



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

“Desregulación Sináptica y Mnemónica en el Giro Dentado en un
Modelo tipo Esquizofrenia”

TESIS

Que presenta:

M. en C. Luis Alfredo Márquez García

Para obtener el Grado de:

Doctor en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directores de Tesis:

Dr. Emilio Javier Galván Espinosa

Dra. Carolina López Rubalcava

Ciudad de México

Abril, 2024.

Este trabajo de investigación se realizó en el departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Emilio Javier Galván Espinosa y de la Dra. Carolina López Rubalcava. El proyecto doctoral fue realizado con financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto CB 281617 (EJG) y el convenio 725800.

DEDICATORIA

A mis padres Ina y Arnulfo por su plena confianza, motivación, consejos de vida y enseñanza de la perseverancia. Este logro va por ustedes. Los quiero y admiro profundamente.

A mis queridas hermanitas Kary, Yare y Daya: atesoro mucho los momentos divertidos y la motivación constante durante mi travesía llamada doctorado, pero, sobre todo, por estar y celebrar cada uno de mis logros. Las quiero en demasía.

A mi hermano Uriel, agradezco mucho tu motivación constante para crecer profesional y personalmente y por aconsejarme todo el tiempo. Gracias por estar, tu apoyo incondicional y celebrar con emoción mis logros. Te quiero mucho hermano.

A mis amigos Dany, Isaín, John, Ali, Jess y Caro. Gracias por sus buenos deseos y charlas amenizadoras y plena confianza en mi potencial profesional. Ha sido un auténtico placer conocerlos y ver como crecen personal y profesionalmente amigos. A la memoria de Kary, quién siempre tuvo plena confianza en mi potencial intelectual y expresaba continuamente que tenía un amigo genuinamente brillante.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Dr. Emilio Javier Galván Espinosa y Dra. Carolina López por su invaluable apoyo y confianza. Fue un placer haber sido parte de un grupo de trabajo extraordinario y de alto rendimiento académico.

A mi comité sinodal conformado por la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo y los Drs. José Alonso Fernández Guasti, José de Jesús Aceves Buendía y Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez por sus comentarios valiosos y crítica constructiva durante el desarrollo de este trabajo. Cada uno de ustedes, desde su campo de experiencia, enriqueció este trabajo doctoral.

A mis amistades y compañeros de laboratorio por las experiencias enriquecedoras y los momentos agradables compartidos. Especialmente a Gabriela, quién siempre fue una excelente compañera de trabajo curiosa y perspicaz y se convirtió en una entrañable amiga. El doctorado fue más ameno porque estuviste todo el tiempo: cada idea, cada pensamiento compartido, nuestras charlas y momentos divertidos se han quedado guardados en la inmensidad de mi mente. ¡Qué dicha conocerte Gabriela! A Viry, quién llegó a amenizar nuestra convivencia y se convirtió en una buena amiga.

A la Lic. María Isabel Beltrán Villalobos por su invaluable enseñanzas y apoyo durante mi estancia en Cinvestav. Al Lic. Juan Javier López Guerrero por su apoyo y charlas motivadoras.

Al personal administrativo: Lic. Shareny Andrea Freyffeldt Flores por su apoyo y excelente trabajo; al Ing. Isaac Villalpando Ricaño por su apoyo y asistencia técnica e instalación de software de análisis de datos.

A las instituciones y organizaciones que contribuyeron significativamente a mi formación profesional: Conacyt, Society for Neuroscience, IBRO y El Colegio Nacional.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La esquizofrenia como un trastorno del neurodesarrollo	2
1.2. Circuitos hipocampales y formación de nuevas memorias.....	4
1.3. Mecanismos de plasticidad sináptica en el giro dentado	5
1.4. Separación de patrones y discriminación mnémica	7
1.5. Cambios anatómicos en giro dentado en la esquizofrenia	8
1.6. La hipofunción del receptor NMDA como un mecanismo de convergencia para el desarrollo de la esquizofrenia.....	9
1.7. Dopamina y farmacología en la esquizofrenia.....	12
1.8. El bloqueo postnatal del receptor NMDA como un modelo experimental de esquizofrenia	13
1.9. Emergencia del fenotipo esquizofrenia desencadenado por el bloqueo postnatal del receptor NMDA.....	14
1.10. Mecanismos celulares que dependen críticamente de la actividad de los receptores NMDA durante el desarrollo cerebral temprano.....	15
1.11. Cambios moleculares relacionados a la transmisión GABAérgica.....	16
1.12. Regulación de transmisión GABAérgica en procesos de memoria	18
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVO GENERAL	20
4.1. Objetivos particulares	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1. Animales.....	22
5.2. Modelo experimental tipo esquizofrenia	22
5.3. Prueba de separación de patrones.....	22
5.4. Prueba del laberinto de Barnes	23
5.5. Tratamiento farmacológico en pruebas conductuales	24
5.6. Registros electrofisiológicos	24
5.6.1. Obtención y registros extracelulares de rebanadas hipocampales.....	24
5.6.2. Estimulación sináptica de la corteza entorrinal-giro dentado (CE-GD).....	25
5.6.3. Identificación farmacológica de las respuestas sinápticas.....	25
5.6.4. Transmisión sináptica basal: Curvas entrada-salida (I-O)	26
5.6.5. Transmisión sináptica mediada por GABA.....	26

5.6.6. Proporción del pulso-pareado	26
5.6.7. Plasticidad sináptica de largo plazo: LTP y LTD.....	26
5.6.8. Modulación farmacológica de la señalización del 2-AG	27
5.7. Análisis estadístico	28
6. RESULTADOS	29
6.1. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora tempranamente la memoria espacial ..	29
6.2. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora tempranamente la discriminación espacial ³³	
6.3. La inhibición de GAT1 mejora el deterioro en la memoria espacial inducido por el tratamiento postnatal con MK-801 en animales jóvenes, pero no en animales adultos	37
6.4. La inhibición de GAT1 no mejora el deterioro en la discriminación espacial en animales adultos tratados postnatalmente con MK-801 pero sí en animales juveniles	40
6.5. Identificación farmacológica de las respuestas sinápticas en el GD	41
6.6. El tratamiento postnatal con MK-801 reduce selectivamente la transmisión sináptica basal en la MPP-DG, pero no en la sinapsis LPP-GD de animales jóvenes	42
6.7. El tratamiento postnatal con MK-801 reduce la liberación presináptica en ambas divisiones de la vía perforante al giro dentado.....	46
6.8. La estimulación de baja frecuencia (LFS) a 3 Hz induce depresión sináptica en la sinapsis MPP-GD, pero no en la sinapsis LPP-GD de animales jóvenes	50
6.9. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora la LTD dependiente del receptor CB1 en la sinapsis MPP-GD de animales jóvenes	50
6.10. El tratamiento postnatal con MK-801 reduce la expresión funcional de los receptores CB1 en la sinapsis MPP-GD de animales juveniles	55
6.11. La inhibición de MAGL restaura la LTD en la sinapsis MPP-GD de animales postnatalmente tratados con MK-801	57
6.12. La estimulación en ráfaga teta (TBS) induce LTP en las dos divisiones anatómicas de la vía perforante que convergen en el giro dentado.....	58
6.13. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora tempranamente la LTP en la sinapsis LPP-GD.....	63
6.14. El bloqueo postnatal del receptor NMDA debilita la LTP en la sinapsis fibras musgosas-CA3 de animales juveniles	66
7. DISCUSIÓN.....	68
7.1. Memoria espacial	69
7.2. Separación de patrones y discriminación mnemónica	69
7.3. Modulación farmacológica de GAT1 en procesos de memoria.....	71
7.4. Cambios en la transmisión sináptica y la liberación presináptica en la vía perforante .	74
7.5. Potenciación sináptica inducida por LFS en la sinapsis LPP-GD.....	75

7.6.	<i>Mecanismos que contribuyen a la LTD deteriorada en la sinapsis MPP-GD</i>	75
7.7.	<i>Potenciación sináptica</i>	77
7.8.	<i>Plasticidad y conducta</i>	78
7.9.	<i>Consideraciones y limitaciones del estudio</i>	81
8.	CONCLUSIÓN GENERAL	82
9.	PERSPECTIVAS	83
10.	REFERENCIAS.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora la memoria espacial en ratas juveniles. ..	29
Figura 2. El tratamiento postnatal con MK-801 incrementa la actividad locomotora en animales juveniles durante la adquisición de la memoria espacial.	30
Figura 3. El deterioro en la memoria espacial inducido por el tratamiento postnatal con MK-801 se mantiene hasta la etapa adulta temprana.	32
Figura 4. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora tempranamente la discriminación espacial en la prueba de separación de patrones de objetos.	34
Figura 5. El deterioro en la discriminación espacial inducida por el tratamiento postnatal con MK-801 se mantiene en animales adultos.	36
Figura 6. La inhibición de GAT1 mejora la memoria espacial deteriorada por el tratamiento postnatal con MK-801 en animales juveniles, pero no en animales adultos.	39
Figura 7. La inhibición de GAT1 mejora la discriminación espacial en animales juveniles tratados postnatalmente con MK-801.	41
Figura 8. Identificación farmacológica de las respuestas sinápticas de la MPP y LPP.	42
Figura 9. El tratamiento postnatal con MK-801 reduce selectivamente la transmisión sináptica basal en la sinapsis MPP-GD, pero no en la sinapsis LPP-GD de animales juveniles.	44
Figura 10. El tratamiento postnatal con MK-801 reduce la transmisión GABAérgica en la sinapsis MPP-GD de animales adultos.	46
Figura 11. El tratamiento postnatal con MK-801 reduce la liberación presináptica tanto en la LPP como en la MPP de animales juveniles.	48
Figura 12. El tratamiento postnatal con MK-801 reduce la liberación presináptica en la MPP de animales adultos.	49
Figura 13. La estimulación de baja frecuencia (LFS) a 3 Hz induce LTD en la sinapsis de la MPP-GD, pero no en la sinapsis de la LPP-GD de animales jóvenes del grupo control.	51
Figura 14. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora la inducción de la LTD dependiente del receptor CB1 en la sinapsis MPP-GD de animales jóvenes.	53
Figura 15. El deterioro en la LTD inducida por el tratamiento postnatal con MK-801 se mantiene hasta la etapa adulta.	54
Figura 16. El tratamiento con MK-801 reduce la expresión funcional de los receptores CB1, pero no la síntesis de 2-AG en la sinapsis MPP-GD de animales juveniles.	56
Figura 17. La inhibición de MAGL restaura la LTD dependiente del receptor CB1 en la sinapsis MPP-GD de animales juveniles.	58
Figura 18. La estimulación en ráfaga teta induce LTP en las sinapsis LPP-GD y en la MPP-GD. 59	
Figura 19. El tratamiento postnatal con MK-801 debilita, pero no evita la expresión de la LTP inducida por estimulación en ráfaga teta (TBS) en la sinapsis MPP-GD de animales jóvenes.	61
Figura 20. Las células granulares reducen progresivamente su capacidad para expresar LTP en la sinapsis MPP-GD de animales adultos en respuesta al tratamiento postnatal con MK-801.	62

Figura 21. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora la LTP inducida por estimulación TBS en animales juveniles. 64

Figura 22. El deterioro en la LTP en la sinapsis LPP-GD inducida por el tratamiento postnatal con MK-801 se mantiene en animales adultos..... 65

Figura 23. El bloqueo postnatal del receptor NMDA debilita la LTP en la sinapsis fibras musgosas-CA3 en animales juveniles. 67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de latencia y número de errores en la fase de adquisición del laberinto de Barnes en animales juveniles.	38
Tabla 2. Valores de latencia y número de errores durante la fase de adquisición en la prueba del laberinto de Barnes en animales adultos.	39

ABREVIATURAS

2-AG: 2-araquidonilglicerol

CA: Cornus ammonis

CaMKII: cinasa II dependiente de calcio-calmodulina

CB1: receptor a cannabinoides tipo 1

CE: corteza entorrinal

ERK1/2: cinasa regulada por señal extracelular 1/2

fEPSP: potencial postsináptico excitador de campo

fIPSP: potencial postsináptico inhibidor de campo

GAT1: Transportador de GABA tipo 1

GD: giro dentado

HFS: estimulación de alta frecuencia

ID: índice de discriminación

LFS: estimulación de baja frecuencia

LPP: vía perforante lateral

LTD: depresión a largo plazo

LTP: potenciación a largo plazo

MAGL: monoacil glicerol lipasa

mGluRs: receptores metabotrópicos de glutamato

MPP: vía perforante media

NMDA: N-metil-D-aspartato

OPS: separación de patrones de objetos

P: posición

PKA: proteína cinasa A

PD: día postnatal

PPF: facilitación por pulso-pareado

PPR: relación por pulso-pareado

PTP: potenciación post-tetánica

PV: parvalbúmina

Q: cuadrante

SST: Somatostatina

TBS: estimulación en ráfaga teta

vGAT: transportador vesicular de GABA

τ_{PTP} : Constante de decaimiento tau de la potenciación post-tetánica.

