memoria fue transitorio ya que un nuevo testeado llevado a cabo 5 horas luego del primero mostró una recuperación completa en la retención de la memoria. Este hallazgo respalda la idea de que la infusión de rapamicina en el hipocampo dorsal no produjo un daño funcional o anatómico y es coherente con el hecho de que la administración de rapamicina 3 horas antes del testeado no tuvo ningún efecto en la expresión de la memoria, lo que sugiere además que la rapamicina tiene una acción limitada después de su infusión *in vivo*.

Contrariamente al efecto amnésico de la rapamicina administrada 15 minutos antes del testeado a las 24 horas, 2, 7 o 14 días, la actividad de mTORC1 en el hipocampo no fue requerida para la evocación de la memoria de EI cuando los animales se testearon 28 días después del entrenamiento, probablemente porque la traza de la memoria no se encuentra en el hipocampo dorsal 4 semanas después del entrenamiento de EI. Curiosamente, este punto temporal coincide con el período de tiempo en el que el hipocampo se vuelve totalmente insensible al efecto amnésico de las infusiones previas de CNQX o muscimol (Bianchin y col, 1993; González y col, 2015). Nuestros hallazgos actuales usando rapamicina también son consistentes con los experimentos que muestran que la interrupción de la función del

hipocampo afectó principalmente la MLT reciente sin afectar la MLT remota (Frankland y Bontempi, 2005; Squire y Bayley, 2007; Sutherland y col, 2001) aunque un grupo reportó la disrupción reversible de la evocación de la memoria remota por una breve inhibición optogenética del área CA1 hipocampal (Goshen y col, 2011).

Además, hemos demostrado que el efecto de rapamicina puede extenderse a una tarea con valencia distinta a la de la tarea de EI y no aversiva, como es el caso de la memoria de REO, ya que la infusión intrahipocampal de rapamicina antes de la sesión de testeo impidió la evocación de una MLT. Estos resultados están en línea con los reportados por otros autores con administración i.p de rapamicina 30 minutos antes de un testeo en una tarea de un laberinto múltiple en forma de T (multiple T-maze), donde observaron que la evocación se veía afectada pero la consolidación estaba intacta (Deli y col, 2012). Sin embargo, encontramos en la literatura autores que no reportan diferencias en la evocación de la MLT infundiendo rapamicina 15 minutos antes del testeo a 24 horas tanto en la amígdala como en el hipocampo en la tarea de reconocimiento novedoso de objetos (NOR) (Jobim y col, 2012). Es notable que los mismos autores sí reportan el requerimiento de la vía de mTORC1 en el hipocampo y en la amígdala para la consolidación de esa tarea de NOR, pero no así para la evocación. Las diferencias entre estos resultados y los nuestros pueden deberse obviamente a que la tarea es distinta y puede suceder que el mayor componente espacial de la tarea de REO implique más al hipocampo durante la evocación que en la tarea de NOR. De todos modos, también cabe la posibilidad que existan diferencias en las condiciones experimentales de los laboratorios que estén relacionadas con los distintos resultados no solamente obtenidos en la tarea de NOR si no también en la de EI, como ya ha sido previamente reportado y discutido. Es interesante notar que nuestros resultados en la tarea de REO, tanto

en la evaluación de MLT como MCT son coincidentes con los resultados obtenidos en la tarea de EI. Considerando nuestros hallazgos actuales, el efecto del bloqueo de mTORC1 en la expresión de la memoria parece ser independiente de la valencia de la memoria y, por lo tanto, el rol de la vía mTORC1 en esta fase de memoria puede generalizarse a varias formas de tareas de aprendizaje asociativo.

Algunos autores han explicado ciertos tipos de amnesias retrógradas teniendo en cuenta el estado interno fisiológico del animal que prevalece inmediatamente antes, durante y después del entrenamiento como una posible clave interna para el animal importante a la hora de la evocación (Millin y col, 2001; Riccio y col, 2003). El agente amnésico podría crear un ambiente que no esté presente al momento del testeo y eso podría ser la causa de que el animal no logre evocar correctamente. Considerando esta teoría llevamos a cabo un experimento para evaluar si los efectos que nosotros observamos con la administración de la rapamicina se podían explicar por cambios en el estado interno del animal, pero no observamos que fuera el caso de nuestros datos.

En conclusión, nuestros hallazgos actuales extienden los de López y col (2015), quienes demostraron que la anisomicina y la rapamicina administradas en la amígdala antes del testeo impidieron la expresión de una memoria de condicionamiento auditivo del miedo. Es importante aclarar que demostramos que ninguno de los efectos que observamos en nuestros datos puede deberse a un cambio interno en el animal debido a la administración de fármacos ni a problemas motores o de exploración. Además, teniendo en cuenta que la inhibición de mTORC1 en la corteza retrosplenial antes del testeo afectó la evocación de memoria y que la rapamicina también afectó la evocación de una memoria de reconocimiento

espacial de objetos, sugerimos que el requerimiento de la vía de mTORC1 en la evocación de la memoria es una característica más general de la expresión de memoria en mamíferos.

¿Cuáles son los reguladores río arriba de la actividad de mTORC1? Los activadores extracelulares de la vía mTORC1 con relevancia para la evocación de la memoria incluyen al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y al glutamato (Takei y col, 2004; Lenz y Avruch, 2005; Slipcuk y col, 2009). mTORC1 en las dendritas se activa mediante la acción del glutamato en los receptores NMDA para controlar el proceso de LTP (Gong y col, 2006) y la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato da como resultado la activación de las vías ERK y AKT-mTOR que controlan la síntesis de proteínas y los procesos de LTD (Hou y Klann, 2004; Banko y col, 2005). Los activadores intracelulares de mTORC1 como ERK 1/2 y AKT también tienen importantes efectos moduladores en la expresión de la memoria de EI (Szapiro y col, 2002).

Una visión predominante nos dice que la evocación de la memoria implica la reconstrucción de patrones de actividad cerebral producidos durante el aprendizaje inicial (Tulving, 1985; Dudai, 2002). En otras palabras, la reactivación de ensamblajes distribuidos de neuronas en diferentes regiones del cerebro que estaban activos durante el aprendizaje inicial es necesaria para la expresión posterior de la memoria. Si este es el caso, ¿cómo se generan y controlan los patrones de actividad en el hipocampo durante la recuperación? Hace muchos años, se sugirió que todos o parte de los mecanismos que ocurrían durante la codificación debían restablecerse en el momento de la recuperación para evocar con éxito la memoria (Spear, 1973). Los datos farmacológicos y moleculares de la literatura muestran que los cambios bioquímicos subyacentes a la consolidación de EI son en parte similares a los de la evocación. De hecho, algunos tipos de receptores de glutamato y la actividad de PKA, PKC y

MAPK son necesarios tanto para la consolidación como para la evocación, y la modulación por receptores de dopamina D1, receptores β -adrenérgicos, receptores 5HT_{1A} y receptores muscarínicos colinérgicos es similar en ambos casos (Szapiro y col, 2000; Szapiro y col, 2001; Barros y col, 2000; Izquierdo y McGaugh, 2000). Sin embargo, la naturaleza y el requerimiento temporal de cada vía de señalización en la consolidación no son iguales a aquellos de la evocación en todos los casos. Otros mecanismos clave para la codificación o consolidación de las MLT de EI, como aquellos que involucran los receptores NMDA y CaMKII no son en líneas generales necesarios para la evocación (Szapiro y col, 2002).

Además de los cambios en la modulación de la traducción, la inhibición breve de mTORC1 por rapamicina afecta procesos biológicos como la homeostasis iónica, la regulación del potencial de membrana, la regulación de la secreción y el tráfico de vesículas sinápticas (Niere y col, 2016). Estos hallazgos sugieren que la inhibición aguda de mTORC1 podría afectar en alguna medida la función sináptica y, en consecuencia, perjudicar la evocación de la memoria.

Finalmente, refiriéndonos a la hipótesis de la cual partimos, estos resultados en su conjunto sugieren que la evocación de una memoria de largo término aversiva y no aversiva requiere de síntesis proteica local y continua, mediada por la vía de mTORC1 en la rata. Junto con el trabajo seminal del grupo de Nader en amígdala, nuestros hallazgos abren nuevas líneas de investigación sobre los mecanismos moleculares que subyacen la evocación de la memoria.

En especial, en nuestra hipótesis inicial hicimos hincapié en la síntesis local gobernada por mTORC1 ya que algunas proteínas relacionadas con la plasticidad sólo son funcionales si se sintetizan localmente. Algunos autores señalan que las proteínas traducidas en las dendritas cooperarían con aquellas sintetizadas en el soma celular para inducir la plasticidad sináptica

en la sinapsis activada (Jiang y Schuman, 2002). Es necesario avanzar en la descripción de la señalización de la vía de mTORC1 y en especial de su maquinaria de regulación local de la traducción. Por esta razón, en el segundo capítulo de la tesis nos detuvimos a explorar los potenciales vínculos entre la vía de mTORC1 y la síntesis de proteínas relacionadas con plasticidad como son los receptores AMPA.

mTORC1 y su influencia sobre la síntesis global y local en la sinapsis

En las sinapsis, el complemento de proteínas presente es el mejor indicador fenotípico tanto del tipo como de la fuerza de la sinapsis. La regulación de las proteínas sinápticas por síntesis proteica continua y degradación contribuye a la homeostasis y plasticidad en las sinapsis (Hanus y Schuman, 2013; Schanzenbacher y col, 2016; Dorrbaum y col, 2018; Hafner y col, 2019). Se ha propuesto que una gran parte del pool de proteínas de plasticidad y su remodelación asociada se produce localmente dentro de las sinapsis (Martin y Ephrussi, 2009; Crispino y col, 2014; Glock y col, 2017; Van Driesche y Martin, 2018). Además, dada la rápida dinámica de ciertos procesos de plasticidad, podría ocurrir que ciertas proteínas relacionadas con la plasticidad sólo sean sintetizadas o deban ser sintetizadas localmente para ser funcionales para que su tasa de síntesis sea compatible a escala temporal con los fenómenos que ocurren en la sinapsis.

Estudios en *Aplysia* indican que para que los cambios estructurales y funcionales en la sinapsis se estabilizan se requiere además de síntesis proteica en el soma, síntesis proteica local en la sinapsis (Martin y col, 1997). Como los ARNm se sintetizan en el soma, hay una necesidad de traducción local de algunos ARNm que sugiere que estos ARNm pueden estar en un estado “durmiente” en la sinapsis para estar disponibles cuando ésta se active. La

pregunta que surge entonces es qué procesos tienen lugar para que se activen estos mensajeros durmientes. Además, existe otra serie de pasos regulatorios que también podrían estar involucrados en la regulación de la expresión, como la represión traduccional y el transporte, retención y disponibilidad selectiva de ciertos mensajeros.

Nuestros resultados apuntan a una regulación local de la síntesis proteica por parte de mTORC1. En vista de los efectos rápidos que observamos en tiempos muy cercanos a la evocación, la síntesis local es un proceso coherente con nuestros hallazgos, aunque no se puede descartar y tampoco sería excluyente que mTORC1 regule la síntesis proteica a escala más global y no solo local y que ambos eventos actúen de forma sinérgica y coordinada. Esto es coherente con algunos reportes en la literatura indicando que las proteínas traducidas en las dendritas cooperarían con aquellas sintetizadas en el soma celular para inducir la plasticidad sináptica en la sinapsis activada (Jiang y Schuman 2002). De todas maneras, se requieren más estudios para poder corroborar la presencia de mTORC1 y sus efectores en las cercanías de la sinapsis al momento de la evocación.

La desregulación de la vía de mTORC1 se encuentra asociada a numerosas neuropatologías

En concordancia con nuestros resultados, varios déficits cognitivos han sido reportados en ratones deficientes en blancos moleculares de mTORC1, como varias isoformas de S6Ks (Antion y col, 2008). Los efectores de mTORC1 son requeridos diferencialmente para distintos procesos de aprendizaje y memoria. En particular, S6Ks son necesarias para una regulación fina de la síntesis *de novo* de proteínas relacionada con memoria.

Mutaciones en reguladores negativos de la vía de mTORC1 como TSC1, TSC2 y PTEN están asociadas con el trastorno del espectro autista. Modelos animales de esta patología con pérdida de función de TSC1, TSC2 y PTEN han sido utilizados para investigar el rol de la señalización de mTORC1 en estos casos. Se ha demostrado que una actividad neuronal aumentada de mTORC1 está asociada con comportamiento de tipo autista, incluyendo alteraciones en aprendizaje y memoria, epilepsia y cambios en plasticidad sináptica y estructural (Ehninger y col, 2008; Zhou y Parada, 2012). Otros autores reportaron que el knockdown de *Disc1*, un gen implicado en múltiples patologías psiquiátricas, en neuronas del giro dentado presenta una señalización de mTORC1 exacerbada y que el tratamiento con rapamicina prevenía los déficits comportamentales asociados a este fenotipo (Zhou y col, 2013). Además, estudios preclínicos de diversas patologías asociadas a una regulación anormal de mTORC1 apuntan a que el tratamiento con rapamicina puede revertir varias de las características comportamentales y sinápticas en estos modelos de distintas patologías. Por ejemplo, el tratamiento prologando con rapamicina en ratones *Tsc2^{+/-}* mejora los fenotipos asociados a déficits cognitivos y de plasticidad (Auerbach y col, 2011; Ehninger y col, 2008).