RESUMEN

La evidencia acumulada sugiere que la hipofunción de los receptores NMDA durante el desarrollo cerebral temprano constituye un mecanismo central en la fisiopatología de la esquizofrenia. Experimentalmente, la desregulación postnatal temprana de estos receptores mediante la administración de antagonistas como el MK-801 en roedores desencadena múltiples anormalidades neurofisiológicas y conductuales asociadas a la esquizofrenia. A pesar del considerable progreso en la comprensión sobre cómo la desregulación hipocampal podría contribuir al fenotipo esquizofrenia, especialmente en el procesamiento cognitivo, la integridad de la transmisión y la plasticidad sináptica en el giro dentado y sus implicaciones conductuales son escasamente comprendidas. En este estudio, mediante una combinación de enfoques electrofisiológicos y conductuales, identificamos una serie de modificaciones en las propiedades sinápticas en la vía perforante lateral y medial (LPP y MPP) que proyectan al giro dentado, así como en el rendimiento cognitivo espacial de ratas macho juveniles y adultas, tratadas postnatalmente con MK-801 (día postnatal 7 al 11). A nivel conductual, en animales del grupo MK-801 observamos déficits en la memoria espacial desde la etapa juvenil y describimos por primera vez un deterioro en la discriminación espacial, una función cognitiva que requiere de la integridad funcional del giro dentado. La inhibición farmacológica de GAT1 con NNC-711 mejoró la memoria y la discriminación espacial únicamente durante la etapa juvenil, pero no en la etapa adulta de los animales del grupo MK-801. A nivel neuronal, encontramos efectos diferenciales entre la sinapsis LPP-GD y la sinapsis MPP-GD en la transmisión y liberación presináptica de glutamato desde la etapa juvenil. De manera similar, encontramos un deterioro persistente en la LTP presináptica en la sinapsis LPP-GD desde la etapa juvenil. En contraste, la sinapsis MPP-GD experimenta un deterioro progresivo en la LTP y una pérdida persistente de la LTD, parcialmente explicada por una expresión funcional reducida de los receptores CB1. De manera interesante, la inhibición de la enzima que degrada al 2-araquidonoilglicerol, la monoacilglicerol lipasa (MAGL), restaura la LTD en la sinapsis MPP-GD de animales del grupo MK-801. Nuestros hallazgos ofrecen evidencia descriptiva y mecanística sobre la desregulación en la transmisión y la plasticidad del giro dentado desde la etapa juvenil hasta la adulta, asociadas al bloqueo de los receptores NMDA en la etapa postnatal temprana. Consistente con las desregulaciones sinápticas, la memoria y la discriminación espacial exhiben deterioros desde la etapa juvenil de los animales tratados postnatalmente con MK-801. Dado los hallazgos conductuales y neurofisiológicos, la inhibición de GAT1 o la inhibición de MAGL podrían restaurar las capacidades cognitivas y plásticas alteradas en la fase temprana de la esquizofrenia.

ABSTRACT

Accumulating evidence suggests that hypofunction of NMDA receptors during early brain development is a critical mechanism in the pathophysiology of schizophrenia. Experimentally, the early postnatal dysregulation of these receptors by antagonists such as MK-801 in rodents induces many of the neurophysiological and behavioral abnormalities seen in schizophrenia. Although substantial progress has been made in understanding how hippocampal dysregulation may contribute to the schizophrenia-like phenotype, particularly in cognitive processing, the integrity of synaptic plasticity and transmission in the dentate gyrus and its behavioral consequences are poorly understood. In this study, by combining electrophysiological and behavioral approaches, we identified a series of changes in the synaptic properties of lateral and medial perforant paths synapsing the dentate gyrus, as well as in the spatial cognitive performance of juvenile and adult male rats treated postnatally with MK-801 (postnatal day 7 to 11). At the behavioral level, we observed deficits in spatial memory from the juvenile stage, and for the first time, we described an impairment in spatial discrimination, a cognitive function that requires the functional integrity of the dentate gyrus, in animals from the MK-801 group. Pharmacological inhibition of GAT1 improved spatial memory and discrimination in the juvenile stage of the MK-801 group. At the neuronal level, we found differential effects on the synaptic transmission and glutamate release between the MPP-DG and LPP-DG synapses from the juvenile stage. We also found a long-lasting impairment at the presynaptic LTP in the LPP-DG from the juvenile stage.

In contrast, the MPP-DG synapse shows a progressive impairment of LTP and a long-lasting loss of LTD, which is partially explained by a reduced functional expression of the CB1 receptors. Interestingly, inhibition of the MAGL enzyme, which breaks down 2-Arachidonoylglycerol, restores the LTD in the MPP-DG synapse of the MK-801 group. Our findings provide descriptive and mechanistic evidence for dysregulation of the synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus from the juvenile to the adult stages, which is associated with the postnatal blockade of NMDA receptors. Consistent with synaptic dysregulation, spatial memory and discrimination are impaired from the juvenile stage in animals treated postnatally with MK-801. Based on our neurophysiological and behavioral findings, pharmacological inhibition of GAT1 or MAGL may restore the cognitive and plastic abilities altered in the early or prodromal stages of schizophrenia.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo del cerebro es un proceso dinámico en el que múltiples mecanismos genéticamente programados y la poderosa influencia del ambiente trabajan cooperativamente a lo largo de las distintas etapas de la vida para formar un cerebro maduro. Esta interacción da forma a los circuitos locales y las redes neuronales que definen desde las funciones más básicas del cerebro, como la percepción sensorial, hasta las funciones más sofisticadas, como el pensamiento analítico. En las últimas décadas, se volvió evidente que múltiples trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia podrían tener su origen en el desarrollo prenatal derivado de la coincidencia de factores de riesgo tanto genéticos como ambientales (Murray *et al.*, 2017; Weinberger, 2017). Dado que el bloqueo de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) con ketamina o fenciclidina en individuos sanos induce una psicosis aguda (McCutcheon *et al.*, 2020) y múltiples factores de riesgo para la esquizofrenia (ambientales y genéticos) convergen en una hipofunción persistente de los receptores NMDA (Snyder & Gao, 2013, 2020; Nakazawa & Sapkota, 2020), actualmente esta hipofunción constituye uno de los mecanismos fisiopatológicos más relevantes para entender la neurobiología de la esquizofrenia. Consistente con este marco de referencia, el bloqueo postnatal temprano de los receptores NMDA en roedores es suficiente para reproducir múltiples anormalidades neurofisiológicas y conductuales distintivas de la esquizofrenia. Este enfoque experimental ofrece la posibilidad de entender cómo una alteración específica en un momento crítico del desarrollo temprano, es suficiente para desencadenar modificaciones persistentes en los circuitos cerebrales que sustentan la percepción, las conductas sociales, el funcionamiento ejecutivo y las funciones cognitivas, todas ellas alteradas en la esquizofrenia. En esta tesis, presentamos y discutimos evidencia neurofisiológica y conductual que demuestra que el giro dentado en conjunto con la corteza entorrinal de la formación hipocampal, el primer sitio de procesamiento de información durante la formación de nuevas memorias, experimentan múltiples modificaciones en sus propiedades sinápticas en respuesta al bloqueo postnatal temprano (al cual nos referimos como bloqueo postnatal) de los receptores NMDA. Múltiples modificaciones sinápticas se presentan desde una etapa juvenil y persisten hasta la etapa adulta. Durante la exploración de distintos procesos de plasticidad sináptica, encontramos que el receptor a endocannabinoide tipo 1 (CB1) es un regulador crítico de la plasticidad en

el giro dentado. En el grupo con bloqueo postnatal temprano del receptor NMDA, las alteraciones sinápticas en la liberación de neurotransmisores, transmisión y plasticidad sináptica de largo plazo coinciden con una reducción temprana en el rendimiento conductual en tareas que demandan procesamiento de información de tipo espacial y diferentes niveles de demanda cognitiva que requieren de la integridad funcional del giro dentado. Estos hallazgos y sus implicaciones se integran en el contexto de los síntomas cognitivos en una fase temprana o prodrómica y una fase crónica de la esquizofrenia. Así mismo, de acuerdo con nuestros resultados, discutimos la posibilidad de que favorecer la transmisión GABAérgica en una fase temprana de la esquizofrenia, a través de la inhibición del transportador de GABA 1 (GAT1), mejore las funciones cognitivas que requieren del procesamiento hipocampal.

1.1. La esquizofrenia como un trastorno del neurodesarrollo

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico caracterizado por una serie de síntomas clínicos identificados como positivos, negativos y cognitivos (Insel, 2010). Los síntomas positivos incluyen alucinaciones, delirios y pensamiento desorganizado. Los síntomas negativos comprenden expresión emocional deteriorada, anhedonia, aislamiento social y alogia. Por otra parte, los síntomas cognitivos comprenden déficits en el funcionamiento ejecutivo, la atención y en distintos tipos de memoria (Forsyth & Lewis, 2017).

Desde la propuesta inicial de Daniel Weinberg en 1986 sobre el origen de la esquizofrenia como un trastorno del neurodesarrollo, pronto se aceptó que la esquizofrenia es resultado de la interacción de múltiples factores genéticos y ambientales que coinciden durante periodos críticos del desarrollo temprano del cerebro (ej. desarrollo intrauterino) y cuya interacción permanece clínicamente silente hasta la aparición de la psicosis en la adolescencia tardía o la etapa adulta temprana (Murray *et al.*, 2017; Weinberger, 2017). Por ejemplo, la activación inmune materna durante el segundo trimestre del embarazo por múltiples agentes infecciosos (ej. influenza, rubéola, *Toxoplasma gondii*), la hipoxia perinatal y las complicaciones obstétricas son factores que confieren riesgo de desarrollar esquizofrenia (Fatemi & Folsom, 2009; Schmidt & Mirnic, 2014). En relación con el componente poligénico (Owen *et al.*, 2016), diversos polimorfismos se han relacionado con un alto riesgo de esquizofrenia incluyendo los genes que codifican para el receptor dopaminérgico D3, la neuregulina 1

(NRG1), la proteína de unión a distrobrevina (DTNBP1), el regulador de la señalización de la proteína G4 (RGS4), la catecol-O-metiltransferasa (COMT), la prolina deshidrogenasa (PRODH), la proteína del gen relacionado a la esquizofrenia 1 y 2 (DISC1 y DISC2) y el receptor serotoninérgico 5-HT_{2A} (Fatemi & Folsom, 2009). De manera interesante, la mayoría de las alteraciones génicas convergen de manera directa o indirecta en la modificación de la transmisión GABAérgica, glutamatérgica y dopaminérgica, sistemas de neurotransmisión comprometidos en la esquizofrenia.

Si bien los tratamientos farmacológicos de primera elección que están basados principalmente en el bloqueo de los receptores dopaminérgicos D2 demuestran una mejora sustancial en los síntomas positivos (McCutcheon *et al.*, 2020), su eficacia con respecto a los síntomas negativos y cognitivos resulta limitada. En este sentido, diversos estudios sugieren que mejorar los síntomas cognitivos puede ser el mejor predictor para la mejoría global de pacientes con esquizofrenia dando como resultado una mayor inclusión social y un aumento en la tasa de empleo (Insel, 2010). Entre las alteraciones cognitivas observadas en estos pacientes, los déficits de memoria episódica, de trabajo y espacial (Bora & Murray, 2014; McCutcheon *et al.*, 2023) están bien documentados en la etapa adulta crónica, pero estas observaciones son menos consistentes en etapas tempranas de la enfermedad. Esto posiblemente se deba al escaso número de estudios que siguen el curso temporal de los síntomas cognitivos en individuos con alto riesgo a desarrollar esquizofrenia y la ausencia de pruebas cognitivas específicas para evaluar los componentes más finos de la memoria.

Sin embargo, dado la naturaleza del neurodesarrollo de la esquizofrenia, es probable que múltiples circuitos neuronales presenten modificaciones importantes durante una fase prodrómica de la enfermedad (Forsyth & Lewis, 2017). Desde esta perspectiva, al considerar que la maduración de los circuitos neuronales (de corteza primaria, secundaria, temporal, prefrontal etc.) responsables de sustentar conductas y funciones específicas (coordinación motora, desarrollo del lenguaje, memoria visual, funciones ejecutivas) ocurre de manera jerárquica durante la maduración cerebral, es posible esperar que algunos de los déficits cognitivos de la esquizofrenia pueden ser identificados de manera anticipada a los síntomas positivos observados en la etapa adulta temprana (Forsyth & Lewis, 2017). En el caso de la

memoria episódica y espacial, los circuitos neuronales implicados pertenecen a la formación hipocampal.

1.2. Circuitos hipocampales y formación de nuevas memorias

La capacidad de formar nuevas memorias depende de la acción coordinada del hipocampo (región CA3, CA2 y CA1) con otras estructuras adyacentes como el giro dentado (GD) y el subiculum, y que de manera colectiva componen a la formación hipocampal. Para integrar y almacenar temporalmente la información proveniente de múltiples dominios sensoriales, la información cortical debe ser procesada en los circuitos de la formación hipocampal por mecanismos de plasticidad (Deng *et al.*, 2010). De manera canónica, el flujo de información sináptica entra primeramente al GD a través de la vía perforante, los axones de las células estelares y piramidales de la corteza entorrinal. El siguiente relevo está compuesto por las sinapsis que hacen las fibras musgosas del GD con las neuronas piramidales de la región CA3. Posteriormente, estas células envían sus axones, las colaterales de Schaffer, a la región CA1 y finalmente la información regresan a la corteza entorrinal, previo relevo sináptico en el subiculum.

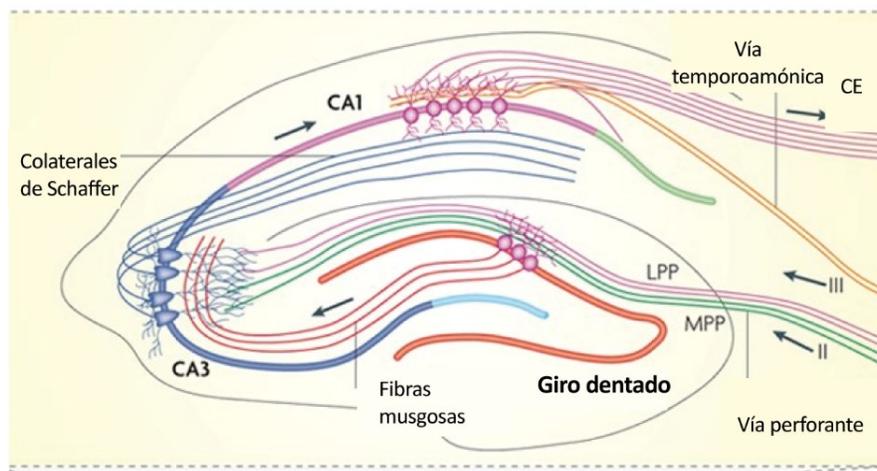


Ilustración 1. Circuitos hipocampales. Representación gráfica de los relevos sinápticos canónicos del flujo de información cortical hacia el hipocampo. En primera instancia la información desde la corteza entorrinal (CE) se transfiere a través de la vía perforante lateral (LPP) y medial (MPP) hacia el giro dentado. Posteriormente, la información viaja a través de las fibras musgosas hacia la región CA3 que a su vez releva la información hacia la región CA1 mediante las colaterales de Schaffer. Finalmente, la información regresa a la CE previo relevo sináptico en el subiculum. Modificada de Deng et al. (2010).

Debido a su posición espacial y participación temporal en el flujo de la información, el GD es una región crítica para la integración de la información y para la regulación de la excitabilidad hipocampal (Krueppel *et al.*, 2011). Las células granulares, la principal población neuronal del GD, reciben su principal entrada excitadora a través de la vía perforante, que son axones de células estelares (principalmente) y piramidales de la capa II de la corteza entorrinal. Anatómicamente, la vía perforante se divide en: vía perforante medial y lateral. Los axones de la vía perforante medial (MPP o *medial perforant path* por sus siglas en inglés), especializada en la transferencia de la información espacial, hacen sinapsis con la región dendrítica del tercio medio de la capa molecular del GD. En contraste, los axones de la vía perforante lateral (LPP o *lateral perforant path* por sus siglas en inglés) hacen sinapsis con la región dendrítica del tercio externo de la capa molecular del GD y esta vía es responsable de la transferencia de la información sensorial (ej. olfativa, somatosensorial, auditiva) (revisado en Jedlicka *et al.*, 2018). Las respuestas sinápticas tanto de la MPP como de la LPP pueden ser farmacológicamente identificadas de acuerdo con el patrón de expresión diferencial de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) del grupo II y del grupo III (Macek *et al.*, 1996). Los receptores mGluRs del grupo II están expresados preferencialmente en las terminales axónicas que componen a la MPP, mientras que los mGluRs del grupo III presentan una expresión selectiva en las terminales axónicas que componen la LPP (Shigemoto *et al.*, 1997). Dado que ambos grupos de receptores están acoplados a proteínas G α i, la activación de los mGluRs del grupo II deprimirá las respuestas sinápticas de la MPP-GD, pero no de la sinapsis LPP-GD, mientras que la activación de los mGluRs del grupo III deprimirá las respuestas sinápticas de la LPP-GD, pero no las respuestas de la sinapsis MPP-GD. En resumen, el GD tiene una posición anatómica privilegiada que le permite integrar y regular la transferencia de la información espacial y sensorial proveniente desde la corteza entorrinal. De igual manera, las respuestas electrofisiológicas de las sinapsis MPP-GD y LPP-GD pueden ser diferenciadas farmacológicamente.

1.3. Mecanismos de plasticidad sináptica en el giro dentado

De manera similar a otras subestructuras hipocampales, el GD muestra distintas formas de plasticidad en las sinapsis formadas entre la MPP o la LPP y las células granulares (Colino

& Malenka, 1993; Wang *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2006). En esencia, la plasticidad sináptica determina qué tan eficientemente se comunican las neuronas entre sí a través del tiempo. Entre las formas de plasticidad relevantes para el aprendizaje y la memoria (Manahan-Vaughan & Braunewell, 1999; Whitlock *et al.*, 2006), destacan la potenciación a largo plazo (LTP), caracterizada por un aumento en la fuerza sináptica, y la depresión a largo plazo (LTD), entendida como una disminución de la fuerza sináptica. Conceptualmente, la fuerza sináptica es una medida semicuantitativa de la comunicación sináptica expresada en términos de receptores ionotrópicos de glutamato (generalmente receptores AMPA) que se activan en respuesta a la liberación presináptica de glutamato (Oulé *et al.*, 2021).

Los mecanismos moleculares que subyacen a la plasticidad sináptica son la generación de cambios en la maquinaria molecular a nivel presináptico o postsináptico. Generalmente, los cambios a nivel presináptico convergen en cambios en la liberación de neurotransmisores (Wang *et al.*, 2016). En contraste, la plasticidad a nivel postsináptico involucra el tráfico de receptores AMPA a la membrana, reorganización del citoesqueleto, transcripción génica y síntesis de proteínas del complejo densidad-postsináptica (Forsyth & Lewis, 2017). Por esta razón, los cambios en la plasticidad sináptica a largo plazo como la LTP y la LTD, generalmente involucran cambios en la plasticidad estructural reflejados como modificaciones en la densidad de las espinas dendríticas, la formación de nuevas sinapsis y la reorganización del citoesqueleto (Forsyth & Lewis, 2017).

Por otra parte, aunque la contribución precisa de los mecanismos de plasticidad a la formación de nuevas memorias sigue siendo un tema bajo intensa investigación, la evidencia experimental demuestra que la LTP es esencial para la codificación de la información a nivel macroscópico o información crucial para la supervivencia (Davis *et al.*, 2004; Whitlock *et al.*, 2006; Kim & Cho, 2017). En contraste, la LTD está asociada a la codificación de la información relacionada a los detalles de una experiencia como un objeto nuevo o una nueva configuración espacial de objetos en un ambiente familiar (Manahan-Vaughan & Braunewell, 1999; Kemp & Manahan-Vaughan, 2008). Dado este conjunto de evidencia, se ha propuesto que la LTP y la LTD son mecanismos de plasticidad que contribuyen de manera cooperativa a la generación de representaciones neuronales de la memoria (Stacho & Manahan-Vaughan, 2022). Sin embargo, debido a la especialización funcional de las

subregiones hipocampales, es posible esperar que los mecanismos de plasticidad en cada subregión hipocampal contribuyan diferencialmente a la formación de una memoria.

1.4. Separación de patrones y discriminación mnémica

Las memorias episódicas referidas genéricamente como memorias dependientes del hipocampo son experiencias subjetivas adquiridas en un contexto espacial y temporal específico (Hainmueller & Bartos, 2020). Independientemente de su naturaleza (sensorial, motora, propioceptiva, espacial, etc.), la información en el cerebro es representada como patrones de disparo de poblaciones neuronales altamente organizados (Cayco-Gajic & Silver, 2019). Hoy en día gracias a las contribuciones teóricas realizadas por Richard Semon en 1904 sobre los engramas y por Donald Hebb en 1949 sobre la plasticidad sináptica, es ampliamente aceptado que la memoria se mantiene como una representación neuronal o un engrama codificada por cambios en la plasticidad sináptica de un conjunto de neuronas activadas durante el aprendizaje (Josselyn *et al.*, 2015; Tonegawa *et al.*, 2015). La reactivación de esta representación neuronal es responsable de la evocación de una memoria. Sin embargo, cuando ciertos eventos o experiencias comparten una alta similitud en contenido, se requiere de la separación de patrones neuronales. Este fenómeno representa un cómputo neuronal implementado por el GD que mantiene individualizadas las representaciones neuronales de eventos con alta similitud (Deng *et al.*, 2013). Esto significa que entre más parecida sea la información de dos experiencias, el GD debe maximizar esas diferencias para formar representaciones neuronales lo más diferente posibles. A este proceso también se le conoce como ortogonalización (Yassa & Stark, 2011; Santoro, 2013). De este modo, en condiciones de alta similitud en la información, inicialmente el GD previene que la información de un evento sea remplazada o confundida con la información de otro evento cercano en el tiempo (Yassa & Stark, 2011), lo cual permite su almacenamiento como memorias independientes. Lo anterior considerando que las diferencias maximizadas en el GD son amplificadas en la región CA3 (Madar *et al.*, 2019).

Un ejemplo de una situación que requiere de separación de patrones neuronales se representa en la ilustración 2, donde un pequeño cambio en la información sensorial en el ambiente (ausencia o presencia de un ratón) es suficiente para que nuestro cerebro note o discrimine que las representaciones gráficas son independientes a pesar de su alta similitud (Cayco-Gajic

& Silver, 2019). Por esta razón, algunos autores como Santoro (2013) sugieren utilizar el término discriminación mnemónica para referirse a la manifestación conductual de la separación de patrones neuronales.