También ha sido reportado en la literatura un modelo knock out de *Depdc5*, que codifica para un represor de mTORC1. Los embriones *Depdc5^{-/-}* no fueron viables y se registró una hiperactivación constitutiva de mTORC1 en sus cerebros. En este caso, el tratamiento prenatal con rapamicina rescató este fenotipo (Marsan y col, 2016).

Tomando en cuenta estos antecedentes y los resultados obtenidos en esta tesis sobre el rol de mTORC1 en la evocación de la memoria, consideramos relevante continuar profundizando el estudio sobre los mecanismos de acción de este complejo en el hipocampo

debido su relación con los procesos de plasticidad que tienen lugar durante el aprendizaje y que están relacionados con memoria. En particular, si bien los cambios en la vía de mTORC1 están relacionados con cambios persistentes en la función neuronal, no está claro aún si la señalización de mTORC1 cambia como resultado directo de eventos sinápticos o si esta vía forma parte de una respuesta homeostática más global que está implicada en las perturbaciones de la fisiología neuronal.

Una vez definidas las vías de señalización de mTORC1 en neuronas, se requerirá estudiar cómo, cuándo y dónde se activan y regulan las proteínas de estas vías en diferentes procesos de plasticidad sináptica. Esta información servirá así para entender las bases moleculares que subyacen múltiples patologías neurológicas.

La síntesis de los AMPAR es requerida durante la evocación de una MLT

Como ya hemos mencionado, en el cerebro, la eficacia de la transmisión sináptica está asociada en gran parte a la regulación dinámica ejercida sobre la incorporación y la remoción de ciertos receptores en las sinapsis. Los AMPAR median, en gran parte, la transmisión sináptica excitatoria en el sistema nervioso central de los mamíferos (Henley y Wilkinson, 2016). De hecho, la regulación de su tráfico intracelular constituye uno de los mecanismos principales por los cuales se modulan los fenómenos de plasticidad sináptica en las sinapsis hipocampales (Choquet, 2018).

La localización subcelular de los AMPAR es fundamentalmente postsináptica. Los AMPAR activan canales iónicos permeables a Na^+ y K^+ y en algunos casos a Ca^{2+} , e intervienen

principalmente en la transmisión glutamatérgica rápida. Los AMPAR están formados por heterotetrámeros de las subunidades GluA1-4, siendo las subunidades GluA2 impermeables a Ca^{2+} . Estos receptores se localizan en la membrana postsináptica, tanto en sitios sinápticos como extrasinápticos. Intervienen principalmente en generación de la despolarización postsináptica rápida y son también muy importantes en fenómenos de plasticidad. La variación en el número de AMPAR presentes en la densidad postsináptica, a nivel de la inserción/endocitosis, así como difusión lateral entre sitios sinápticos y extrasinápticos, da lugar a fenómenos de plasticidad a largo plazo (tanto LTD como LTP) (Granger y col, 2013). Como hemos señalado en la Introducción, en especial, los primeros antecedentes experimentales sobre el rol de los AMPAR en la evocación de la memoria en el hipocampo y en la amígdala fueron aportados en memorias aversivas, tanto por nuestro grupo (Bianchin y col, 1993) como por el de Davis (Kim y col, 1993). Años más tarde, el grupo de Morris también ha señalado el papel de AMPAR en evocación en una tarea espacial (Riedel y col, 1999).

En cuanto a la relación entre los AMPAR y la vía de mTORC1, estudios previos han mostrado que el tratamiento con rapamicina reduce el número de AMPAR en la sinapsis (Wang y col, 2006), el número de sinapsis (Weston y col, 2012) y el número de vesículas sinápticas por sinapsis (Hernandez y col, 2012). Consistentemente con estos reportes, la hiperactivación de mTORC1 aumenta la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura, el número de AMPAR y la densidad de las espinas (Tang y col, 2014) y estos efectos son revertidos por rapamicina. Muchas líneas de evidencia indican que mTORC1 actúa vía mecanismos postsinápticos para regular bidireccionalmente la fuerza sináptica glutamatérgica evocada. Además, 4E-BP, un efector de la vía de mTORC1, regula la transmisión sináptica por represión de la traducción de las subunidades GluA1 y GluA2 de los

AMPAR (Ran y col, 2013). Finalmente, nuestro laboratorio ha aportado datos indicando que la traducción proteica mediada por la actividad de mTORC1 es necesaria para incrementar los niveles de GluA1 en la sinapsis durante la consolidación de la memoria (Slipczuk y col, 2009).

Teniendo en cuenta todos los antecedentes mencionados, en la presente tesis hemos estudiado el requerimiento de la síntesis de las distintas subunidades de los AMPAR al momento de la evocación. Hemos demostrado que la síntesis *de novo* tanto de la subunidad GluA1 como de la subunidad GluA2 se requiere para la normal expresión de la MLT de la tarea de EI. De manera interesante, mostramos que el déficit en la memoria causado por la infusión de GluA2 ASO podía ser revertido por la infusión posterior del péptido GluR23γ, que bloquea la endocitosis de los AMPAR que contienen la subunidad GluA2. Este resultado era esperado ya que razonamos que, inhibiendo la endocitosis, todos los receptores ya expresados en membrana iban a permanecer allí y podrían compensar el número de receptores faltantes a causa de la inhibición de la síntesis *de novo*. De esta manera, esperábamos contar con un pool estable de AMPAR al momento de la evocación, que garantizase la normal expresión de la memoria. De manera similar, y considerando que la mayor parte de los AMPAR hipocampales son heterómeros formados por GluA1/GluA2, realizamos un experimento en el que infundimos GluA1 ASO seguido de la infusión del péptido GluR23γ previo al testeo. En ambas situaciones experimentales (bloqueo de síntesis de GluA2 seguido del bloqueo de endocitosis o bloqueo de la síntesis de GluA1 seguido de bloqueo de la endocitosis) los factores comunes son la falta de la formación del AMPAR GluA1/GluA2 (ya sea por falta de una u otra subunidad) y la inhibición de la endocitosis llevada a cabo por el péptido GluR23γ, que impide la internalización de los AMPAR que contienen GluA2. Por ello, en ambas situaciones experimentales esperábamos que el impedimento de formación de nuevos AMPAR

GluA1/GluA2 (por falta de síntesis de subunidades) fuera compensada por la inhibición de la endocitosis de los AMPAR GluA1/GluA2. Sin embargo, en el caso de la infusión de GluA1 ASO y GluR23γ esta compensación no ocurrió y el efecto amnésico de la inhibición de la síntesis *de novo* de GluA1 no pudo ser revertido por la inhibición de endocitosis por el GluR23γ. Ante este resultado, se abren varios interrogantes y posibles explicaciones: ¿puede un pool estable de AMPAR de heterodímeros GluA1/GluA2 (generados por la falta de endocitosis con la infusión del péptido GluR23γ) no ser suficiente para que la evocación tenga lugar? ¿Qué diferencias existen entre bloquear la síntesis *de novo* de subunidad GluA1 y la síntesis *de novo* de GluA2? En el caso de la infusión de GluA2 ASO combinada con el péptido GluR23γ, vimos que la inhibición de la internalización de AMPAR es suficiente para contar con un número de AMPAR en membrana que permite que la evocación tenga lugar. Cuando infundimos GluA1 ASO con el péptido GluR23γ, la sinapsis también cuenta con ese número de AMPAR GluA1/GluA2 remanente que se logra con el péptido GluR23γ y en cambio, en este caso, ese número no da lugar a los eventos relacionados con la evocación. Por eso, el número de AMPAR GluA1/GluA2 no explicaría por si solo el resultado observado. Una posibilidad es que las diferencias observadas se deban a los distintos tipos de AMPAR (composición de subunidades) que quedan en membrana en cada situación experimental. Al infundir el GluA2 ASO seguido del péptido GluR23γ, existiría, en principio, una compensación completa o casi completa de tipo de AMPAR (no se forman las combinaciones AMPAR que contienen GluA2 y no se endocitan esas mismas combinaciones). En cambio, en el caso de infundir GluA1 ASO y el péptido GluR23γ, se dejan de formar los AMPAR GluA1/GluA2, así como otras combinaciones menos representadas como AMPAR homodímeros GluA1 o heterodímeros GluA1/GluA3 mientras que se bloquea la endocitosis de los AMPAR GluA1/GluA2, pero no de las otras combinaciones menos representadas. ¿Pueden estos AMPAR, reportados en la

bibliografía como muy poco numerosos, ser los responsables de que la amnesia causada por el GluA1 ASO no se pueda revertir con el péptido GluR23γ? Otra alternativa que explique esta falta de compensación del efecto de GluA1 ASO por el GluR23γ es que en la densidad sináptica aumente la proporción de AMPAR GluA2/GluA3 y, por lo tanto, estén menos representados allí los GluA1/GluA2 (ver Fig D.1, donde se esquematiza de forma simplificada esta posibilidad, sin tener en cuenta homómeros de AMPAR o combinaciones menos frecuentes del receptor). Esta idea indicaría que para que la evocación tenga lugar se necesita tener una proporción mayor de AMPAR GluA1/GluA2 frente a los GluA2/GluA3. Como puede apreciarse en la Figura D.1, planteamos que existe una proporción mayor de AMPAR GluA1/GluA2 frente a los AMPA GluA2/GluA3 en la PSD durante la evocación (Fig D.1 A), que se ve alterada con la falta de síntesis de las distintas subunidades (Fig D.1 B y C). En ambos casos, la infusión tanto de GluA1 ASO o de GluA2 ASO, resultaría en un menor número de AMPAR, aunque sólo esta variable numérica no explicaría por sí sola la amnesia generada. Por ejemplo, en el caso de infundir GluA1 ASO seguido del péptido GluR23γ (Fig D.1 D), el número menor de AMPAR GluA1/GluA2 se compensaría con la inhibición de la endocitosis, que deja en membrana un número de GluA1/GluA2 disponible para ser reclutados de manera actividad-dependiente. Sin embargo, en este caso, esa posible compensación numérica no basta para restablecer los procesos de plasticidad que subyacen la evocación, y, por ende, la evocación se ve impedida. Esto puede explicarse en parte a que la proporción de GluA1/GluA2 sigue siendo baja con respecto a las condiciones basales. En cambio, en el caso de infundir GluA2 ASO seguido del péptido GluR23γ (Fig D.1 E) existiría una compensación completa tanto de número y tipo de AMPAR, que permitiría una proporción de GluA1/GluA2 en la PSD similar a la que se observa en condiciones basales y, por ende, la evocación puede tener lugar.

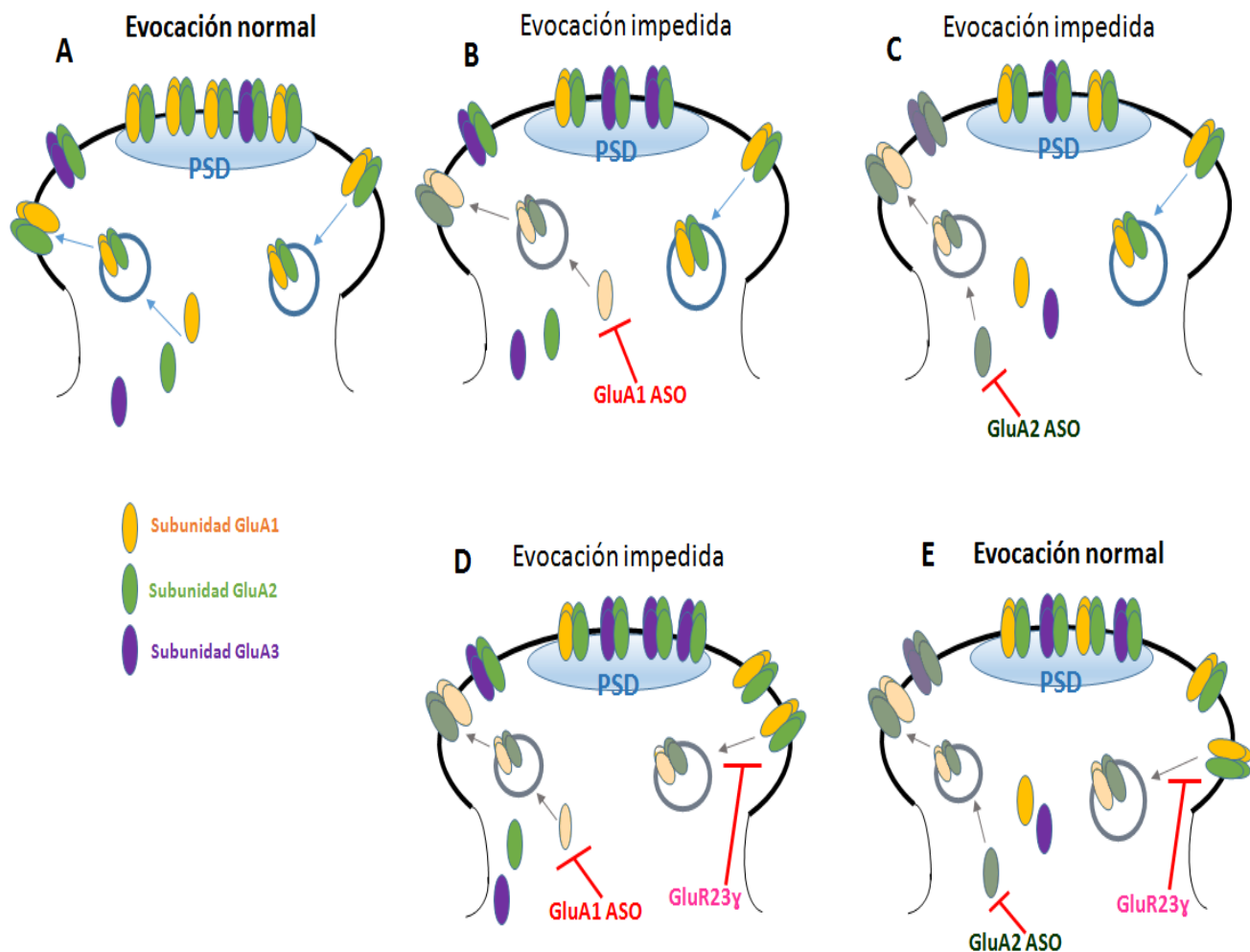


Figura D.1. Esquema representativo y simplificado de los posibles eventos que ocurren con la infusión de los ASO y el péptido GluR23γ. A) Durante la normal evocación de la memoria, existe un pool necesario y suficiente de AMPAR en la PSD. De acuerdo a la literatura, en el hipocampo, la proporción de AMPAR GluA1/GluA2 es mayor que la de los AMPAR GluA2/GluA3. B) Luego de la infusión con el GluA1 ASO, la síntesis *de novo* de la subunidad GluA1 está bloqueada y, por ende, no se forman AMPAR GluA1/GluA2. Como puede apreciarse, el número y la proporción de AMPAR GluA1/GluA2 disminuyen. C) Luego de la infusión de GluA2 ASO, la síntesis *de novo* de la subunidad GluA2 está bloqueada y por ende no se forman AMPAR GluA1/GluA2 ni GluA2/GluA3. La proporción de AMPAR GluA1/GluA2:GluA2/GluA3 no parecería cambiar, pero sí hay un número menor de AMPAR en membrana. D) Infusión de GluA1 ASO combinada con la infusión del péptido GluR23γ. En este caso la administración del péptido evita que los receptores que se habían expresado se endociten. Sin embargo, no se logra revertir el potencial cambio en la proporción de AMPAR en la PSD. E) Infusión de GluA2 ASO combinada con la infusión del péptido GluR23γ. En este caso hay una compensación completa entre la falta de síntesis *de novo* de la subunidad GluA2, que da lugar a que no se formen los AMPAR GluA1/GluA2 ni los GluA2/GluA3, y la endocitosis de los AMPAR que contienen GluA2. Por lo tanto, no debería verse muy afectada ni la proporción ni el número de AMPAR en la PSD.

Otro de los puntos importantes a considerar es el equilibrio dinámico de los AMPAR entre los distintos compartimentos. Puede ocurrir que un desbalance entre los AMPAR que contienen GluA1 entre la PSD y la SPM repercuta más en la función sináptica que un desbalance entre AMPAR que contienen GluA2.

Otro aspecto a tener en cuenta es que las distintas características y mecanismos regulatorios de las subunidades que componen los AMPAR (Hirano, 2018) pueden incidir en la velocidad de ensamble (y por consiguiente velocidad de inserción a la membrana postsináptica), velocidad de difusión lateral y de endocitosis de los distintos AMPAR (GluA1/GluA2 vs. GluA2/GluA3) que podrían en parte explicar las diferencias observadas. Una posibilidad es que las distintas subunidades presenten distintas tasas de recambio (*turnover*) que den lugar a que durante la ventana temporal que existe entre la infusión del ASO y el péptido se generen distintas condiciones. Por ejemplo, podría ocurrir que la subunidad GluA1 tenga mayor tasa de recambio que la GluA2 y por ende las subunidades que ya se habían sintetizado se degradan más rápidamente y se forme una menor cantidad de receptores. Entonces, una vez que se infunde el péptido, ya no hay en membrana un número suficiente de receptores GluA1/GluA2 sobre los que pueda actuar y cuya retención en membrana permita la normal evocación de la memoria. De esta manera, la subunidad GluA1 sería el componente limitante frente a la subunidad GluA2.

Además, no existe consenso global en la literatura sobre si los AMPAR se insertan primero en la membrana plasmática extrasináptica o si lo hacen directamente en la densidad postsináptica. De hecho, algunos autores han reportado que las dos situaciones tienen lugar en la sinapsis (Kennedy y col, 2010) si bien la medida en que cada vía contribuye a la expresión de procesos de plasticidad en distintos casos sigue sin esclarecerse (Hirano, 2018). En el caso

de insertarse en la fracción de SPM, el movimiento lateral y su reclutamiento en la membrana postsináptica serían necesarios para acumular AMPAR en la PSD (Opazo y col, 2010; Opazo y Choquet, 2011; Opazo y col, 2012; Chen y col, 2015). Estos dos potenciales panoramas podrían agregar una variable de análisis más a nuestros resultados, ya que ambos escenarios plantean distintos requerimientos temporales y por ende pequeñas diferencias en los alcances de los tratamientos de las drogas que infundimos.

Otro factor a tener en cuenta radica en la estabilidad de los tetrámeros una vez insertos en membrana. Un estudio que utiliza técnicas de imágenes (*single molecule imaging*) ha reportado que los tetrámeros de AMPAR en membrana serían en realidad complejos metaestables que se encuentran en equilibrio dinámico con sus respectivas subunidades en forma de monómeros y dímeros (Morise y col, 2019). Esto implicaría que se produzcan disociaciones de los AMPAR que permitan cambios en la composición de los AMPAR con una velocidad muy rápida o que tengan lugar fenómenos de difusión lateral de monómeros además de tetrámeros que también serían más rápidos.

Por último, hay que tener en cuenta que los AMPAR no se encuentran aislados en la PSD, si no que existen múltiples asociaciones con otras proteínas de anclaje y que forman el andamiaje complejo propio de la densidad postsináptica. Los cambios de número, composición o proporción que puedan darse en los AMPAR pueden afectar estas proteínas y ellas a su vez afectar los procesos de plasticidad sináptica asociados.

Alteraciones en los niveles de AMPAR durante la inhibición de mTORC1 impiden la normal expresión de una MLT

Luego, hallamos que la amnesia inducida por rapamicina podía ser prevenida por la infusión del péptido GluR23γ. Este resultado abre dos posibilidades de relación entre la vía de mTORC1 y los AMPAR, no excluyentes: mTORC1 podía estar gobernando la síntesis *de novo* de AMPAR o podría también participar de algún paso crucial del tráfico de AMPAR (ver Fig. D.2). Si bien nuestra hipótesis más fuerte es sobre la regulación de la vía de mTORC1 sobre la síntesis de las distintas subunidades de los AMPAR, no podemos excluir la posibilidad de que esté implicada en otros procesos asociados al tráfico de los AMPAR en la sinapsis (ver Fig. D.2, bajo el término “tráfico” englobamos los procesos de inserción, difusión lateral y endocitosis de los AMPAR). Postulamos que los procesos involucrados en la homeostasis de los AMPAR regulada por la vía de mTORC1 que resultan en niveles estables de los AMPAR en membrana subyacen la evocación de la memoria.

Evocación normal

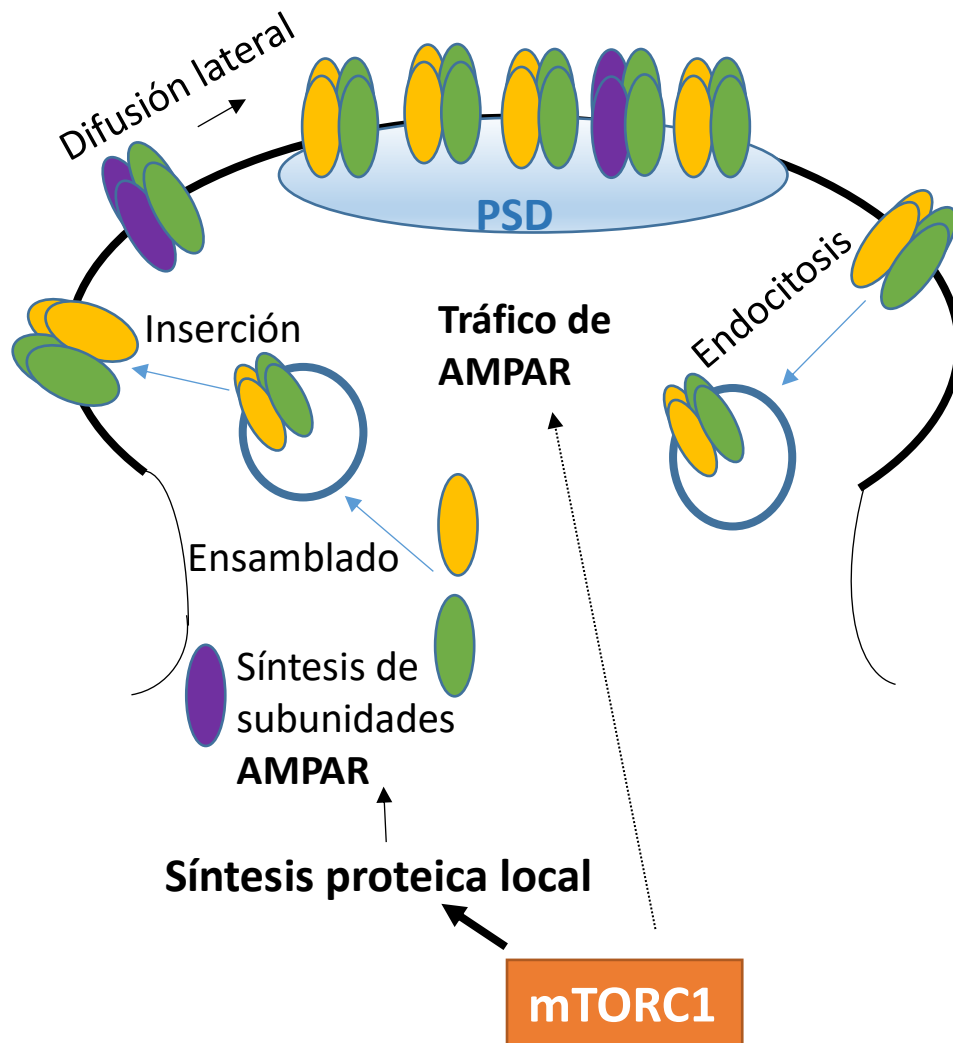


Figura D.2. Esquema representativo y simplificado de la potencial regulación de la vía de mTORC1 sobre el ciclo de los AMPAR durante la evocación. Modelo propuesto que grafica cómo la vía de mTORC1 puede estar impactando en los procesos asociados al ciclo de los receptores AMPA. Una posibilidad, sobre la que se basa nuestra hipótesis de trabajo, es que mTORC1 esté modulando específicamente la síntesis de los AMPAR. Teniendo en cuenta los resultados experimentales de doble infusión del péptido GluR23y y rapamicina, otra posibilidad es que mTORC1 esté actuando sobre otros procesos del tráfico de AMPAR (basados en nuestros resultados, el primer potencial proceso afectado sería la endocitosis, pero no podemos excluir otros procesos asociados al ciclo de los receptores).