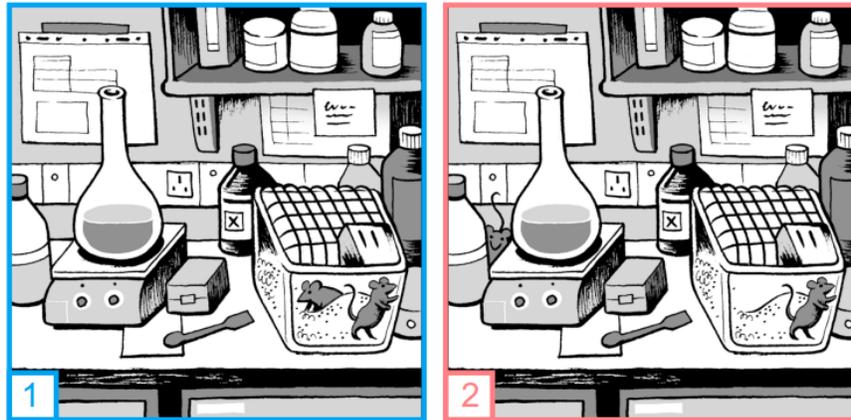


Ilustración 2. Representación gráfica de la habilidad inherente del cerebro de distinguir entre las diferencias sutiles pero importantes en 2 condiciones similares. Note que a pesar de que únicamente una fracción de información es diferente entre el conjunto total de información en ambas imágenes, las diferencias se vuelven rápidamente evidentes. Esta es la esencia que subyace a la separación de patrones orquestada por el giro dentado. Tomada de Cayco-Gajic y Silver (2019).

Por lo tanto, es posible esperar que alteraciones anatómicas o en la plasticidad sináptica en el GD interfieran con el funcionamiento apropiado de la separación de patrones y en consecuencia con la discriminación de eventos con alta similitud en contenido. El fallo en la discriminación de eventos similares inevitablemente conduciría a generalizar que los eventos son esencialmente idénticos.

1.5. Cambios anatómicos en giro dentado en la esquizofrenia

En relación con lo antes mencionado, múltiples estudios de neuroimagen indican que los pacientes con esquizofrenia presentan una disminución en el volumen de diversas estructuras cerebrales asociadas con la memoria, incluyendo estructuras de la región prefrontal (Yamasue *et al.*, 2004) y de la región hipocampal con sus estructuras adyacentes (Sim *et al.*, 2006). En este sentido, un estudio reciente en individuos con esquizofrenia demostró que la reducción en el volumen hipocampal no es igual cuando se distinguen las estructuras que componen al hipocampo, siendo el GD la estructura con mayor pérdida en volumen (Nakahara *et al.*, 2020). Este reporte sugiere que el GD puede tener una participación

importante en la esquizofrenia, en especial, en la desregulación de la separación de patrones neuronales que es fundamental para la formación de nuevas memorias. Consistente con esta idea, un estudio reciente en individuos con « primer episodio psicótico » reveló déficits en la discriminación mnemónica (Kraguljac *et al.*, 2021). En este estudio se comparó el rendimiento de un grupo de 23 pacientes con diagnóstico de esquizofrenia y trastorno esquizoafectivo (22.65 ± 1.03 años, media \pm desviación estándar; 69.6% hombres y 30.4% mujeres) con un grupo de voluntarios sanos (22.65 ± 0.93 años, media \pm desviación estándar; 69.6% hombres) en la prueba de separación de patrones que se evaluó en dos fases. En la fase de codificación, a ambos grupos experimentales se les presentó una secuencia de imágenes por computadora y 5 minutos después se realizó la fase de reconocimiento donde se evaluó la discriminación mnemónica. En la fase de reconocimiento, nuevamente a los participantes se les presentó una secuencia de imágenes de las cuales dos tercios fueron idénticas (un tercio) o similares (un tercio) a las presentadas en la fase de codificación, el otro tercio fueron imágenes nuevas. Los resultados de la prueba revelaron que los pacientes con primer episodio psicótico identificaron menos eficientemente a las imágenes similares en comparación con el grupo control, En otras palabras, los pacientes con primer episodio psicótico no diferenciaban correctamente a aquellas imágenes con características similares a imágenes presentadas en la fase de codificación. No obstante, si la integridad funcional y cognitiva del GD puede estar comprometida en la fase prodrómica de la esquizofrenia, es una cuestión aún sin resolver.

1.6. La hipofunción del receptor NMDA como un mecanismo de convergencia para el desarrollo de la esquizofrenia

Como describimos previamente, la esquizofrenia es resultado de la interacción de múltiples factores genéticos y ambientales que coinciden durante el desarrollo intrauterino y que permanecen clínicamente silentes hasta la aparición de los síntomas psicóticos (Murray *et al.*, 2017; Weinberger, 2017). Incluso, esta interacción entre los factores de riesgo podría ser incrementada por drogas de abuso y factores sociales adversos en la infancia, como la pérdida de un padre, maltrato, abuso sexual y físico (Murray *et al.*, 2017). De acuerdo con este marco teórico, un conjunto de evidencias creciente sugiere que la hipofunción del receptor NMDA en el desarrollo temprano es un mecanismo de convergencia de múltiples factores de riesgo

tanto genéticos como ambientales (Snyder & Gao, 2013; Forsyth & Lewis, 2017; Nakazawa & Sapkota, 2020).

Existe evidencia genómica que sustenta cómo múltiples mutaciones génicas conllevan a la disfunción de los receptores NMDA. Por ejemplo, un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) en pacientes con esquizofrenia (36,989 casos vs. 113,075 controles), el cual es un enfoque genómico para identificar variantes génicas de riesgo para una enfermedad determinada, identificó que las variantes génicas de la subunidad GluN2A de los receptores NMDA (*GRIN2A*), la serina racemasa (*SRR*), la subunidad GluA1 del receptor AMPA (*GRI1*) y el receptor metabotrópico de glutamato tipo 3 (*GRM3*) están asociadas con un alto riesgo de desarrollar esquizofrenia (Ripke *et al.*, 2014). Estas alteraciones génicas contribuyen a la expresión funcional reducida de los receptores NMDA debido a que la subunidad GluN2A, es una subunidad constitutiva para el ensamblaje funcional de los receptores NMDA expresados tanto en neuronas glutamatérgicas como en interneuronas GABAérgicas (Geoffroy *et al.*, 2022) y la serina racemasa es responsable de la síntesis del principal coagonista de estos receptores, la D-serina (Balu & Coyle, 2015). En este trabajo, utilizamos el término expresión funcional para hacer referencia a la manifestación de una respuesta neurofisiológica que ocurre por la activación farmacológica de un receptor o canal iónico en una sinapsis específica. En este sentido, las técnicas electrofisiológicas son comúnmente utilizadas para evaluar posibles cambios en la expresión funcional de receptores o canales iónicos neuronales a través de los cambios en la magnitud de una respuesta neurofisiológica como el fEPSP, las corrientes iónicas (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc.) o las conductancias iónicas (Hollmann *et al.*, 1989).

Además, múltiples variantes génicas en la subunidad GluA1 modifican las propiedades biofísicas de los receptores AMPA, tales como la conductancia iónica y la desensibilización rápida (Ismail *et al.*, 2022). Por lo tanto, dada la estrecha relación sincrónica entre los receptores AMPA y los receptores NMDA durante los procesos de plasticidad sináptica (Forsyth & Lewis, 2017), es posible esperar que un desbalance funcional de los receptores AMPA interfiera con la funcionalidad de los receptores NMDA. Adicionalmente, múltiples alteraciones génicas en proteínas de andamiaje (ej. la familia de proteínas MAGUK, cuya función de andamiaje permite la señalización de los elementos de la densidad postsináptica

con el citoesqueleto) interfieren con la función de los receptores NMDA debido a que estas proteínas dan estabilidad física a los receptores NMDA y también participan en el mantenimiento y en la remodelación del citoesqueleto desencadenada por la plasticidad (Forsyth & Lewis, 2017).

De manera similar, los factores ambientales de riesgo para desarrollar esquizofrenia contribuyen a la hipofunción de los receptores NMDA. Uno de los factores ambientales mejor documentados por estudios epidemiológicos es la activación inmune materna, cuyos mecanismos asociados desencadenan la activación de la vía de la kinurenina (Schwieler *et al.*, 2015). La activación inmune materna ha sido asociada con múltiples infecciones de distinta naturaleza (ej. vírica, parasitaria o bacteriana) como la influenza, la toxoplasmosis, el herpes y la rubéola (Brown & Derkits, 2010; Brown, 2012). Aunque la serie de eventos que conlleva la activación inmune materna al incremento de la vía de la kinurenina no está completamente entendida, hay evidencia que podría explicar este fenómeno. Por ejemplo, la activación inmune materna induce la síntesis y liberación periférica de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) que podrían atravesar la barrera hematoencefálica y activar a los astrocitos (Miller *et al.*, 2011). La microglía activada libera mediadores inflamatorios como la IL-1 β y la IL-6, cuyos niveles están elevados en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esquizofrenia (Schwieler *et al.*, 2015). Estas interleucinas incrementan la actividad la vía de la kinurenina cuyo producto final es la síntesis de ácido kinurénico (Schwieler *et al.*, 2015), el antagonista endógeno de los receptores NMDA. Así mismo, se han encontrado niveles elevados de ácido kinurénico en el líquido cerebrospinal de pacientes con esquizofrenia (Erhardt *et al.*, 2017). De manera similar, la hipoxia perinatal reduce la expresión de los receptores NMDA y eleva los niveles de especies reactivas de oxígeno, mientras que reduce agentes antioxidantes como el glutatión. El estrés oxidativo resultante reduce las corrientes de los receptores NMDA probablemente a través de la oxidación de los residuos de cisteína de las subunidades GluN1 y GluN2A (Nakazawa & Sapkota, 2020).

En conjunto, la evidencia antes descrita apoya la idea de que la hipofunción de los receptores NMDA es un punto de convergencia tanto de factores genéticos como ambientales. Esta reducción en la función de los receptores NMDA durante el desarrollo temprano del cerebro

es suficiente para modificar las trayectorias de la maduración de circuitos locales y consecuentemente del refinamiento sináptico (Forsyth & Lewis, 2017).

1.7. Dopamina y farmacología en la esquizofrenia

La «hipótesis de la dopamina» ha sido uno de los pilares teóricos para explicar principalmente los síntomas positivos de la esquizofrenia. Esta hipótesis sostiene que la transmisión dopaminérgica excesiva en el estriado asociativo es la responsable de los síntomas como las alucinaciones y los delirios, mientras que la actividad dopaminérgica reducida en la corteza frontal conduce a los déficits cognitivos y algunos síntomas afectivos (Cronenwett, 2016). De acuerdo con este marco teórico, los tratamientos farmacológicos disponibles para la esquizofrenia únicamente son efectivos para el alivio de los síntomas positivos como las alucinaciones y los delirios. En la farmacoterapia actual, hay un extenso arsenal de antipsicóticos disponibles para el tratamiento de la psicosis y cuya nomenclatura se diferencia en antipsicóticos de primera, segunda y tercera generación de acuerdo con su mecanismo de acción (Cronenwett, 2016). Todos ellos son efectivos para el alivio de la psicosis y difieren en su perfil de efectos secundarios.

Históricamente, los antipsicóticos de primera generación o típicos como la clorpromazina y el haloperidol, resultaron efectivos para el alivio de la psicosis, principalmente a través del bloqueo de los receptores de dopamina 2 (D2). Sin embargo, esta clase de antipsicóticos también presentó efectos secundarios conocidos como efectos extrapiramidales (parkinsonismo, distonías/movimientos involuntarios, discinesia tardía/ movimientos involuntarios retardados), sedación (a través del bloqueo de los receptores H1) y exacerbación de los síntomas cognitivos (a través del bloqueo de los receptores D1/5), lo cual limita la adherencia al tratamiento (Siafis *et al.*, 2023).