Para evaluar en mayor profundidad los cambios de las subunidades de los AMPAR asociados a la vía de mTORC1, medimos los niveles de expresión de las subunidades GluA1 y GluA2 inmediatamente después del testeo llevado a cabo con previa infusión de rapamicina. En la fracción de PSD, encontramos una caída en los niveles de GluA1 en los animales infundidos con rapamicina comparado con los animales infundidos con vehículo, que es consistente con los resultados reportados por nuestro grupo durante la consolidación en el hipocampo (Slipczuk y col, 2009) y también con otros autores que infunden rapamicina en la amígdala antes del testeo pero en una tarea de condicionamiento auditivo de miedo (López y col, 2015). Sorprendentemente, encontramos en la misma fracción de PSD un aumento de GluA2, que podría deberse a un efecto compensatorio frente a la falta de GluA1. Es interesante notar que en la fracción de SPM la reducción en los niveles de GluA1 se mantuvo. En cuanto a GluA2, en la SPM no encontramos diferencias en los niveles de esta subunidad entre animales infundidos con vehículo o rapamicina, en concordancia con lo reportado por otros autores (López y col, 2015). En contraposición con nuestros resultados, el grupo de Nader no encontró cambios en los niveles de GluA1 en la fracción de SPM ni tampoco reportó cambios en GluA2 en la PSD (López y col, 2015). Estas diferencias pueden deberse a que se infunde en otra estructura, la amígdala (cuyos procesos que subyacen la memoria pueden diferir de aquellos que tienen lugar en el hipocampo), y que utilizan otra tarea y un tiempo de infusión más cercano al tiempo de testeo. Teniendo en cuenta que en general la inserción de nuevos receptores en membrana tiene lugar en la fracción de SPM, desde donde se mueven hasta alcanzar la PSD, podría ocurrir que la rapamicina esté disminuyendo o afectando más selectivamente a la subunidad GluA1 de los AMPAR. Entonces, al disminuir la síntesis de GluA1, disminuye por tanto su inserción en la SPM y su presencia en la PSD (lo cual se corresponde con ambos descensos en los niveles de GluA1 observados tanto en la SPM como

en la PSD). Esta falta de GluA1 en la PSD podría ser sensada y en respuesta, la maquinaria traduccional podría sintetizar más GluA2 y por ende que se ensamblen más AMPAR que contengan GluA2 y lleguen a la PSD. Si así fuera, el paso de los AMPAR que contengan GluA2 por la SPM debiera ser muy rápido, ya que no registramos un aumento de GluA2 en esta fracción. Esta hipótesis de compensación está de acuerdo con el trabajo de otros autores que estudiaron los efectos de la remoción de GluA1 en neuronas piramidales utilizando un knock down de GluA1 a través de un sistema de expresión viral shRNA GluA1 en cultivo (Terashima y col, 2017). Ellos encontraron que la pérdida de GluA1 causó una redistribución de GluA2 hacia la sinapsis que podría compensar funcionalmente la ausencia de GluA1.

Perspectivas futuras

Retomando el desarrollo que hicimos sobre la evocación en la Introducción, Dudai (2002) ha declarado una vez que: “la evocación no es simplemente el resultado pasivo del procesamiento de la información, sino que es una experiencia en si misma y, por tanto, una vez que se evoca la traza es improbable que permanezca igual”. Los mecanismos de la evocación probablemente inciden directamente en aquellos que están relacionados con la consolidación de la traza, modificandola. Además, sabemos por estudios moleculares que la evocación trae aparejada grandes cambios moleculares en el cerebro. Estos cambios que se gatillan a partir de la evocación son de gran magnitud, involucran un número importante de neuronas y tienen impacto en procesos de aprendizaje y memoria (Miller y Sweatt, 2006).

Hemos mencionado en la Introducción que muchos fenómenos de amnesias retrógradas han sido históricamente atribuidos de forma exclusiva a fallas en la consolidación. Sin embargo, numerosos trabajos han mostrado resultados que se contraponen a esta visión

predominante y han señalado que muchas amnesias son debidas a fallas en la evocación de la traza. En esta tesis hemos mostrado muchos casos de amnesias experimentales debidas a fallas en la evocación y en algunos casos, tratamientos que podían prevenirlas o revertirlas.

Creemos que es importante continuar esta línea de investigación, abordar los interrogantes que surgen a partir de ella y reivindicar la importancia del estudio de la evocación de la memoria a la luz de las múltiples aplicaciones que puede tener el estudio de la evocación *per se*.

Parte de los interrogantes que surgen a partir de este trabajo incluyen en primer lugar, dilucidar los reguladores río arriba de la vía de mTORC1 y su implicancia en memoria. Sería interesante saber si activando o sobreactivando moderadamente la vía de mTORC1 se pueden ver mejoras en el desempeño conductual de los animales, como forma de modular la retención de la memoria. De igual manera, es clave entender mejor la cadena de eventos y los efectores que se gatillan río abajo de mTORC1 con la activación de la vía y sus implicancias en memoria. Luego, será importante poder estudiar en profundidad otras funciones asociadas a la vía de mTORC1, principalmente la degradación proteica. Este estudio serviría para abordar de manera más completa la regulación de la vía sobre la proteostasis en la sinapsis y nos serviría especialmente para tener un mejor entendimiento de algunos de nuestros resultados. De igual manera, se podría determinar el rol de la vía en el control de autofagia o metabolismo que puedan afectar los procesos de plasticidad y memoria. Por otra parte, ha crecido en el último tiempo el interés en la literatura por entender los diferentes requerimientos de mTORC1 y mTORC2 en procesos de plasticidad y memoria y en línea con este abordaje, sería útil corroborar el rol de mTORC2 en nuestros datos.

En cuanto a la relación de mTORC1 y la regulación que ejerce sobre los AMPAR, sería beneficioso poder realizar experimentos con el péptido Tat-GluA1_{CT} que interfiere selectivamente con la endocitosis de AMPAR que contienen GluA1 (Yu y col, 2008; Cui y col, 2011) para poder contestar algunas preguntas que quedaron abiertas en el capítulo 2. Por ejemplo, se podría infundir el GluA1 ASO seguido del péptido GluA1_{CT} y ver si se puede revertir la amnesia como en el caso del experimento de GluA2 ASO seguido del péptido GluR23γ.

CONCLUSIÓN

A lo largo de esta tesis, hemos demostramos el requerimiento de la actividad de la vía de mTORC1 en la evocación de una MLT. Encontramos que esta vía, a través de la regulación de síntesis proteica gobierna la evocación de la memoria. Estos datos son novedosos dada la escasez de trabajos en evocación frente a otras fases de la memoria en la literatura. Caracterizamos el bloqueo de la vía de mTORC1 por rapamicina en el hipocampo de rata en la tarea de EI. Hallamos que el efecto de la rapamicina es transitorio ya que un retesteo llevado a cabo 5 horas posteriores al primer test demostró una retención normal de la memoria. Encontramos que la rapamicina tiene un curso temporal de acción restringido que llega hasta 40 minutos previos al testeo. Reportamos que la inhibición de la vía de mTORC1 afecta selectivamente la evocación de memorias de largo término, así hayan sido previamente expresadas o así se trate de memorias persistentes de 7 o 14 días, siempre que la traza se halle en el hipocampo. Además, corroboramos que el procesamiento de la evocación de una MCT no requiere de síntesis proteica. Pudimos extender los resultados a memorias no aversivas y también replicamos nuestros resultados en otras estructuras implicadas en la evocación de una memoria de EI, como la RSC. Tomando en cuenta todos estos hallazgos, pudimos corroborar el rol crucial de la vía de mTORC1 en la evocación, que es coherente con el papel que ya había sido informado en formación de MLT (Bekinschtein y col, 2007; Slipczuk y col, 2009). En el segundo capítulo de la tesis, indagamos sobre qué posibles proteínas importantes para la evocación podrían ser reguladas por la vía de señalización de mTORC1 a nivel de la síntesis proteica. Estudiamos en particular las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA y encontramos que la síntesis *de novo* de ambas subunidades es necesaria para la expresión normal de una MLT. Logramos revertir

la amnesia inducida por la infusión de GluA2 ASO con la administración de un péptido GluR23γ que inhibe la endocitosis de los AMPAR que contienen la subunidad GluA2. También pudimos corroborar que este péptido GluR23γ no tiene *per se* efecto sobre la evocación de una MLT. Luego, al repetir el experimento con GluA1 ASO, no pudimos revertir la amnesia generada en ese caso. Este resultado nos indicó que las subunidades GluA1 y GluA2 juegan distintos roles en la evocación de la memoria. Finalmente, decidimos explorar la interrelación entre la vía de mTORC1 y los AMPAR, infundiendo el péptido GluR23γ y rapamicina antes de la evocación. En este caso, la inhibición de la endocitosis de los AMPAR que contienen la subunidad GluA2 logró prevenir el efecto amnésico de la rapamicina, marcando un paralelismo con el resultado encontrado infundiendo GluA2 ASO y el péptido. Este último resultado comportamental nos lleva a postular dos posibles escenarios: mTORC1 podría estar regulando la síntesis de las subunidades de los AMPAR y/o podría también participar de procesos implicados con el ciclo de dichos receptores, por ejemplo, podría tener algún rol en la endocitosis de los AMPAR. Basados en estos resultados, postulamos que los procesos involucrados en la homeostasis de los AMPAR regulada por la vía de mTORC1 que resultan en niveles estables de los AMPAR en membrana subyacen la evocación de la memoria. Realizamos ensayos bioquímicos para poder ahondar más en el nexo entre la vía de mTORC1 y los AMPAR. Para ello, infundimos rapamicina antes del testeo y procedimos a realizar la eutanasia de los animales inmediatamente después del testeo, extrayendo los hipocampos. Al medir los niveles de las subunidades de los AMPAR en las distintas fracciones subcelulares hallamos un descenso de GluA1 tanto en la PSD como en la SPM. En cambio, encontramos un aumento en los niveles de GluA2 en la PSD que no se vio en la SPM. Estos resultados están en línea con los distintos roles que parecen tener ambas subunidades en la evocación de la memoria: GluA1 parecería jugar un rol más preponderante que es coherente con que no hayamos podido revertir la

amnesia generada por la falta de su síntesis sólo con la inhibición de la endocitosis de los AMPAR. Además, el descenso de sus niveles tanto en la PSD como en la SPM podría estar relacionado con un cambio más duradero y/o estructural que impide la evocación.

Nuestro trabajo aporta información novedosa sobre el rol de mTORC1 en la evocación y sobre la regulación que la vía de mTORC1 ejerce sobre los AMPAR. Creemos que es importante profundizar y continuar esta línea de investigación para dilucidar con mayor detalle la compleja cadena de eventos moleculares que se desencadenan con la activación de la vía de mTORC1 y que subyacen la evocación de la memoria. Avanzar en el estudio de estas cuestiones podría ayudar a entender cómo los variados desbalances en esta vía impactan en la función cognitiva y así poder aportar datos para el desarrollo de tratamientos pertinentes. Además, creemos que es de importancia fundamental seguir abordando el análisis de los mecanismos que subyacen la evocación de la memoria, para poder comprender mejor esta etapa que ha sido históricamente relegada y que se ve afectada en distintas patologías como estadios tempranos de Alzheimer (Roy y col, 2016).

BIBLIOGRAFÍA

Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current opinion in neurobiology*, 11(2), 180-187.

Agranoff, B. W. (1965). Molecules and memories. *Perspectives in biology and medicine*, 9(1), 13-22. DOI: [10.1353/pbm.1965.0000](https://doi.org/10.1353/pbm.1965.0000)

Alberini, C. M. (2008). The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. *Neurobiology of learning and memory*, 89(3), 234-246. DOI: [10.1016/j.nlm.2007.08.007](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.007)

Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1995). Hippocampal formation: in the rat nervous system. Ed. Paxinos G.

Anderson, M. C., Ochsner, K. N., Kuhl, B., Cooper, J., Robertson, E., Gabrieli, S. W., ... & Gabrieli, J. D. (2004). Neural systems underlying the suppression of unwanted memories. *Science*, 303(5655), 232-235. DOI: [10.1126/science.1089504](https://doi.org/10.1126/science.1089504)

Antion, M. D., Merhav, M., Hoeffler, C. A., Reis, G., Kozma, S. C., Thomas, G., ... & Klann, E. (2008). Removal of S6K1 and S6K2 leads to divergent alterations in learning, memory, and synaptic plasticity. *Learning & Memory*, 15(1), 29-38. DOI: [10.1101/lm.661908](https://doi.org/10.1101/lm.661908)

Atkinson, R. C., & Shiffrin, R. M. (1968). Human memory: A proposed system and its control processes. 89-195.

Auerbach, B. D., Osterweil, E. K., & Bear, M. F. (2011). Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature*, 480(7375), 63-68. DOI: [10.1038/nature10658](https://doi.org/10.1038/nature10658)

Baddeley, A. (2013). *Essentials of human memory (Classic Edition)*. Psychology Press.

Banko, J. L., Poulin, F., Hou, L., DeMaria, C. T., Sonenberg, N., & Klann, E. (2005). The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 25(42), 9581-9590. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.2423-05.2005](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2423-05.2005)

Barros, D. M., Izquierdo, L. A., e Souza, T. M., Ardenghi, P. G., Pereira, P., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2000). Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behavioural brain research*, 114(1-2), 183-192. DOI: [10.1016/s0166-4328\(00\)00226-6](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(00)00226-6)

Barros, D. M., Izquierdo, L. A., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2002). Bupropion and sertraline enhance retrieval of recent and remote long-term memory in rats. *Behavioural pharmacology*, 13(3), 215-220. DOI: [10.1097/00008877-200205000-00004](https://doi.org/10.1097/00008877-200205000-00004)

Barros, D. M., Izquierdo, L. A., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). Pharmacological findings contribute to the understanding of the main physiological mechanisms of memory retrieval. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, 2(2), 81-94. DOI: [10.2174/1568007033482931](https://doi.org/10.2174/1568007033482931)

Bazzari, A. H., & Parri, H. R. (2019). Neuromodulators and Long-Term Synaptic Plasticity in Learning and Memory: A Steered-Glutamatergic Perspective. *Brain sciences*, 9(11), 300. DOI: [10.3390/brainsci9110300](https://doi.org/10.3390/brainsci9110300)

Bechara, A., Tranel, D., Damasio, H., Adolphs, R., Rockland, C., & Damasio, A. R. (1995). Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science*, 269(5227), 1115-1118. DOI: [10.1126/science.7652558](https://doi.org/10.1126/science.7652558)

Bekinschtein, P., Katze, C., Slipczuk, L. N., Igaz, L. M., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiology of learning and memory*, 87(2), 303-307.

Berman, D. E., & Dudai, Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, 291(5512), 2417-2419. DOI: [10.1126/science.1058165](https://doi.org/10.1126/science.1058165)

Bianchin, M., Da Silva, R. C., Schmitz, P. K., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (1994). Memory of inhibitory avoidance in the rat is regulated by glutamate metabotropic receptors in the hippocampus. *Behavioural Pharmacology*. DOI: [10.1097/00008877-199406000-00014](https://doi.org/10.1097/00008877-199406000-00014)

Bianchin, M., Walz, R., Ruschel, A. C., Zanatta, M. S., Da Silva, R. C., e Silva, M. B., ... & Izquierdo, I. (1993). Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into the hippocampus and/or the amygdala up to 20 days after training. *Behavioral and neural biology*, 59(2), 83-86. DOI: [10.1016/0163-1047\(93\)90782-d](https://doi.org/10.1016/0163-1047(93)90782-d)

Bliss, T. V., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, 232(2), 331-356. DOI: [10.1113/jphysiol.1973.sp010273](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273)

Brebner, K., Wong, T. P., Liu, L., Liu, Y., Campsall, P., Gray, S., ... & Wang, Y. T. (2005). Nucleus accumbens long-term depression and the expression of behavioral sensitization. *Science*, 310(5752), 1340-1343. DOI: [10.1126/science.1116894](https://doi.org/10.1126/science.1116894)

Buffington, S. A., Huang, W., & Costa-Mattioli, M. (2014). Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Annual review of neuroscience*, 37, 17-38. DOI: [10.1146/annurev-neuro-071013-014100](https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-014100)

Buonarati, O. R., Hammes, E. A., Watson, J. F., Greger, I. H., & Hell, J. W. (2019). Mechanisms of postsynaptic localization of AMPA-type glutamate receptors and their regulation during long-term potentiation. *Sci. Signal.*, *12*(562), eaar6889. DOI: [10.1126/scisignal.aar6889](https://doi.org/10.1126/scisignal.aar6889)

Burwell, R. D., & Amaral, D. G. (1998). Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Journal of comparative neurology*, *398*(2), 179-205. DOI: [10.1002/\(sici\)1096-9861\(19980824\)398:2<179::aid-cne3>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19980824)398:2<179::aid-cne3>3.0.co;2-y)

Burwell, R. D., Bucci, D. J., Sanborn, M. R., & Jutras, M. J. (2004). Perirhinal and postrhinal contributions to remote memory for context. *Journal of Neuroscience*, *24*(49), 11023-11028. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.3781-04.2004](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3781-04.2004)

Cahill, L., McGaugh, J. L., & Weinberger, N. M. (2001). The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends in neurosciences*, *24*(10), 578-581. DOI: [10.1016/s0166-2236\(00\)01885-3](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01885-3)

Cahill, L., Weinberger, N. M., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1999). Is the amygdala a locus of "conditioned fear"? Some questions and caveats. *Neuron*, *23*(2), 227-228. DOI: [10.1016/s0896-6273\(00\)80774-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80774-6)

Cammalleri, M., Lütjens, R., Berton, F., King, A. R., Simpson, C., Francesconi, W., & Sanna, P. P. (2003). Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(24), 14368-14373. DOI: [10.1073/pnas.2336098100](https://doi.org/10.1073/pnas.2336098100)

Cammarota, M., Bernabeu, R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1996). Reversible Changes in Hippocampal 3H-AMPA Binding Following Inhibitory Avoidance Training in the Rat. *Neurobiology of learning and memory*, 66(1), 85-88. DOI: [10.1006/nlme.1996.0046](https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0046)

Cammarota, M., Bernabeu, R., Levi de Stein, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1998). Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *European Journal of Neuroscience*, 10(8), 2669-2676. DOI: [10.1046/j.1460-9568.1998.00254.x](https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00254.x)

Cao, K., Graziotto, J. J., Blair, C. D., Mazzulli, J. R., Erdos, M. R., Krainc, D., & Collins, F. S. (2011). Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Science translational medicine*, 3(89), 89ra58-89ra58. DOI: [10.1126/scitranslmed.3002346](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002346)

Cenquizca, L. A., & Swanson, L. W. (2007). Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain research reviews*, 56(1), 1-26. DOI: [10.1016/j.brainresrev.2007.05.002](https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.002)

Chen, X., Levy, J. M., Hou, A., Winters, C., Azzam, R., Sousa, A. A., ... & Reese, T. S. (2015). PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(50), E6983-E6992. DOI: [10.1073/pnas.1517045112](https://doi.org/10.1073/pnas.1517045112)

Chiarini, F., Evangelisti, C., McCubrey, J. A., & Martelli, A. M. (2015). Current treatment strategies for inhibiting mTOR in cancer. *Trends in pharmacological sciences*, 36(2), 124-135. DOI: [10.1016/j.tips.2014.11.004](https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.11.004)

Choquet, D. (2018). Linking nanoscale dynamics of AMPA receptor organization to plasticity of excitatory synapses and learning. *Journal of Neuroscience*, *38*(44), 9318-9329. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.2119-18.2018](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2119-18.2018)

Corcoran, K. A., Donnan, M. D., Tronson, N. C., Guzmán, Y. F., Gao, C., Jovasevic, V., ... & Radulovic, J. (2011). NMDA receptors in retrosplenial cortex are necessary for retrieval of recent and remote context fear memory. *Journal of Neuroscience*, *31*(32), 11655-11659. DOI: [10.1101/lm.2175811](https://doi.org/10.1101/lm.2175811)

Corcoran, K. A., & Maren, S. (2001). Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *Journal of Neuroscience*, *21*(5), 1720-1726. PMCID: [PMC6762930](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16762930/)

Costa-Mattioli, M., Sossin, W. S., Klann, E., & Sonenberg, N. (2009). Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron*, *61*(1), 10-26. DOI: [10.1016/j.neuron.2008.10.055](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.055)

Costanzi, M., Cannas, S., Saraulli, D., Rossi-Arnaud, C., & Cestari, V. (2011). Extinction after retrieval: effects on the associative and nonassociative components of remote contextual fear memory. *Learning & Memory*, *18*(8), 508-518. DOI: [10.1101/lm.2175811](https://doi.org/10.1101/lm.2175811)

Crispino, M., Chun, J. T., Cefaliello, C., Perrone Capano, C., & Giuditta, A. (2014). Local gene expression in nerve endings. *Developmental neurobiology*, *74*(3), 279-291. DOI: [10.1002/dneu.22109](https://doi.org/10.1002/dneu.22109)

Cui, W., Darby-King, A., Grimes, M. T., Howland, J. G., Wang, Y. T., McLean, J. H., & Harley, C. W. (2011). Odor preference learning and memory modify GluA1 phosphorylation and GluA1

distribution in the neonate rat olfactory bulb: testing the AMPA receptor hypothesis in an appetitive learning model. *Learning & memory*, 18(5), 283-291. DOI: [10.1101/lm.1987711](https://doi.org/10.1101/lm.1987711)

Czöndör, K., & Thoumine, O. (2013). Biophysical mechanisms regulating AMPA receptor accumulation at synapses. *Brain research bulletin*, 93, 57-68. DOI: [10.1016/j.brainresbull.2012.11.001](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.11.001)

Davis, H. P., & Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychological bulletin*, 96(3), 518. PMID: 6096908

Debiec, J., LeDoux, J. E., & Nader, K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron*, 36(3), 527-538. DOI: [10.1016/s0896-6273\(02\)01001-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01001-2)

De Hoz, L., Martin, S. J., & Morris, R. G. (2004). Forgetting, reminding, and remembering: the retrieval of lost spatial memory. *PLoS biology*, 2(8). DOI: [10.1371/journal.pbio.0020225](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020225)

Deli, A., Schipany, K., Rosner, M., Höger, H., Pollak, A., Li, L., ... & Lubec, G. (2012). Blocking mTORC1 activity by rapamycin leads to impairment of spatial memory retrieval but not acquisition in C57BL/6J mice. *Behavioural brain research*, 229(2), 320-324. DOI: [10.1016/j.bbr.2012.01.017](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.01.017)

Delorenzi, A., Maza, F. J., Suárez, L. D., Barreiro, K., Molina, V. A., & Stehberg, J. (2014). Memory beyond expression. *Journal of Physiology-Paris*, 108(4-6), 307-322. DOI: [10.1016/j.jphysparis.2014.07.002](https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.07.002)

de Quervain, D. J. F., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*. DOI: [10.1038/29542](https://doi.org/10.1038/29542)

Dere, E., Huston, J. P., & Silva, M. A. D. S. (2005). Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiology of learning and memory*, 84(3), 214-221. DOI: [10.1016/j.nlm.2005.07.002](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.07.002)

Dominique, J. F., Roozendaal, B., Nitsch, R. M., McGaugh, J. L., & Hock, C. (2000). Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. *Nature neuroscience*, 3(4), 313-314. DOI: [10.1038/73873](https://doi.org/10.1038/73873)

Dörrbaum, A. R., Kochen, L., Langer, J. D., & Schuman, E. M. (2018). Local and global influences on protein turnover in neurons and glia. *Elife*, 7, e34202. DOI: [10.7554/eLife.34202](https://doi.org/10.7554/eLife.34202)

Du, A. T., Schuff, N., Chao, L. L., Kornak, J., Jagust, W. J., Kramer, J. H., ... & Weiner, M. W. (2006). Age effects on atrophy rates of entorhinal cortex and hippocampus. *Neurobiology of aging*, 27(5), 733-740. DOI: [10.1016/j.neurobiolaging.2005.03.021](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.03.021)

Dudai, Y. (2002). *Memory from A to Z: keywords, concepts and beyond*. Y. Dudai. Oxford University Press, Oxford.

Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current opinion in neurobiology*, 12(2), 211-216. DOI: [10.1016/s0959-4388\(02\)00305-7](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(02)00305-7)

Dudai, Y., & Eisenberg, M. (2004). Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron*, 44(1), 93-100. DOI: [10.1016/j.neuron.2004.09.003](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.003)

Dudai, Y., & Morris, R. G. (2000). To consolidate or not to consolidate: what are the questions. *Brain, perception, memory. Advances in cognitive sciences*, 149-162. DOI: [10.1093/acprof:oso/9780198524823.001.0001](https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198524823.001.0001)

Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2010). mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Current opinion in cell biology*, 22(2), 169-176. DOI: [10.1016/j.ceb.2009.10.007](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.10.007)

Ehninger, D., Han, S., Shilyansky, C., Zhou, Y., Li, W., Kwiatkowski, D. J., ... & Silva, A. J. (2008). Reversal of learning deficits in a Tsc2+/- mouse model of tuberous sclerosis. *Nature medicine*, 14(8), 843-848. DOI: [10.1038/nm1788](https://doi.org/10.1038/nm1788)

Ehninger, D., Li, W., Fox, K., Stryker, M. P., & Silva, A. J. (2008). Reversing neurodevelopmental disorders in adults. *Neuron*, 60(6), 950-960. DOI: [10.1016/j.neuron.2008.12.007](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.007)

Eichenbaum, H. (2004). Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, 44(1), 109-120. DOI: [10.1016/j.neuron.2004.08.028](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.028)

Eichenbaum, H., Schoenbaum, G., Young, B., & Bunsey, M. (1996). Functional organization of the hippocampal memory system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13500-13507. [10.1073/pnas.93.24.13500](https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13500)

Eldridge, L. L., Knowlton, B. J., Furmanski, C. S., Bookheimer, S. Y., & Engel, S. A. (2000). Remembering episodes: a selective role for the hippocampus during retrieval. *Nature neuroscience*, 3(11), 1149-1152. DOI: [10.1038/80671](https://doi.org/10.1038/80671)

Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. *Neuron*, 65(1), 7-19. DOI: [10.1016/j.neuron.2009.11.031](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031)

Fanselow, M. S., & LeDoux, J. E. (1999). Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron*, 23(2), 229-232. DOI: [10.1016/s0896-6273\(00\)80775-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80775-8)

Flexner, L. B., Flexner, J. B., De La Haba, G., & Roberts, R. B. (1965). Loss of memory as related to inhibition of cerebral protein synthesis. *Journal of neurochemistry*, *12*(7), 535-541. DOI: [10.1111/j.1471-4159.1965.tb04246.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1965.tb04246.x)

Fortin, D. A., Srivastava, T., Dwarakanath, D., Pierre, P., Nygaard, S., Derkach, V. A., & Soderling, T. R. (2012). Brain-derived neurotrophic factor activation of CaM-kinase kinase via transient receptor potential canonical channels induces the translation and synaptic incorporation of GluA1-containing calcium-permeable AMPA receptors. *Journal of Neuroscience*, *32*(24), 8127-8137. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.6034-11.2012](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6034-11.2012)

Fox, C. J., Russell, K., Titterness, A. K., Wang, Y. T., & Christie, B. R. (2007). Tyrosine phosphorylation of the GluR2 subunit is required for long-term depression of synaptic efficacy in young animals in vivo. *Hippocampus*, *17*(8), 600-605. DOI: [10.1002/hipo.20302](https://doi.org/10.1002/hipo.20302)

Frankland, P. W., & Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(2), 119-130. DOI: [10.1038/nrn1607](https://doi.org/10.1038/nrn1607)

Friedman, L. K., & Veliskova, J. (1999). GluR2 antisense knockdown produces seizure behavior and hippocampal neurodegeneration during a critical window. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *868*(1), 541-545.