Posteriormente, el descubrimiento de que la clozapina mostraba efectos antipsicóticos sin efectos extrapiramidales ni empeoramiento cognitivo marcó el inicio de una nueva clase de antipsicóticos conocida como antipsicóticos de segunda generación o atípicos (ej. olanzapina, risperidona y quetiapina). Esta clase de antipsicóticos actúa principalmente bloqueando a los receptores 5-HT_{2A} y receptores D2, pero presentan mayor afinidad por los receptores 5-HT_{2A}. Una tercera generación de antipsicóticos inició con el desarrollo del aripiprazol y el

brexpiprazol, cuya característica distintiva en comparación con los antipsicóticos de segunda generación es que son agonistas parciales de los receptores D2. Este mecanismo de acción es relevante para la regulación de la transmisión dopaminérgica en la esquizofrenia. Por ejemplo, aripiprazol se comporta como agonista en la región frontal donde la actividad dopaminérgica es baja, pero en la región mesolímbica donde prevalece una actividad dopaminérgica elevada, el aripiprazol se comporta como antagonista (Cronenwett, 2016). Este mecanismo de acción dual hace que los antipsicóticos de tercera generación sean más eficientes para regular la transmisión dopaminérgica en pacientes con esquizofrenia. Sin embargo, a pesar de la contribución de los receptores de dopamina en algunas funciones cognitivas, los síntomas cognitivos de la esquizofrenia son mejor entendidos desde un marco teórico basado en la contribución crucial de los receptores NMDA a la formación de nuevas memorias.

1.8. El bloqueo postnatal del receptor NMDA como un modelo experimental de esquizofrenia

La hipótesis de la hipofunción de los receptores NMDA como un mecanismo clave en la esquizofrenia, es particularmente atractiva porque el bloqueo de estos receptores con antagonistas como la ketamina, la fenciclidina o el MK-801 en individuos sanos inducen efectos similares a la psicosis (Nakazawa & Sapkota, 2020). Aunque inicialmente gran parte del conocimiento de la fisiopatología de esquizofrenia provino de manipulaciones experimentales orientadas a reducir la función de los receptores NMDA en animales adultos, estos modelos no consideraban al neurodesarrollo como una etapa crítica para la génesis de la esquizofrenia (Lee & Zhou, 2019). En este contexto, dado que la hipofunción del receptor NMDA es un mecanismo de convergencia de múltiples factores de riesgo para la esquizofrenia (Snyder & Gao, 2013; Nakazawa & Sapkota, 2020), el bloqueo de estos receptores en la segunda semana postnatal de la rata, equivalente al segundo trimestre tardío del periodo gestacional humano (Clancy *et al.*, 2001), es considerado un modelo con validez de apariencia y de constructo. Lo anterior debido a que esta manipulación reproduce en los animales varias de las anormalidades neurofisiológicas y conductuales (véase el siguiente párrafo) descritas para la esquizofrenia (Jeevakumar *et al.*, 2015; Kjaerby *et al.*, 2017; Seshadri *et al.*, 2018; Griego *et al.*, 2022). La racionalidad subyacente a este modelo es que daños al cerebro fetal (ej. infecciones) durante el segundo trimestre tardío del embarazo confieren un alto riesgo de desarrollar esquizofrenia (Brown & Derkits, 2010) y el bloqueo

postnatal del receptor NMDA en ratas produce un fenotipo que mimetiza algunos aspectos de la esquizofrenia.

Por ejemplo, a nivel conductual el bloqueo postnatal del receptor NMDA con diferentes antagonistas (MK-801, fenciclidina o ketamina) o su delección génica constitutiva en células hipocámpales deterioran la memoria visual, la interacción social y el filtrado de información auditiva (Nozari *et al.*, 2014; Segev *et al.*, 2020). A nivel neurofisiológico, el bloqueo postnatal de estos receptores: 1) induce alteraciones en las oscilaciones teta y gamma tanto en el hipocampo como en la corteza prefrontal; 2) desregula la dinámica de redes corticales (por ejemplo, las avalanchas neuronales involucradas en el procesamiento cognitivo de orden superior como el lenguaje, la toma de decisiones y la creatividad); y 3) deteriora múltiples formas de plasticidad sináptica y no sináptica (por ejemplo, potenciación de la excitabilidad intrínseca) en el hipocampo (Kjaerby *et al.*, 2017; Seshadri *et al.*, 2018; Antonakou & Triarhou, 2020; Griego *et al.*, 2022). De manera similar, el bloqueo postnatal de los receptores NMDA desregula la liberación de glutamato y dopamina (Nakao *et al.*, 2019; Segev *et al.*, 2020) y modifica de manera diferencial la expresión funcional de canales iónicos y receptores en el hipocampo que controlan la excitabilidad intrínseca y la transmisión sináptica en la región CA1 (Griego *et al.*, 2022). En conjunto, la evidencia experimental previa indica que el bloqueo postnatal del receptor NMDA en ratas es un modelo experimental que reproduce múltiples anomalías conductuales y neurofisiológicas de la esquizofrenia.

1.9. Emergencia del fenotipo esquizofrenia desencadenado por el bloqueo postnatal del receptor NMDA

De manera interesante, las observaciones previas de otros grupos de investigación y del nuestro han demostrado que el bloqueo postnatal del receptor NMDA reproduce de manera ordenada múltiples conductas asociadas a la esquizofrenia en función del desarrollo (Furuie *et al.*, 2019; Hernández-Frausto *et al.*, 2019). Por ejemplo, las conductas asociadas a los síntomas negativos como los déficits en la interacción social se presentan desde la etapa juvenil y la adolescencia tardía, mientras que los déficits cognitivos como el deterioro en la memoria de reconocimiento es observado en la etapa adulta, pero no en una etapa juvenil (Hernández-Frausto *et al.*, 2019; López-Pacheco *et al.*, 2020). En este sentido, aunque las

alteraciones en la memoria de trabajo y en la memoria visual son parte de los déficits cognitivos clásicos de la esquizofrenia (McCutcheon *et al.*, 2023), estudios previos sugieren que funciones cognitivas más elementales y menos estudiadas como la memoria y la navegación espacial están deterioradas antes de su diagnóstico clínico (O'Connor *et al.*, 2009; Folley *et al.*, 2010; Wilkins *et al.*, 2013; Bora & Murray, 2014; Cogné *et al.*, 2017). Estos hallazgos son relevantes considerando que la memoria y la navegación espacial son funciones cognitivas requeridas para el adecuado funcionamiento de la memoria de trabajo y de la memoria visual (Eichenbaum, 2017). En consecuencia, es posible esperar resultados similares en modelos animales en los que se evalúen estas funciones cognitivas utilizando pruebas conductuales lo suficientemente específicas.

1.10. Mecanismos celulares que dependen críticamente de la actividad de los receptores NMDA durante el desarrollo cerebral temprano

Los receptores NMDA son reguladores importantes de la neurogénesis, la migración neuronal, la apoptosis y la sinaptogénesis durante el desarrollo prenatal del cerebro (Estes & McAllister, 2016). Asumiendo que estos receptores experimentan una reducción funcional en periodos críticos del desarrollo como el segundo trimestre del periodo gestacional (Brown & Derkits, 2010), es posible esperar que los eventos neuronales dominantes que ocurren en ese periodo, como la neurogénesis y la migración neuronal, se vean comprometidos (Estes & McAllister, 2016). Por ejemplo, el bloqueo sistémico de los receptores NMDA con ketamina en el día postnatal (PD) 7 reduce la migración de neuronas granulares recién nacidas (*new-born granule cells*) hacia la capa molecular del giro dentado y atenúa transitoriamente tanto la proliferación astrocítica como la proliferación de células progenitoras neuronales en la zona subgranular (Huang *et al.*, 2016). Durante el desarrollo postnatal en la rata, rápidamente hay un cambio (*switch*) en la expresión de la subunidad GluN2B por GluN2A de los receptores NMDA en regiones corticales e hipocampales, y la activación de receptores NMDA que contienen la subunidad GluN2A está asociada con la supervivencia neuronal (Pagano *et al.*, 2021). Por el contrario, la activación de los receptores NMDA que contienen la subunidad GluN2B (generalmente expresados en sitios extrasinápticos) está asociada a la muerte neuronal (Pagano *et al.*, 2021). Consistente con esta idea, el bloqueo sistémico de los receptores NMDA con MK-801 (0.25 a 1 mg/kg) durante el PD7 en la rata induce apoptosis

en múltiples regiones del cerebro incluyendo regiones hipocampales (GD, CA1, subículo), corteza prefrontal y varias regiones talámicas (Ikonomidou *et al.*, 1999). Este patrón de pérdida de neuronas en el segundo trimestre tardío debe ser suficiente para reducir la reserva neurogénica en la zona subgranular del giro dentado y la adecuada migración neuronal hacia múltiples estructuras cerebrales. Además, este periodo crítico podría extenderse hasta el tercer trimestre del periodo gestacional en condiciones de abuso de drogas como la ketamina y el alcohol, ambos antagonistas de los receptores NMDA (Ikonomidou *et al.*, 1999).

Los mecanismos clave por los cuales se cree que el bloqueo postnatal del receptor NMDA resulta en conductas tipo esquizofrenia son: la interferencia con los procesos de sinaptogénesis, el debilitamiento de los mecanismos de plasticidad sináptica, la maduración alterada de circuitos neuronales (por la alteración en el balance excitación/inhibición regulada por glutamato y GABA) y la alteración en las oscilaciones neuronales. En consecuencia, se hipotetiza que tales alteraciones siguen un orden de propagación temporal y que eventualmente convergen en una desconectividad funcional de las redes neuronales (Forsyth & Lewis, 2017; Seshadri *et al.*, 2018). Esto en principio, podría explicar la desincronización entre la región hipocampal y la región prefrontal observada en individuos con esquizofrenia.

1.11. Cambios moleculares relacionados a la transmisión GABAérgica

Los estudios de inmunohistoquímica post-mortem en individuos con esquizofrenia sugieren cambios en la transmisión GABAérgica. De acuerdo con esta evidencia, el bloqueo postnatal de los receptores NMDA desregula varios de los componentes moleculares de la transmisión GABAérgica. Por ejemplo, los estudios post-mortem con inmunohistoquímica han revelado una disminución en el marcaje de interneuronas GABAérgicas positivas a parvalbúmina (PV⁺) y positivas a somatostatina (SST⁺) (Konradi *et al.*, 2011), sugiriendo cambios en la inhibición GABAérgica a nivel somático y dendrítico, respectivamente. En modelos animales, la administración subcrónica (PD7 al PD14) de MK-801 (0.25 mg/kg, 2 veces al día) disminuyó desde la adolescencia, la expresión del transportador vesicular de GABA (vGAT) y la expresión de la proteína parvalbúmina (marcador de interneuronas

perisomáticas) en el GD, la región CA3 y la región CA1, cuya disminución se mantuvo hasta la etapa adulta (Li *et al.*, 2015). Así mismo, otro estudio reportó que el bloqueo postnatal de los receptores NMDA redujo la expresión hipocampal de la enzima GAD-67 que sintetiza GABA (Muruet-Goyena *et al.*, 2018). De manera similar, un estudio de imagen funcional - por tomografía por emisión de positrones en pacientes con esquizofrenia- reveló por primera vez una disminución en la transmisión GABAérgica en el hipocampo y regiones corticales circundantes (Frankle *et al.*, 2015). En conjunto, la evidencia descrita sugiere que podría haber una desregulación temprana en la transmisión GABAérgica en los circuitos hipocampales incluyendo al GD.

Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si la integridad funcional del GD podría estar comprometida en una fase temprana o prodrómica de la esquizofrenia. Esto es un tema particularmente interesante debido a que el GD es el primer sitio de procesamiento de información sensorial y espacial procedente de la corteza entorrinal (Hunsaker *et al.*, 2007) y los mecanismos que subyacen a la LTP y la LTD tanto de la MPP como de la LPP son menos entendidos que los de otras regiones hipocampales (región CA1 y la región CA3). Igual de relevante es determinar si a nivel conductual la discriminación mnemónica de experiencias similares que dependen críticamente de la separación de patrones en el GD (Yassa & Stark, 2011; Santoro, 2013) podría estar comprometida en una fase temprana de la esquizofrenia. En un primer estudio, nuestro grupo de trabajo encontró que la administración subcrónica postnatal de MK-801 induce una serie de alteraciones sinápticas en las regiones CA3-CA1 del hipocampo de animales juveniles (PD30), que anteceden a la aparición de déficits de memoria de reconocimiento y de interacción social, déficits conductuales que se mantienen hasta la etapa adulta temprana. Entre las alteraciones sinápticas tempranas se encontraron: disminución en la transmisión sináptica basal, deterioro en la inducción de la LTP y disminución en los procesos de plasticidad de corto plazo. No obstante, en la etapa adulta, estas alteraciones sinápticas se extendieron a otras formas de plasticidad como la LTD (Hernández-Frausto *et al.*, 2019). Estos hallazgos sugieren que múltiples formas de plasticidad sináptica están comprometidas tempranamente en la esquizofrenia, incluso previo a la manifestación de déficits conductuales. A pesar de estas observaciones, creemos que las alteraciones sinápticas encontradas en diferentes áreas hipocampales muy probablemente coincidan con alteraciones a nivel conductual. Si es el caso, el uso de pruebas conductuales

con suficiente resolución para evaluar componentes cognitivos más elementales como la memoria espacial o la discriminación mnemónica puede revelar déficits conductuales en el modelo experimental basado en el bloqueo postnatal del receptor NMDA.

1.12. Regulación de transmisión GABAérgica en procesos de memoria

Finalmente, la disminución de la transmisión GABAérgica observada en pacientes esquizofrénicos y en diversos modelos tipo esquizofrenia, sugiere la participación importante de este sistema en los déficits de memorias hipocampales. En este sentido, estudios previos han demostrado que la inhibición del transportador de GABA 1 (GAT1) con el fármaco NNC-711 administrado a dosis bajas (0.5 y 1.5 mg/kg) mejora el aprendizaje espacial (O'Connell *et al.*, 2001). Así mismo, la tiagabina (otro inhibidor selectivo de GAT1) fue capaz de revertir el deterioro de la LTD en la región CA1 inducido por la activación inmune materna (Rideau Batista Novais *et al.*, 2014), una manipulación experimental que resulta en conductas asociadas con la esquizofrenia. En conjunto, estos hallazgos sugieren que favorecer la transmisión GABAérgica a través de la inhibición de GAT1 podría mejorar los déficits en la plasticidad sináptica y en las memorias dependientes del hipocampo. Así mismo, debido a que la inhibición de GAT1 con tiagabina no incrementó los niveles de GABA en áreas corticales e hipocampales en individuos con esquizofrenia (Frankle *et al.*, 2015), existe la posibilidad que la inhibición de GAT1 pueda resultar más efectiva en fases tempranas de la esquizofrenia.

2. JUSTIFICACIÓN

El GD es una estructura esencial tanto para el procesamiento sensorial como cognitivo y se encuentra comprometido en la esquizofrenia. Así mismo, la reducción en la transmisión GABAérgica y en sus marcadores moleculares relacionados tanto en individuos con esquizofrenia como en modelos animales sugiere una desregulación de este sistema de transmisión.

Por otra parte, el bloqueo postnatal del receptor NMDA con MK-801 en ratas mimetiza síntomas de la esquizofrenia que incluyen los déficits cognitivos característicos de la etapa adulta. Sin embargo, las alteraciones en la plasticidad sináptica y las consecuencias en el procesamiento cognitivo en el que participa el GD durante el desarrollo de la esquizofrenia siguen siendo desconocidos hasta hoy.

Por lo tanto, este proyecto pretende identificar, utilizando un modelo tipo esquizofrenia en rata, el estado funcional de distintas formas de plasticidad en las sinapsis de la corteza entorrinal-GD y su posible asociación con alteraciones cognitivas tempranas y tardías. Así como determinar si el aumento en los niveles endógenos de GABA puede mejorar las posibles alteraciones cognitivas.

3. HIPÓTESIS

1) El bloqueo postnatal temprano del receptor NMDA:

- Deteriora tempranamente el rendimiento en la prueba separación de patrones de objetos.
- Deteriora distintas formas de plasticidad de corto y de largo plazo (LTP y LTD) en las sinapsis de la corteza entorrinal-giro dentado.

2) Favorecer la transmisión GABAérgica en la etapa juvenil, pero no adulta, de los animales con bloqueo postnatal temprano del receptor NMDA mejora los déficits de discriminación y memoria espacial de los animales.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar las posibles alteraciones (tempranas y tardías) en el rendimiento cognitivo y en la transmisión sináptica de la región corteza entorrinal-giro dentado en un modelo tipo esquizofrenia inducido por el bloqueo postnatal temprano del receptor NMDA y si la inhibición farmacológica de GAT1 mejora las posibles alteraciones conductuales generadas por el modelo.

4.1. Objetivos particulares

En el modelo tipo esquizofrenia:

1. Determinar los posibles déficits conductuales en la memoria espacial y en la separación de patrones de objetos.

a) Evaluar la memoria espacial mediante la prueba del laberinto de Barnes en animales juveniles (P30) y adultos (P90)

b) Validar la prueba de separación de patrones de objetos.

c) Determinar el rendimiento de los animales juveniles y adultos en las pruebas de laberinto de Barnes y de separación de patrones de objetos.

2. Determinar el efecto de la inhibición farmacológica del transportador de GABA 1 (GAT1) sobre la separación de patrones y la memoria espacial en animales juveniles y adultos.

3. Caracterizar la transmisión sináptica basal y la liberación presináptica de la vía perforante medial-giro dentado (MPP-GD) y vía perforante lateral-giro dentado (LPP-GD) de animales juveniles y adultos.
4. Determinar las posibles alteraciones en la plasticidad de largo plazo (LTP y LTD) en MPP-GD y LPP-GD de animales juveniles y adultos.
5. Determinar el efecto de la modulación farmacológica de la señalización del 2-AG sobre la LTD en la sinapsis MPP-GD de animales juveniles a través de:
 - a) la activación de los receptores CB1.
 - b) la estimulación de la síntesis de 2-AG.
 - c) la inhibición de la enzima MAGL que degrada el 2-AG.
6. Determinar los posibles cambios en la LTP en el relevo sináptico compuesto por las fibras musgosas y la región CA3 en animales juveniles.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales

Nuestros experimentos fueron realizados siguiendo la regulación local vigente 'NOM-062-ZOO-1999' para el cuidado y uso de animales de laboratorio y los protocolos aprobados por el Comité interno de ética de nuestra institución (CICUAL: 0272-18 y 0273-18). Estas regulaciones y protocolos están en apego con la guía para el cuidado de animales de los Institutos Nacionales de Salud (EU). Se utilizaron ratas Wistar macho de dos grupos de edad: juveniles (28 a 37 días postnatales, PD) y adultos (PD90-115), el día del nacimiento se consideró como PD0. Para la mayoría de las evaluaciones conductuales y electrofisiológicas, cada grupo experimental provino de 5 diferentes camadas. En un subconjunto de experimentos exploratorios de plasticidad sináptica y modulación farmacológica de la enzima MAGL y del receptor CB1 (véase más adelante), cada grupo experimental provino de 3 o 4 camadas diferentes, respectivamente. Inicialmente, los animales se mantuvieron en compañía de su madre en una habitación con un ciclo invertido de luz/oscuridad de 12 h (la luz se encendía a las 10 pm), temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) y acceso a alimento estándar y agua ad libitum.

5.2. Modelo experimental tipo esquizofrenia

Para mimetizar un modelo tipo esquizofrenia, ratas Wistar macho neonatas de 7 días de edad fueron administradas por 5 días consecutivos (PD7 al PD11) con el antagonista no competitivo del receptor NMDA, el MK-801 a una dosis de 0.2 mg/kg (s.c.) en un volumen de 2 mL/kg o con solución salina 0.9% para el grupo control, como ha sido reportado anteriormente (Griego *et al.*, 2022). Este periodo de administración del MK-801 en ratas es equivalente al segundo trimestre tardío del periodo de gestación en humanos (Clancy *et al.*, 2001). Después del tratamiento, los animales permanecieron bajo cuidado materno hasta el PD21.

5.3. Prueba de separación de patrones

Para evaluar conductualmente el estado funcional del GD, validamos la prueba de separación de patrones de objetos (OPS) descrita por el grupo de van Goethem *et al.* (van Goethem *et al.*, 2018). Esta prueba evalúa la separación de patrones espacial mediada por el giro dentado. Para reducir el estrés de los animales derivado de la manipulación experimental, los animales fueron manipulados dos veces al día (2-3 minutos) durante 5 días consecutivos

antes de empezar las pruebas conductuales. Las evaluaciones conductuales fueron realizadas en una arena circular con paredes grises (40 cm de altura y 83 cm de diámetro) que se alojó en una habitación experimental iluminada con luz roja. Esta prueba consistió en dos fases: una fase de aprendizaje donde el animal exploró por 3 minutos dos objetos idénticos (separados a 40 cm sobre la línea media) al interior de la arena circular. La fase de prueba tuvo una duración de 3 minutos y se realizó 1 h después de la primera fase. Esta fase consistió en desplazar uno de los objetos a una de 5 posiciones configuradas de manera rigurosa (6 cm de intervalo entre posiciones) mientras que el otro objeto, el objeto estacionario, permaneció en la misma posición que en la fase de aprendizaje (posición 1). De esta manera, el desplazamiento del objeto fue máximo cuando se localizó en la posición 5 y nulo cuando se ubicó en la posición 1. Los resultados de esta prueba se expresan como un índice de discriminación (ID) y se calcularon con la siguiente expresión matemática:

$$ID = \frac{(\text{tiempo de exploración del objeto desplazado} - \text{tiempo de exploración del objeto estacionario})}{\text{tiempo total de exploración de ambos objetos}}$$

Debido a que se espera que la discriminación aumente de manera proporcional a la magnitud del desplazamiento del objeto (van Goethem *et al.*, 2018), los animales de ambos grupos fueron sometidos a la prueba en múltiples ocasiones (intervalo de 2 días entre pruebas) para determinar su rendimiento en cada una de las posiciones. Cabe destacar que el par de objetos utilizados en la prueba fueron idénticos para todos los animales en un mismo día, pero se intercambiaron por un par diferente entre las distintas sesiones para evitar su familiarización con los objetos.

5.4. Prueba del laberinto de Barnes

La prueba de laberinto de Barnes evalúa la memoria espacial y tiene como objetivo que un animal frente a un ambiente aversivo aprenda a localizar un agujero de escape (Gawel *et al.*, 2019). Esta prueba se realizó bajo condiciones tanto de luz blanca (durante todo el ensayo) como de ruido blanco (únicamente durante el tiempo de exploración) en una arena circular con 18 agujeros uniformemente distribuidos en la periferia, de los cuales uno funcionó como agujero de escape. La prueba consistió en dos fases: adquisición y retención que fueron videograbadas y analizadas *offline* con la unidad de interfaz gráfica Optimouse ejecutable en Matlab (Ben-Shaul, 2017). La fase de adquisición consistió en 2 ensayos con un intervalo

entre ensayos de 15-20 minutos, repetidos por 4 días consecutivos; cada ensayo consistió en colocar al animal en el interior de un cilindro (posicionado en el centro de la arena) por 10 s. Al finalizar este tiempo, al animal se le permitió explorar la arena por 3 minutos. Independientemente de que el animal encontrara o no el agujero de escape durante el tiempo de exploración, se le dejó o introdujo en el cajón de escape por al menos 30 s. Al finalizar este tiempo, el animal fue devuelto a su caja de alojamiento. La fase de prueba fue idéntica que los ensayos previos con la diferencia de que en este ensayo se retiró el cajón de escape y se cuantificó el tiempo que el animal permanecía en el cuadrante objetivo. Los parámetros que se cuantificaron fueron la latencia (tiempo en alcanzar el agujero de escape); el tiempo de permanencia en el cuadrante objetivo y el número de errores (agujeros explorados que no fueron el objetivo).