Gafford, G. M., Parsons, R. G., & Helmstetter, F. J. (2011). Consolidation and reconsolidation of contextual fear memory requires mTOR-dependent translation in the dorsal hippocampus. *Neuroscience*, *182*, 98. DOI: [10.1016/j.neuroscience.2011.03.023](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.023)

Giese, K. P., & Mizuno, K. (2013). The roles of protein kinases in learning and memory. *Learning & memory*, *20*(10), 540-552. DOI: [10.1101/lm.028449.112](https://doi.org/10.1101/lm.028449.112)

Giovannini, M. G., Lana, D., & Pepeu, G. (2015). The integrated role of ACh, ERK and mTOR in the mechanisms of hippocampal inhibitory avoidance memory. *Neurobiology of learning and memory*, *119*, 18-33. DOI: [10.1016/j.nlm.2014.12.014](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.12.014)

Gisquet-Verrier, P., Lynch, J. F., Cutolo, P., Toledano, D., Ulmen, A., Jasnow, A. M., & Riccio, D. C. (2015). Integration of new information with active memory accounts for retrograde amnesia: a challenge to the consolidation/reconsolidation hypothesis?. *Journal of Neuroscience*, *35*(33), 11623-11633. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.1386-15.2015](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1386-15.2015)

Glock, C., Heumüller, M., & Schuman, E. M. (2017). mRNA transport & local translation in neurons. *Current opinion in neurobiology*, *45*, 169-177. DOI: [10.1016/j.conb.2017.05.005](https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.005)

Gluck, M. A., Meeter, M., & Myers, C. E. (2003). Computational models of the hippocampal region: linking incremental learning and episodic memory. *Trends in cognitive sciences*, *7*(6), 269-276. DOI: [10.1016/s1364-6613\(03\)00105-0](https://doi.org/10.1016/s1364-6613(03)00105-0)

Gong, R., Park, C. S., Abbassi, N. R., & Tang, S. J. (2006). Roles of glutamate receptors and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in activity-dependent dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(27), 18802-18815. DOI: [10.1074/jbc.M512524200](https://doi.org/10.1074/jbc.M512524200)

Gonzalez, M. C., Villar, M. E., Igaz, L. M., Viola, H., & Medina, J. H. (2015). Dorsal medial prefrontal cortex contributes to conditioned taste aversion memory consolidation and retrieval. *Neurobiology of learning and memory*, *126*, 1-6. DOI: [10.1016/j.nlm.2015.10.007](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.10.007)

Goshen, I., Brodsky, M., Prakash, R., Wallace, J., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., & Deisseroth, K. (2011). Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell*, *147*(3), 678-689. DOI: [10.1016/j.cell.2011.09.033](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.033)

Graber, T. E., McCamphill, P. K., & Sossin, W. S. (2013). A recollection of mTOR signaling in learning and memory. *Learning & memory*, *20*(10), 518-530. DOI: [10.1101/lm.027664.112](https://doi.org/10.1101/lm.027664.112)

Granger, A. J., Shi, Y., Lu, W., Cerpas, M., & Nicoll, R. A. (2013). LTP requires a reserve pool of glutamate receptors independent of subunit type. *Nature*, *493*(7433), 495-500. DOI: [10.1038/nature11775](https://doi.org/10.1038/nature11775)

Hafner, A. S., Donlin-Asp, P. G., Leitch, B., Herzog, E., & Schuman, E. M. (2019). Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal pre-and postsynaptic compartments. *Science*, *364*(6441), eaau3644. DOI: [10.1126/science.aau3644](https://doi.org/10.1126/science.aau3644)

Hall, J., Thomas, K. L., & Everitt, B. J. (2001). Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *Journal of Neuroscience*, *21*(6), 2186-2193. PMCID: [PMC6762622](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/122622/)

Hanley, J. G. (2014). Actin-dependent mechanisms in AMPA receptor trafficking. *Frontiers in cellular neuroscience*, *8*, 381. DOI: [10.3389/fncel.2014.00381](https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00381)

Hanus, C., & Schuman, E. M. (2013). Proteostasis in complex dendrites. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(9), 638-648. DOI: [10.1038/nrn3546](https://doi.org/10.1038/nrn3546)

Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M. T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q. P., ... & Avruch, J. (1997). Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(42), 26457-26463. DOI: [10.1074/jbc.272.42.26457](https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26457)

Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K., ... & Pahor, M. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *nature*, 460(7253), 392-395. DOI: [10.1038/nature08221](https://doi.org/10.1038/nature08221)

Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*, 18(16), 1926-1945. DOI: [10.1101/gad.1212704](https://doi.org/10.1101/gad.1212704)

Henley, J. M., & Wilkinson, K. A. (2013). AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues in clinical neuroscience*, 15(1), 11. PMID: [PM3622464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3622464/)

Henley, J. M., & Wilkinson, K. A. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(6), 337. DOI: [10.1038/nrn.2016.37](https://doi.org/10.1038/nrn.2016.37)

Hernandez, D., Torres, C. A., Setlik, W., Cebrián, C., Mosharov, E. V., Tang, G., ... & Gershon, M. (2012). Regulation of presynaptic neurotransmission by macroautophagy. *Neuron*, 74(2), 277-284. DOI: [10.1016/j.neuron.2012.02.020](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.020)

Hirano, T. (2018). Visualization of exo-and endocytosis of AMPA receptors during hippocampal synaptic plasticity around postsynaptic-like membrane formed on glass surface. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 442. DOI: [10.3389/fncel.2018.00442](https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00442)

Hoeffler, C. A., & Klann, E. (2010). mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends in neurosciences*, 33(2), 67-75. DOI: [10.1016/j.tins.2009.11.003](https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.11.003)

Hou, L., & Klann, E. (2004). Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent

long-term depression. *Journal of Neuroscience*, 24(28), 6352-6361. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.0995-04.2004](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0995-04.2004)

Huang, W., Zhu, P. J., Zhang, S., Zhou, H., Stoica, L., Galiano, M., ... & Costa-Mattioli, M. (2013). mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory. *Nature neuroscience*, 16(4), 441. DOI: [10.1038/nn.3351](https://doi.org/10.1038/nn.3351)

Humeau, Y., & Choquet, D. (2019). The next generation of approaches to investigate the link between synaptic plasticity and learning. *Nature neuroscience*, 22(10), 1536-1543. DOI: [10.1038/s41593-019-0480-6](https://doi.org/10.1038/s41593-019-0480-6)

Igaz, L. M., Vianna, M. R., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *Journal of Neuroscience*, 22(15), 6781-6789. DOI: [20026642](https://doi.org/20026642)

Isaac, J. T., Ashby, M. C., & McBain, C. J. (2007). The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*, 54(6), 859-871. DOI: [10.1016/j.neuron.2007.06.001](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.001)

Izquierdo, I., Barros, D. M., e Souza, T. M., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A., & Medina, J. H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393(6686), 635-636. DOI: [10.1038/31371](https://doi.org/10.1038/31371)

Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in neurosciences*, 29(9), 496-505. DOI: [10.1016/j.tins.2006.07.005](https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.07.005)

Izquierdo, I., Bianchin, M., Silva, M. B. E., Zanatta, M. S., Walz, R., Ruschel, A. C., ... & Medina, J. H. (1993). CNQX infused into rat hippocampus or amygdala disrupts the expression of memory of two different tasks. *Behavioral and neural biology*, *59*(1), 1-4. DOI: [10.1016/0163-1047\(93\)91061-q](https://doi.org/10.1016/0163-1047(93)91061-q)

Izquierdo, I., Furini, C. R., & Myskiw, J. C. (2016). Fear memory. *Physiological reviews*, *96*(2), 695-750. DOI: [10.1152/physrev.00018.2015](https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015)

Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1993). Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Brazilian journal of medical and biological research=Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, *26*(6), 573-589. PMID: 7504967

Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1995). Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiology of learning and memory*, *63*(1), 19-32. DOI: [10.1006/nlme.1995.1002](https://doi.org/10.1006/nlme.1995.1002)

Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of learning and memory*, *68*(3), 285-316. DOI: [10.1006/nlme.1997.3799](https://doi.org/10.1006/nlme.1997.3799)

Izquierdo, I., & McGaugh, J. L. (2000). Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioural pharmacology*, *11*(7), 517-534. DOI: [10.1097/00008877-200011000-00001](https://doi.org/10.1097/00008877-200011000-00001)

Izquierdo, I., Quillfeldt, J. A., Zanatta, M. S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P. K., & Medina, J. H. (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience*, *9*(4), 786-793. DOI: [10.1111/j.1460-9568.1997.tb01427.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01427.x)

Izquierdo, L. A., Viola, H., Barros, D. M., Alonso, M., Vianna, M. R. M., Furman, M., ... & Medina, J. H. (2001). Novelty enhances retrieval: molecular mechanisms involved in rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, *13*(7), 1464-1467. DOI: [10.1046/j.0953-816x.2001.01530.x](https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01530.x)

Jacinto, E., & Hall, M. N. (2003). Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nature reviews Molecular cell biology*, *4*(2), 117-126. DOI: [10.1038/nrm1018](https://doi.org/10.1038/nrm1018)

James, W., Burkhardt, F., Bowers, F., & Skrupskelis, I. K. (1890). *The principles of psychology* (Vol. 1, No. 2). London: Macmillan.

Jiang, C., & Schuman, E. M. (2002). Regulation and function of local protein synthesis in neuronal dendrites. *Trends in biochemical sciences*, *27*(10), 506-513. DOI: [10.1016/s0968-0004\(02\)02190-4](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02190-4)

Job, C., & Eberwine, J. (2001). Localization and translation of mRNA in dendrites and axons. *Nature Reviews Neuroscience*, *2*(12), 889-898. DOI: [10.1038/35104069](https://doi.org/10.1038/35104069)

Jobim, P. F., Pedroso, T. R., Christoff, R. R., Werenicz, A., Maurmann, N., Reolon, G. K., & Roesler, R. (2012). Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiology of learning and memory*, *97*(1), 105-112. DOI: [10.1016/j.nlm.2011.10.002](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.10.002)

Jobim, P. F., Pedroso, T. R., Werenicz, A., Christoff, R. R., Maurmann, N., Reolon, G. K., ... & Roesler, R. (2012). Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation. *Behavioural brain research*, *228*(1), 151-158. DOI: [10.1016/j.bbr.2011.12.004](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.004)

Josselyn, S. A., & Tonegawa, S. (2020). Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science*, 367(6473). DOI: [10.1126/science.aaw4325](https://doi.org/10.1126/science.aaw4325)

Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544), 1030-1038. DOI: [10.1126/science.1067020](https://doi.org/10.1126/science.1067020)

Kandel, A., Bragin, A., Carpi, D., & Buzsáki, G. (1996). Lack of hippocampal involvement in a rat model of petit mal epilepsy. *Epilepsy research*, 23(2), 123-127. DOI: [10.1016/0920-1211\(95\)00097-6](https://doi.org/10.1016/0920-1211(95)00097-6)

Katche, C., Dorman, G., Gonzalez, C., Kramar, C. P., Slipczuk, L., Rossato, J. I., ... & Medina, J. H. (2013). On the role of retrosplenial cortex in long-lasting memory storage. *Hippocampus*, 23(4), 295-302. DOI: [10.1002/hipo.22092](https://doi.org/10.1002/hipo.22092)

Katche, C., Dorman, G., Slipczuk, L., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2013). Functional integrity of the retrosplenial cortex is essential for rapid consolidation and recall of fear memory. *Learning & Memory*, 20(4), 170-173. DOI: [10.1101/lm.030080.112](https://doi.org/10.1101/lm.030080.112)

Keene, C. S., & Bucci, D. J. (2008). Involvement of the retrosplenial cortex in processing multiple conditioned stimuli. *Behavioral neuroscience*, 122(3), 651. DOI: [10.1037/0735-7044.122.3.651](https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.3.651)

Keene, C. S., & Bucci, D. J. (2009). Damage to the retrosplenial cortex produces specific impairments in spatial working memory. *Neurobiology of learning and memory*, 91(4), 408-414. DOI: [10.1016/j.nlm.2008.10.009](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.10.009)

Kennedy, M. J., Davison, I. G., Robinson, C. G., & Ehlers, M. D. (2010). Syntaxin-4 defines a domain for activity-dependent exocytosis in dendritic spines. *Cell*, *141*(3), 524-535. DOI: [10.1016/j.cell.2010.02.042](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.042)

Kerchner, G. A., & Nicoll, R. A. (2008). Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(11), 813-825. DOI: [10.1038/nrn2501](https://doi.org/10.1038/nrn2501)

Kesner, R. P., & Rolls, E. T. (2015). A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: new developments. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *48*, 92-147. DOI: [10.1016/j.neubiorev.2014.11.009](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.009)

Kim, J. J., & Baxter, M. G. (2001). Multiple brain-memory systems: the whole does not equal the sum of its parts. *Trends in neurosciences*, *24*(6), 324-330. [10.1016/s0166-2236\(00\)01818-x](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01818-x)

Kim, M., Campeau, S., Falls, W. A., & Davis, M. (1993). Infusion of the non-NMDA receptor antagonist CNQX into the amygdala blocks the expression of fear-potentiated startle. *Behavioral and neural biology*, *59*(1), 5-8. DOI: [10.1016/0163-1047\(93\)91075-x](https://doi.org/10.1016/0163-1047(93)91075-x)

Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, *256*(5057), 675-677. DOI: [10.1126/science.1585183](https://doi.org/10.1126/science.1585183)

Kim, J. J., & Jung, M. W. (2006). Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *30*(2), 188-202. DOI: [10.1016/j.neubiorev.2005.06.005](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.06.005)

Klann, E., & Sweatt, J. D. (2008). Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. *Neurobiology of learning and memory*, 89(3), 247-259. DOI: [10.1016/j.nlm.2007.08.009](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.009)

Kobayashi, Y., & Amaral, D. G. (2003). Macaque monkey retrosplenial cortex: II. Cortical afferents. *Journal of Comparative Neurology*, 466(1), 48-79. DOI: [10.1002/cne.10883](https://doi.org/10.1002/cne.10883)

Kobayashi, Y., & Amaral, D. G. (2007). Macaque monkey retrosplenial cortex: III. Cortical efferents. *Journal of Comparative Neurology*, 502(5), 810-833. DOI: [10.1002/cne.21346](https://doi.org/10.1002/cne.21346)

LaBar, K. S., & Phelps, E. A. (2005). Reinstatement of conditioned fear in humans is context dependent and impaired in amnesia. *Behavioral neuroscience*, 119(3), 677. DOI: [10.1037/0735-7044.119.3.677](https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.3.677)

Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293. DOI: [10.1016/j.cell.2012.03.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017)

LeDoux, J. E. (2014). Coming to terms with fear. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(8), 2871-2878. DOI: [10.1073/pnas.1400335111](https://doi.org/10.1073/pnas.1400335111)

Lenz, G., & Avruch, J. (2005). Glutamatergic regulation of the p70S6 kinase in primary mouse neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38121-38124. DOI: [10.1074/jbc.C500363200](https://doi.org/10.1074/jbc.C500363200)

Lipton, J. O., & Sahin, M. (2014). The neurology of mTOR. *Neuron*, 84(2), 275-291. DOI: [10.1016/j.neuron.2014.09.034](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.034)

Liu, G. Y., & Sabatini, D. M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-21. DOI: [10.1038/s41580-019-0199-y](https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y)

Lopez, J., Gamache, K., Schneider, R., & Nader, K. (2015). Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. *Journal of Neuroscience*, 35(6), 2465-2475. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.0735-14.2015](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0735-14.2015)

Lorenzini, C. A., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., & Tassoni, G. (1996). Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain research*, 730(1-2), 32-39. DOI: [10.1016/0006-8993\(96\)00427-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00427-1)

Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annual review of neuroscience*, 24(1), 897-931. DOI: [10.1146/annurev.neuro.24.1.897](https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.897)

Marsan, E., Ishida, S., Schramm, A., Weckhuysen, S., Muraca, G., Lecas, S., ... & Le van Quyen, M. (2016). Depdc5 knockout rat: a novel model of mTORopathy. *Neurobiology of disease*, 89, 180-189. DOI: [10.1016/j.nbd.2016.02.010](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.010)

Martin, K. C., & Ephrussi, A. (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell*, 136(4), 719-730. DOI: [10.1016/j.cell.2009.01.044](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.044)

Martin, S. J., & Morris, R. G. M. (2002). New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus*, 12(5), 609-636. DOI: [10.1002/hipo.10107](https://doi.org/10.1002/hipo.10107)

McClelland, J. L., McNaughton, B. L., & O'Reilly, R. C. (1995). Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychological review*, 102(3), 419. DOI: [10.1037/0033-295X.102.3.419](https://doi.org/10.1037/0033-295X.102.3.419)

McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science*, *153*(3742), 1351-1358. DOI: [10.1126/science.153.3742.1351](https://doi.org/10.1126/science.153.3742.1351)

McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, *287*(5451), 248-251. DOI: [10.1126/science.287.5451.248](https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248)

Micheau, J., & Riedel, G. (1999). Protein kinases: which one is the memory molecule?. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *55*(4), 534-548. DOI: [10.1007/s000180050312](https://doi.org/10.1007/s000180050312)

Migues, P. V., Liu, L., Archbold, G. E., Einarsson, E. Ö., Wong, J., Bonasia, K., ... & Hardt, O. (2016). Blocking synaptic removal of GluA2-containing AMPA receptors prevents the natural forgetting of long-term memories. *Journal of Neuroscience*, *36*(12), 3481-3494.

Miller, C. A., & Sweatt, J. D. (2006). Amnesia or retrieval deficit? Implications of a molecular approach to the question of reconsolidation. *Learning & Memory*, *13*(5), 498-505. DOI: [10.1101/lm.304606](https://doi.org/10.1101/lm.304606)

Millin, P. M., Moody, E. W., & Riccio, D. C. (2001). Interpretations of retrograde amnesia: old problems redux. *Nature Reviews Neuroscience*, *2*(1), 68-70. DOI: [10.1038/35049075](https://doi.org/10.1038/35049075)

Milner, B., Squire, L. R., & Kandel, E. R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, *20*(3), 445-468. DOI: [10.1016/s0896-6273\(00\)80987-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80987-3)

Misanin, J. R., Miller, R. R., & Lewis, D. J. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*, *160*(3827), 554-555. DOI: [10.1126/science.160.3827.554](https://doi.org/10.1126/science.160.3827.554)

Moncada, D., Ballarini, F., Martinez, M. C., Frey, J. U., & Viola, H. (2011). Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory

formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12931-12936. DOI: [10.1073/pnas.1104495108](https://doi.org/10.1073/pnas.1104495108)

Moretto, E., & Passafaro, M. (2018). Recent findings on AMPA receptor recycling. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 286. DOI: [10.3389/fncel.2018.00286](https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00286)

Morise, J., Suzuki, K. G., Kitagawa, A., Wakazono, Y., Takamiya, K., Tsunoyama, T. A., ... & Oka, S. (2019). AMPA receptors in the synapse turnover by monomer diffusion. *Nature communications*, 10(1), 1-18. DOI: [10.1038/s41467-019-13229-8](https://doi.org/10.1038/s41467-019-13229-8)

Morris, R. G., Moser, E. I., Riedel, G., Martin, S. J., Sandin, J., Day, M., & O'Carroll, C. (2003). Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1432), 773-786. DOI: [10.1098/rstb.2002.1264](https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1264)

Moscovitch, M., & Nadel, L. (1998). Consolidation and the hippocampal complex revisited: in defense of the multiple-trace model. *Current opinion in neurobiology*, 8(2), 297-300. DOI: [10.1016/s0959-4388\(98\)80155-4](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(98)80155-4)

Moser, M. B., & Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8(6), 608-619. [10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7)

Nader, K. (2003). Memory traces unbound. *Trends in neurosciences*, 26(2), 65-72. DOI: [10.1016/S0166-2236\(02\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)00042-5)

Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722-726. DOI: [10.1038/35021052](https://doi.org/10.1038/35021052)

Niere, F., Namjoshi, S., Song, E., Dilly, G. A., Schoenhard, G., Zemelman, B. V., ... & Raab-Graham, K. F. (2016). Analysis of proteins that rapidly change upon mechanistic/mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) repression identifies Parkinson protein 7 (PARK7) as a novel protein aberrantly expressed in tuberous sclerosis complex (TSC). *Molecular & Cellular Proteomics*, *15*(2), 426-444. DOI: [10.1074/mcp.M115.055079](https://doi.org/10.1074/mcp.M115.055079)

Ogren, S. O., & Stiedl, O. (2015). Passive avoidance. In *Encyclopedia of Psychopharmacology* (pp. 1220-1228). Springer-Verlag.

Oguro, K., Oguro, N., Kojima, T., Grooms, S. Y., Calderone, A., Zheng, X., ... & Zukin, R. S. (1999). Knockdown of AMPA receptor GluR2 expression causes delayed neurodegeneration and increases damage by sublethal ischemia in hippocampal CA1 and CA3 neurons. *Journal of Neuroscience*, *19*(21), 9218-9227. PMCID: [PMC6782923](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6782923/)

Opazo, P., Labrecque, S., Tigaret, C. M., Frouin, A., Wiseman, P. W., De Koninck, P., & Choquet, D. (2010). CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron*, *67*(2), 239-252. DOI: [10.1016/j.neuron.2010.06.007](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.007)

Opazo, P., & Choquet, D. (2011). A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *46*(1), 1-8. DOI: [10.1016/j.mcn.2010.08.014](https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.08.014)

Opazo, P., Sainlos, M., & Choquet, D. (2012). Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Current opinion in neurobiology*, *22*(3), 453-460. DOI: [10.1016/j.conb.2011.10.010](https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.10.010)

Paxinos, G., & Watson, C. (1997). Atlas of anatomy of rat brain. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd San Diego, Calif. Academic Press Inc.

Pedreira, M. E., & Maldonado, H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, *38*(6), 863-869. DOI: [10.1016/s0896-6273\(03\)00352-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00352-0)

Pedreira, M. E., Perez-Cuesta, L. M., & Maldonado, H. (2002). Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: Protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *Journal of Neuroscience*, *22*(18), 8305-8311. PMCID: [PMC6758106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6758106/)

Petrini, E. M., Lu, J., Cognet, L., Lounis, B., Ehlers, M. D., & Choquet, D. (2009). Endocytic trafficking and recycling maintain a pool of mobile surface AMPA receptors required for synaptic potentiation. *Neuron*, *63*(1), 92-105. DOI: [10.1016/j.neuron.2009.05.025](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.025)

Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral neuroscience*, *106*(2), 274. DOI: [10.1037//0735-7044.106.2.274](https://doi.org/10.1037//0735-7044.106.2.274)

Pierson, J. L., Pullins, S. E., & Quinn, J. J. (2015). Dorsal hippocampus infusions of CNQX into the dentate gyrus disrupt expression of trace fear conditioning. *Hippocampus*, *25*(7), 779-785. DOI: [10.1002/hipo.22413](https://doi.org/10.1002/hipo.22413)

Quevedo, J., Vianna, M. R., Martins, M. R., Barichello, T., Medina, J. H., Roesler, R., & Izquierdo, I. (2004). Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short-and long-term memory in rats. *Behavioural brain research*, *154*(2), 339-343. DOI: [10.1016/j.bbr.2004.03.001](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.03.001)

Ran, T., Lu, T., Yuan, H., Liu, H., Wang, J., Zhang, W., ... & Chen, Y. (2012). A selectivity study on mTOR/PI3K α inhibitors by homology modeling and 3D-QSAR. *Journal of molecular modeling*, 18(1), 171-186. DOI: [10.1074/jbc.M109.071886](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.071886)

Ran, I., Gkogkas, C. G., Vasuta, C., Tartas, M., Khoutorsky, A., Laplante, I., ... & Lacaille, J. C. (2013). Selective regulation of GluA subunit synthesis and AMPA receptor-mediated synaptic function and plasticity by the translation repressor 4E-BP2 in hippocampal pyramidal cells. *Journal of Neuroscience*, 33(5), 1872-1886. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.3264-12.2013](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3264-12.2013)

Riccio, D. C., Millin, P. M., & Gisquet-Verrier, P. (2003). Retrograde amnesia: Forgetting back. *Current directions in psychological science*, 12(2), 41-44.