5.5. Tratamiento farmacológico en pruebas conductuales

Para evaluar el efecto de la inhibición de GAT1 sobre la separación de patrones y la memoria espacial, ratas juveniles y adultas del grupo MK-801 fueron administradas con el fármaco NNC-711 (un inhibidor potente y selectivo de GAT1, $pIC_{50}=7.4$). De acuerdo con observaciones previas, decidimos evaluar la dosis de 0.5 mg/kg (i.p.) que ha mostrado efectos positivos en la memoria espacial (O'Connell *et al.*, 2001). En la prueba de laberinto de Barnes, los animales fueron administrados (vía intraperitoneal) 30 minutos antes del primer ensayo de cada día de la fase de adquisición (una administración por día durante 4 días). En el caso de la prueba de separación de patrones, los animales recibieron una única dosis de NNC-711 30 minutos antes de la primera fase de la prueba.

5.6. Registros electrofisiológicos

5.6.1. Obtención y registros extracelulares de rebanadas hipocampales

Para la obtención de rebanadas hipocampales, los animales fueron decapitados bajo anestesia profunda con pentobarbital sódico 65 mg/kg (i.p.) antes de la extracción del cerebro. En breve, el cerebro fue disectado y fijado en la plataforma de un vibratomo donde se obtuvieron rebanadas transversales (385 μ m) de hipocampo dorsal por métodos validados (Griego *et al.*, 2022). El proceso de corte se realizó en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) alto en sacarosa (210 mM), el cual fue burbujeado constantemente con carbógeno (95% O₂ y 5%

CO₂). La composición del LCRA fue (en mM): 125 NaCl, 2.8 KCl, 2 MgSO₄, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂ y 10 D-glucosa. Posteriormente, las rebanadas se incubaron en un medio con composición similar al LCRA durante 25-30 minutos en baño maría a 32 °C y después se mantuvieron a temperatura ambiente por al menos 1 h antes de los registros electrofisiológicos. La composición del medio fue (en mM): 125 NaCl, 2 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 6 MgCl₂, 1 CaCl₂ y 10 D-glucosa. Finalmente, las rebanadas se transfirieron a una cámara de sumersión con perfusión constante de LCRA (2.5 ml/min) a una temperatura de 32 °C y con burbujeo continuo de carbógeno, la composición de la solución de registro fue idéntica a la solución de incubación con excepción del MgCl₂ y CaCl₂ cuyas concentraciones fueron de 1.5 mM y 2.5 mM, respectivamente.

5.6.2. Estimulación sináptica de la corteza entorrinal-giro dentado (CE-GD)

Para la obtención de registros de actividad sináptica en las sinapsis MPP-GD y LPP-GD, se colocó un electrodo de estimulación en el tercio medio o tercio externo de la capa molecular del giro dentado para estimular la vía perforante medial y lateral, respectivamente. Los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSPs) se registraron con un electrodo de borosilicato llenado con una solución 3M NaCl (1-2 Ω) y que fue posicionado simétricamente en línea horizontal al electrodo de estimulación a una distancia >300 μm.

5.6.3. Identificación farmacológica de las respuestas sinápticas

Para corroborar el origen presináptico de las respuestas sinápticas, evaluamos la sensibilidad farmacológica de los fEPSPs a los agonistas L-AP4 (20 μM) y DCG-IV (5 μM). La sensibilidad farmacológica de las respuestas está determinada por la expresión preferencial de los receptores mGlu del grupo II y grupo III en la MPP y la LPP, respectivamente (Shigemoto *et al.*, 1997). De acuerdo con este patrón de expresión, los fEPSP de la LPP son deprimidos por el L-AP4, pero no por el DCG-IV. Por el contrario, los fEPSPs de la MPP son deprimidos por el DCG-IV, pero no por el L-AP4 (Macek *et al.*, 1996). Este criterio farmacológico fue utilizado para corroborar la identidad de las respuestas sinápticas.

5.6.4. Transmisión sináptica basal: Curvas entrada-salida (I-O)

La transmisión sináptica basal fue determinada inyectando pulsos pareados (intervalo de 60 ms) crecientes de corriente (100 μ A, duración 100 μ s), adquiridos a una frecuencia de 0.067 Hz. Lo anterior con la finalidad de calcular la amplitud máxima de los fEPSPs resultantes.

5.6.5. Transmisión sináptica mediada por GABA

En un subconjunto de experimentos de rebanadas provenientes de animales adultos, se analizó el componente inhibitorio mediado por los receptores GABA_A mediante curvas I-O en la sinapsis MPP-GD. En condiciones de inhibición GABAérgica intacta, se realizó una curva I-O con pulsos crecientes de corriente (duración 100 μ s, 0.067 Hz) de 0 a 600 μ A con incrementos de 100 μ A. Una vez finalizada la curva I-O, se perfundió picrotoxina (50 μ M), un bloqueador de los receptores GABA_A, por al menos 15 minutos antes de repetir la curva I-O en la misma rebanada. Bajo estas condiciones experimentales, se desveló la transmisión sináptica mediada por GABA como anteriormente fue reportado (Wigström & Gustafsson, 1983). El componente GABAérgico fue calculado como el cambio en la amplitud máxima del fEPSP con inhibición intacta con la siguiente fórmula matemática:

$$\% \Delta \text{ Amplitud máxima del fEPSP} = \frac{(\text{Amplitud máxima del fEPSP con picrotoxina} - \text{Amplitud máxima del fEPSP sin picrotoxina})}{\text{Amplitud máxima del fEPSP sin picrotoxina}} \times 100$$

5.6.6. Proporción del pulso-pareado

La liberación presináptica fue cuantificada como la proporción del pulso pareado o PPR (Fioravante & Regehr, 2011). Para esto, se aplicaron dos pulsos de corriente (150-180 μ A) con intervalos entre estímulos de 40, 60, 100, 200 y 500 ms. El PPR fue calculado como el cociente de la amplitud del segundo fEPSP resultante entre el primer fEPSP resultante.

5.6.7. Plasticidad sináptica de largo plazo: LTP y LTD

Dado que el estudio de la LTP y la LTD con protocolos de inducción fisiológicamente relevantes han sido escasamente explorados en el GD, un subconjunto de experimentos estuvo orientado a determinar la eficacia de los protocolos de estimulación sináptica en ambas divisiones de la vía perforante. A menos que se indique lo contrario, todos los

experimentos de plasticidad se realizaron con inhibición GABAérgica intacta. Para la LTD, se adquirió una respuesta basal (50-70% de amplitud máxima del fEPSP, estimulación pareada a 60 ms repetida a 0.067 Hz) de 20 minutos y después se aplicó la estimulación de baja frecuencia (LFS) compuesta por 900 pulsos a 1 y 3 Hz y la respuesta fue registrada por 50 minutos. Para la LTP, se registró una respuesta basal (25-35% de la amplitud máxima del fEPSP, estimulación pareada a 60 ms repetida a 0.067 Hz) de 20 minutos y después se aplicaron diferentes números de trenes de ráfagas teta (TBS x 1, TBS x 2 o TBS x 3) y la respuesta resultante se registró por 60 minutos. Un tren TBS consistió en 10 ráfagas repetidas a la frecuencia teta de 5 Hz (200 ms) y cada ráfaga consistió en 5 estímulos de corriente a 100 Hz. El intervalo entre trenes fue de 10 s. La duración de los pulsos de corriente fue de 100 μ s. Una vez validados los protocolos de plasticidad sináptica, para cada experimento se obtuvo un registro de la respuesta basal de 20 minutos (estimulación pareada a 0.067 Hz), seguido del protocolo de estimulación correspondiente y la respuesta post-estimulación se registró por 90 minutos. Al final de los experimentos de plasticidad, se corroboró el origen presináptico de la respuesta con L-AP4 para la LPP y con DCG-IV para la MPP.

En el caso de la sinapsis fibras musgosas-CA3, con excepción de la estimulación de alta frecuencia (HFS, 3 trenes de 100 pulsos a 100 Hz con 10 s de intervalos entre trenes), la LTP fue evaluada en condiciones experimentales similares a las descritas previamente. En este caso, el electrodo de estimulación fue posicionado en el hilus y el electrodo de registro fue posicionado en el *stratum lucidum* de la región CA3b. La identidad de la respuesta fue corroborada con DCG-IV 5 μ M (Claiborne *et al.*, 1993).

5.6.8. Modulación farmacológica de la señalización del 2-AG

En un subconjunto de experimentos enfocados en la sinapsis MPP-GD de animales juveniles, WIN 55,212-2 (WIN, 5 μ M), un agonista de los receptores a endocannabinoides tipo 1 (CB₁) fue perfundido durante 15 minutos para examinar la LTD mediada por activación directa de los receptores CB₁, de acuerdo con lo anteriormente reportado (Fontaine *et al.*, 2020). Así mismo, fisostigmina (10 μ M), un inhibidor de la acetilcolinesterasa, fue perfundido por 15 minutos para evaluar la síntesis de 2-AG como se ha demostrado anteriormente en rebanadas hipocámpales (Wang, Cox, *et al.*, 2018; Wang, Jia, *et al.*, 2018).

Finalmente, en otro subconjunto de experimentos, JZL 184 (1 μ M), un inhibidor irreversible de la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL) que aumenta los niveles de 2-AG (Wang *et al.*, 2016) fue perfundido por 15 minutos en rebanadas del grupo MK-801 para analizar los efectos de la inhibición de MAGL durante la LFS a 3 Hz. Para estos experimentos, la perfusión del JZL 184 comenzó durante los últimos 10 minutos de la respuesta basal y mantuvo durante los 5 minutos de la LFS. En todos los experimentos mencionados, la respuesta basal fue de 20 minutos y la respuesta después de la perfusión de los fármacos fue de 90 minutos seguida de su identificación farmacológica con DCG-IV.

5.7. Análisis estadístico

Los datos de conducta y electrofisiología se expresan como la media \pm error estándar. Los datos de electrofisiología se presentan como número de rebanadas registradas provenientes de n animales. Pruebas de Kolmogorov-Smirnov fueron usadas para evaluar la normalidad de los datos. De acuerdo con la distribución de los datos, se utilizaron pruebas paramétricas o pruebas no paramétricas para la comparación de medias entre grupos según fuese el caso. En la mayoría de los casos, los datos presentaron una distribución no paramétrica. Sin embargo, en algunos casos, los datos de electrofisiología presentaron una distribución normal. Para la comparación de 2 medias se utilizaron las siguientes pruebas: t de Student pareada o no pareada, la prueba de Mann-Whitney o la prueba de Wilcoxon. Para la comparación de más de 2 medias con un factor (ej. tratamiento farmacológico) se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba post hoc de Dunn. Para la comparación de más de 2 grupos con 2 factores (ej. tratamiento, tiempo) se utilizó el ANOVA de 2 vías con la prueba post hoc de Holm-Šidák. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado como significativo.

6. RESULTADOS

6.1. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora tempranamente la memoria espacial

Utilizamos la prueba del laberinto de Barnes cuyas fases de adquisición y de retención evalúan el aprendizaje y la memoria espacial, respectivamente.