Riedel, G., Micheau, J., Lam, A. G. M., Roloff, E. V. L., Martin, S. J., Bridge, H., ... & Morris, R. G. M. (1999). Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nature neuroscience*, 2(10), 898-905. DOI: [10.1038/13202](https://doi.org/10.1038/13202)

Riedel, G., Platt, B., & Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural brain research*, 140(1-2), 1-47. DOI: [10.1016/s0166-4328\(02\)00272-3](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(02)00272-3)

Roesler, R., Vianna, M., Sant'Anna, M. K., Kuyven, C. R., Krueel, A. V., Quevedo, J., & Ferreira, M. B. C. (1998). Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. *Neurobiology of learning and memory*, 69(2), 87-91. DOI: [10.1097/00008877-199406000-00014](https://doi.org/10.1097/00008877-199406000-00014)

Roosendaal, B. (2002). Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of learning and memory*, 78(3), 578-595. DOI: [10.1006/nlme.2002.4080](https://doi.org/10.1006/nlme.2002.4080)

Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Myskiw, J. C., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learning & Memory*, *14*(1-2), 36-46. DOI: [10.1101/lm.422607](https://doi.org/10.1101/lm.422607)

Rossmann, M., Sukumaran, M., Penn, A. C., Veprintsev, D. B., Babu, M. M., & Greger, I. H. (2011). Subunit-selective N-terminal domain associations organize the formation of AMPA receptor heteromers. *The EMBO journal*, *30*(5), 959-971. DOI: [10.1038/emboj.2011.16](https://doi.org/10.1038/emboj.2011.16)

Roy, D. S., Arons, A., Mitchell, T. I., Pignatelli, M., Ryan, T. J., & Tonegawa, S. (2016). Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature*, *531*(7595), 508-512. DOI: [10.1038/nature17172](https://doi.org/10.1038/nature17172)

Sanders, H. I., & Warrington, E. K. (1971). Memory for remote events in amnesic patients. *Brain*, *94*(4), 661-668. DOI: [10.1093/brain/94.4.661](https://doi.org/10.1093/brain/94.4.661)

Santini, E., & Klann, E. (2011). Dysregulated mTORC1-dependent translational control: from brain disorders to psychoactive drugs. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *5*, 76. DOI: [10.3389/fnbeh.2011.00076](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00076)

Sara, S. J. (2000). Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learning & Memory*, *7*(2), 73-84. DOI: [10.1101/lm.7.2.73](https://doi.org/10.1101/lm.7.2.73)

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., ... & Sabatini, D. M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell*, *22*(2), 159-168. DOI: [10.1016/j.molcel.2006.03.029](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.029)

Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, *168*(6), 960-976. DOI: [10.1016/j.cell.2017.02.004](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004)

Schafe, G. E., Nadel, N. V., Sullivan, G. M., Harris, A., & LeDoux, J. E. (1999). Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learning & Memory*, *6*(2), 97-110. PMID: [PMCID: PMC311283](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11111111/)

Schanzenbächer, C. T., Sambandan, S., Langer, J. D., & Schuman, E. M. (2016). Nascent proteome remodeling following homeostatic scaling at hippocampal synapses. *Neuron*, *92*(2), 358-371. DOI: [10.1016/j.neuron.2016.09.058](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.058)

Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, *20*(1), 11. DOI: [10.1176/jnp.12.1.103](https://doi.org/10.1176/jnp.12.1.103)

Slipczuk, L., Bekinschtein, P., Katche, C., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2009). BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PloS one*, *4*(6). DOI: [10.1371/journal.pone.0006007](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006007)

Spear, N. E. (1973). Retrieval of memory in animals. *Psychological Review*, *80*(3), 163.

Squire, L. R., & Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current opinion in neurobiology*, *5*(2), 169-177. DOI: [10.1016/0959-4388\(95\)80023-9](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80023-9)

Squire, L. R., & Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(24), 13515-13522.

Squire, L. R., & Bayley, P. J. (2007). The neuroscience of remote memory. *Current opinion in neurobiology*, *17*(2), 185-196. DOI: [10.1016/j.conb.2007.02.006](https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.02.006)

Squire, Larry R. *Fundamental Neuroscience* (2008). Amsterdam: Elsevier / Academic Press.

Squire, L. R., Stark, C. E., & Clark, R. E. (2004). The medial temporal lobe. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 279-306. DOI: [10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130](https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130)

Stoica, L., Zhu, P. J., Huang, W., Zhou, H., Kozma, S. C., & Costa-Mattioli, M. (2011). Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(9), 3791-3796. DOI: [10.1073/pnas.1014715108](https://doi.org/10.1073/pnas.1014715108)

Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 655-669. DOI: [10.1038/nrn3785](https://doi.org/10.1038/nrn3785)

Sugar, J., Witter, M. P., van Strien, N., & Cappaert, N. (2011). The retrosplenial cortex: intrinsic connectivity and connections with the (para) hippocampal region in the rat. An interactive connectome. *Frontiers in neuroinformatics*, 5, 7. DOI: [10.3389/fninf.2011.00007](https://doi.org/10.3389/fninf.2011.00007)

Sutherland, R. J., Weisend, M. P., Mumby, D., Astur, R. S., Hanlon, F. M., Koerner, A., ... & Hamilton, D. A. (2001). Retrograde amnesia after hippocampal damage: recent vs. remote memories in two tasks. *Hippocampus*, 11(1), 27-42. DOI: [10.1002/1098-1063\(2001\)11:1<27::AID-HIPO1017>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2001)11:1<27::AID-HIPO1017>3.0.CO;2-4)

Szapiro, G., Barros, D. M., Ardenghi, P., Vianna, M. R., Choi, H., Silva, T., ... & Izquierdo, I. (2001). Facilitation and inhibition of retrieval in two aversive tasks in rats by intrahippocampal infusion of agonists of specific glutamate metabotropic receptor subtypes. *Psychopharmacology*, 156(4), 397-401. DOI: [10.1007/s002130100755](https://doi.org/10.1007/s002130100755)

Szapiro, G., Galante, J. M., Barros, D. M., De Stein, M. L., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., ... & Medina, J. H. (2002). Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochemical research*, 27(11), 1491-1498. DOI: [10.1023/a:1021648405461](https://doi.org/10.1023/a:1021648405461)

Szapiro, G., Izquierdo, L. A., Alonso, M., Barros, D., Paratcha, G., Ardenghi, P., ... & Izquierdo, I. (2000). Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience*, 99(1), 1-5. DOI: [10.1016/s0306-4522\(00\)00236-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00236-0)

Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A. C., Sonenberg, N., & Schuman, E. M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1), 467-472. DOI: [10.1073/pnas.012605299](https://doi.org/10.1073/pnas.012605299)

Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S. H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., ... & Yue, Z. (2014). Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron*, 83(5), 1131-1143. DOI: [10.1016/j.neuron.2014.07.040](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040)

Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K., & Nawa, H. (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *Journal of Neuroscience*, 24(44), 9760-9769. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.1427-04.2004](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1427-04.2004)

Taylor, K. K., Tanaka, K. Z., Reijmers, L. G., & Wiltgen, B. J. (2013). Reactivation of neural ensembles during the retrieval of recent and remote memory. *Current Biology*, 23(2), 99-106. DOI: [10.1016/j.cub.2012.11.019](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.019)

- Terashima, A., Suh, Y. H., & Isaac, J. T. (2019). The AMPA receptor subunit GluA1 is required for CA1 hippocampal long-term potentiation but is not essential for synaptic transmission. *Neurochemical research*, *44*(3), 549-561. DOI: [10.1007/s11064-017-2425-3](https://doi.org/10.1007/s11064-017-2425-3)
- Thomas, S. A. (2015). Neuromodulatory signaling in hippocampus-dependent memory retrieval. *Hippocampus*, *25*(4), 415-431. DOI: [10.1002/hipo.22394](https://doi.org/10.1002/hipo.22394)
- Todd, T. P., & Bucci, D. J. (2015). Retrosplenial cortex and long-term memory: molecules to behavior. *Neural plasticity*, *2015*. DOI: [10.1155/2015/414173](https://doi.org/10.1155/2015/414173)
- Tonegawa, S., Nakazawa, K., & Wilson, M. A. (2003). Genetic neuroscience of mammalian learning and memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *358*(1432), 787-795. DOI: [10.1098/rstb.2002.1243](https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1243)
- Tulving, E. (1972). Episodic and semantic memory. *Organization of memory*, *1*, 381-403.
- Tulving, E. (1985). Elements of episodic memory. *Oxford University Press*.
- Van den Oever, M. C., Goriounova, N. A., Li, K. W., Van der Schors, R. C., Binnekade, R., Schoffelmeer, A. N., ... & De Vries, T. J. (2008). Prefrontal cortex AMPA receptor plasticity is crucial for cue-induced relapse to heroin-seeking. *Nature neuroscience*, *11*(9), 1053. DOI: [10.1038/nn.2165](https://doi.org/10.1038/nn.2165)
- Van Driesche, S. J., & Martin, K. C. (2018). New frontiers in RNA transport and local translation in neurons. *Developmental neurobiology*, *78*(3), 331-339. DOI: [10.1002/dneu.22574](https://doi.org/10.1002/dneu.22574)
- van Groen, T., & Michael Wyss, J. (1990). Connections of the retrosplenial granular a cortex in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *300*(4), 593-606. DOI: [10.1002/cne.903000412](https://doi.org/10.1002/cne.903000412)

van Groen, T., & Wyss, J. M. (1992). Connections of the retrosplenial dysgranular cortex in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 315(2), 200-216. DOI: [10.1002/cne.903150207](https://doi.org/10.1002/cne.903150207)

Van Groen, T., & Wyss, J. M. (2003). Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 463(3), 249-263. DOI: [10.1002/cne.10757](https://doi.org/10.1002/cne.10757)

Vann, S. D., & Aggleton, J. P. (2002). Extensive cytotoxic lesions of the rat retrosplenial cortex reveal consistent deficits on tasks that tax allocentric spatial memory. *Behavioral neuroscience*, 116(1), 85. PMID: 11895186

Van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. *Nature reviews neuroscience*, 10(4), 272-282. DOI: [10.1038/nrn2614](https://doi.org/10.1038/nrn2614)

Vetere, G., Tran, L. M., Moberg, S., Steadman, P. E., Restivo, L., Morrison, F. G., ... & Frankland, P. W. (2019). Memory formation in the absence of experience. *Nature neuroscience*, 22(6), 933-940. DOI: [10.1038/s41593-019-0389-0](https://doi.org/10.1038/s41593-019-0389-0)

Vianna, M. R., Szapiro, G., McGaugh, J. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2001). Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12251-12254. DOI: [10.1073/pnas.211433298](https://doi.org/10.1073/pnas.211433298)

Viola, H., Furman, M., Izquierdo, L. A., Alonso, M., Barros, D. M., de Souza, M. M., ... & Medina, J. H. (2000). Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty. *Journal of Neuroscience*, 20(23), RC112-RC112. PMCID: [PMC6773084](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6773084/)

Wang, Y., Barbaro, M. F., & Baraban, S. C. (2006). A role for the mTOR pathway in surface expression of AMPA receptors. *Neuroscience letters*, *401*(1-2), 35-39. DOI: [10.1016/j.neulet.2006.03.011](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.011)

Warrington, E. K., & Weiskrantz, L. (1968). New method of testing long-term retention with special reference to amnesic patients. *Nature*, *217*(5132), 972-974. DOI: [10.1038/217972a0](https://doi.org/10.1038/217972a0)

Weeden, C. S., Roberts, J. M., Kamm, A. M., & Kesner, R. P. (2015). The role of the ventral dentate gyrus in anxiety-based behaviors. *Neurobiology of Learning and Memory*, *118*, 143-149. DOI: [10.1016/j.nlm.2014.12.002](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.12.002)

Wenthold, R., Yokotani, N., Doi, K., & Wada, K. (1992). Immunochemical characterization of the non-NMDA glutamate receptor using subunit-specific antibodies. Evidence for a hetero-oligomeric structure in rat brain. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(1), 501-507.

Weston, M. C., Chen, H., & Swann, J. W. (2012). Multiple roles for mammalian target of rapamycin signaling in both glutamatergic and GABAergic synaptic transmission. *Journal of Neuroscience*, *32*(33), 11441-11452. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.1283-12.2012](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1283-12.2012)

Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, *124*(3), 471-484. DOI: [10.1016/j.cell.2006.01.016](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016)

Yu, S. Y., Wu, D. C., Liu, L., Ge, Y., & Wang, Y. T. (2008). Role of AMPA receptor trafficking in NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the rat lateral amygdala. *Journal of neurochemistry*, *106*(2), 889-899. DOI: [10.1111/j.1471-4159.2008.05461.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05461.x)

Zhang, S., Hu, S., Chao, H. H., Ide, J. S., Luo, X., Farr, O. M., & Li, C. S. R. (2014). Ventromedial prefrontal cortex and the regulation of physiological arousal. *Social cognitive and affective neuroscience*, 9(7), 900-908. DOI: [10.1093/scan/nst064](https://doi.org/10.1093/scan/nst064)

Zhang, H., Zhang, C., Vincent, J., Zala, D., Benstaali, C., Sainlos, M., ... & David, D. J. (2018). Modulation of AMPA receptor surface diffusion restores hippocampal plasticity and memory in Huntington's disease models. *Nature communications*, 9(1), 1-16. DOI: [10.1038/s41467-018-06675-3](https://doi.org/10.1038/s41467-018-06675-3)

Zhou, M., Li, W., Huang, S., Song, J., Kim, J. Y., Tian, X., ... & Wu, S. (2013). mTOR Inhibition ameliorates cognitive and affective deficits caused by Disc1 knockdown in adult-born dentate granule neurons. *Neuron*, 77(4), 647-654. DOI: [10.1016/j.neuron.2012.12.033](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.033)

Zhou, J., & Parada, L. F. (2012). PTEN signaling in autism spectrum disorders. *Current opinion in neurobiology*, 22(5), 873-879. DOI: [10.1016/j.conb.2012.05.004](https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.05.004)