Juveniles

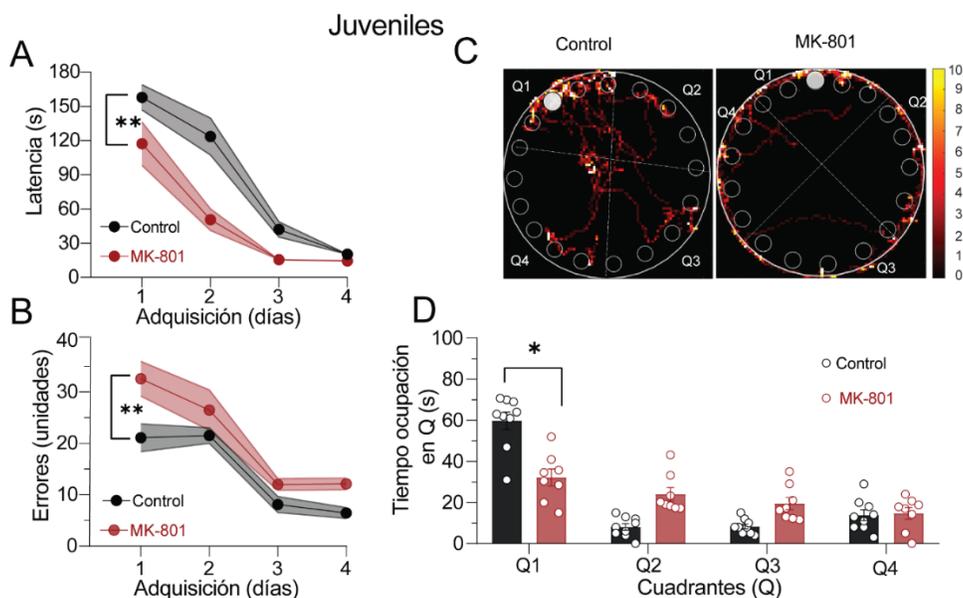


Figura 1. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora la memoria espacial en ratas juveniles. **A.** Curso temporal de la latencia (s) para encontrar el cajón de escape durante la fase de adquisición en el laberinto de Barnes. El grupo MK-801 mostró una menor latencia que el grupo control. **B.** Curso temporal del número de errores cometidos durante la fase de adquisición de la prueba de Barnes. En general, el grupo MK-801 mostró un mayor número de errores que el grupo control. **C.** Mapa de temperatura de un animal representativo de la condición control y MK-801 durante la fase de retención de la prueba de Barnes. El mapa se construyó a partir de la posición de la nariz del animal durante la fase de retención. El círculo blanco representa el agujero objetivo sin el cajón de escape. El área de coloración en el rango naranja a amarillo indica que el animal invirtió más tiempo en comparación con el resto de la superficie del laberinto. **D.** Gráfica de barras que resume el tiempo de permanencia por cuadrante en la fase de retención. El grupo MK-801 destinó un menor tiempo en el cuadrante objetivo (Q1) que el grupo control, evidenciando deterioro de memoria espacial. Q1-Q4 indican cuadrantes 1 a 4. Los datos se expresan como la media \pm error estándar, $*P < 0.01$, ANOVA de 2 vías de medidas, efecto tratamiento.

El aprendizaje espacial en animales del grupo control se observó como una disminución progresiva en la latencia (tiempo) para encontrar el agujero de escape durante los 4 días de la fase de adquisición ($n = 9$, Figura 1A). De manera sorprendente, el grupo MK-801 ($n = 8$) mostró valores menores de latencia que el grupo control (Control vs. MK-801 en día 1: 155.8 ± 11.11 vs. 117.1 ± 19.12 s; en día 2: 123.4 ± 16.18 vs. 50.56 ± 9.57 s; en día 3: 42.11 ± 6.8 vs. 15.56 ± 2.2 s; en día 4: 20.33 ± 2.5 vs. 14.31 ± 1.22 s; ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento: $F_{(1,15)} = 16.46$, $P < 0.05$; Figura 1A). Sin embargo, al cuantificar el número de errores, encontramos que el grupo MK-801 cometió un mayor número de errores que el grupo control durante la fase de adquisición (Control vs. MK-801 en día 1: 21.11 ± 2.7 vs. 32.63 ± 3.39 ; en día 2: 21.56 ± 1.57 vs. 26.5 ± 3.93 ; in día 3: 8.11 ± 1.56 vs. 12 ± 1.15 ; en día 4: 6.44 ± 1.1 vs. 12.13 ± 1.16 ; ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento: $F_{(1,15)} = 15.95$, $P < 0.05$; Figura 1B).

La latencia disminuida en el grupo MK-801 podría atribuirse a las diferencias en la actividad locomotora durante la fase de adquisición. En particular, encontramos que el grupo MK-801 presentó una mayor velocidad promedio de desplazamiento en comparación con el grupo control (Figura 2A), sin diferencias en la distancia recorrida (Figura 2B).

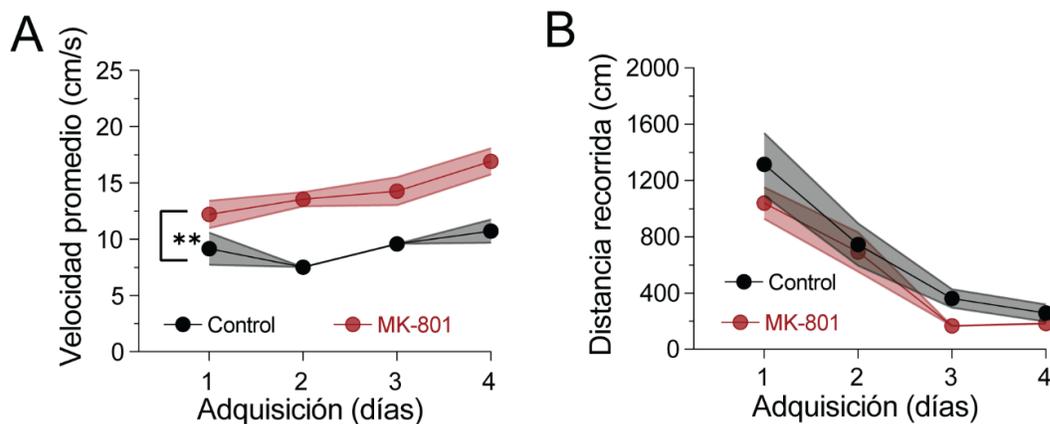


Figura 2. El tratamiento postnatal con MK-801 incrementa la actividad locomotora en animales juveniles durante la adquisición de la memoria espacial. A. Velocidad promedio de desplazamiento o distancia recorrida (en B) de los animales de los grupos control y MK-801 durante la fase de adquisición en la prueba del laberinto de Barnes. Los archivos de video fueron analizados en MATLAB con la interfaz gráfica Optimouse. $**P < 0.01$, ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento. $F_{(1,16)} = 47.49$. control $n = 10$ y MK-801, $n = 8$.

En la fase de retención, evaluamos la memoria espacial al cuantificar el tiempo que el animal permanecía en el cuadrante objetivo (Q1) en ausencia del cajón de escape. Observamos que mientras que el grupo control destinó un mayor tiempo de exploración en el Q1, el grupo

MK-801 destinó significativamente menos tiempo en explorar el Q1 (Control vs. MK-801 en Q1: 59.75 ± 4.31 vs. 30.4 ± 5.3 s; en Q2: 8.11 ± 1.61 vs. 27.22 ± 6.34 s; en Q3: 8.33 ± 1.2 vs. 21.32 ± 5.55 ; Q4: 13.78 ± 2.6 vs. 11.1 ± 3.72 s; ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto interacción: $F_{(3, 45)} = 15.85$, $P < 0.01$; prueba post-hoc Holm–Šidák, $P < 0.05$; Figura 1C-D). En resumen, un mayor número de errores y un menor tiempo de exploración del Q1 observados en el grupo MK-801 indican que el tratamiento postnatal con MK-801 deteriora tempranamente el aprendizaje y la memoria espacial que dependen de los circuitos hipocampales.

Adultos

Después nos preguntamos si el déficit en la memoria espacial inducido por el MK-801 podría ser un efecto transitorio o un efecto que se mantiene hasta la etapa adulta. Evaluamos la memoria espacial en animales adultos diferentes de aquellos que fueron evaluados en la etapa juvenil. Lo anterior con la finalidad de evitar cualquier activación potencial de trazas de engramas residuales (Tayler *et al.*, 2013) formados por la experiencia y que pudiera influir en el rendimiento de la memoria espacial (véase definición de engrama en la página 7).

En la fase de adquisición, encontramos que los animales del grupo MK-801 presentaron valores de latencia aumentados (Control vs. MK-801 en día 1: 93.17 ± 24.86 vs. 115.3 ± 18.71 s; en día 2: 31.67 ± 11.57 vs. 45.21 ± 13.62 s; en día 3: 22.7 ± 3.41 vs. 23.8 ± 8.3 s; en día 4: 20.22 ± 2.1 vs. 13.86 ± 2.1 s; ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento: $F_{(1, 15)} = 10.52$, $P < 0.05$; control, $n = 9$ y MK-801, $n = 8$; Figura 3A) y cometieron un mayor número de errores en comparación con el grupo control (Control vs. MK-801 en día 1: 11.78 ± 2.28 vs. 22.43 ± 6.81 ; en día 2: 7 ± 1.26 vs. 18.43 ± 6.81 ; en día 3: 7.11 ± 2.28 vs. 13.14 ± 3.28 ; en día 4: 3.67 ± 0.69 vs. 8.14 ± 1.58 ; ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento: $F_{(1, 15)} = 15.65$, $P < 0.05$; Figura 3B).

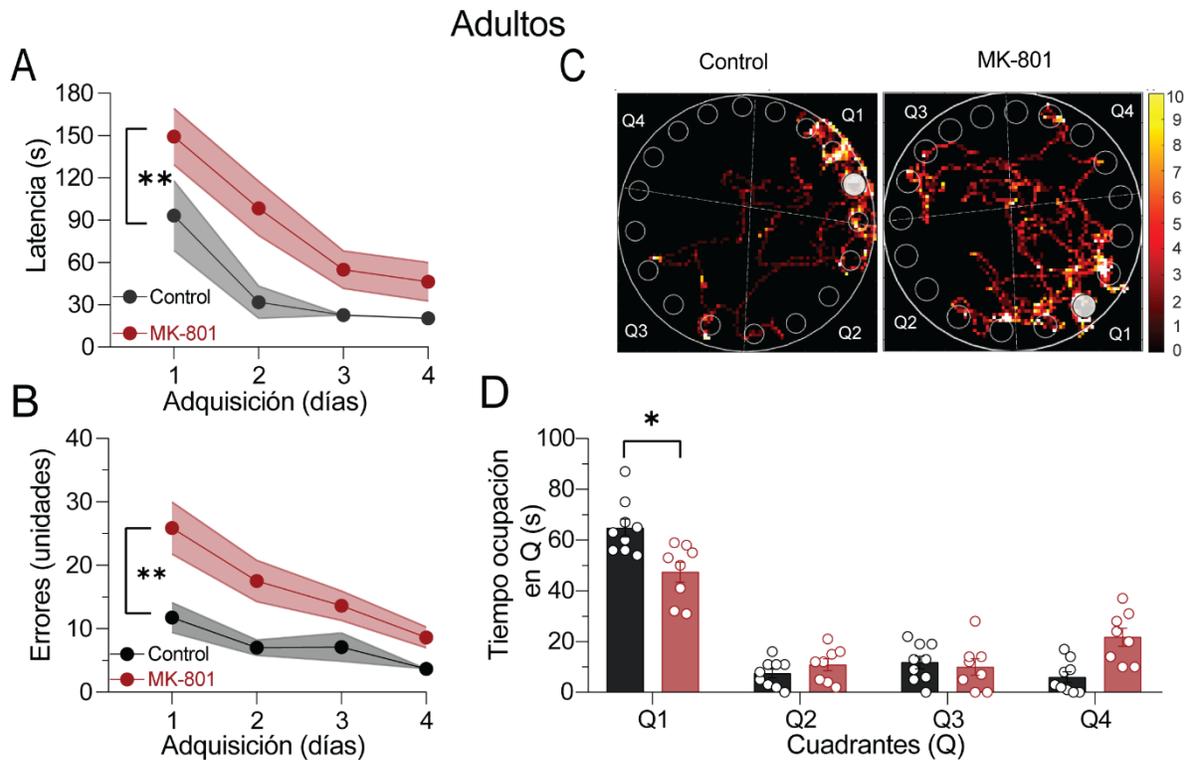


Figura 3. El deterioro en la memoria espacial inducido por el tratamiento postnatal con MK-801 se mantiene hasta la etapa adulta temprana. A. Curso temporal de la latencia (s) para encontrar el cajón de escape durante la fase de adquisición en la prueba de Barnes. El grupo MK-801 mostró una latencia aumentada para encontrar el cajón de escape en comparación con el grupo control. B. Mapa de temperatura de un animal representativo de la condición control y MK-801 durante la fase de retención en el laberinto de Barnes. El mapa se construyó a partir de la posición de la nariz del animal durante la fase de retención de la prueba de Barnes. El círculo blanco representa el agujero objetivo sin el cajón de escape. El área de coloración en el rango naranja a amarillo indica que el animal invirtió más tiempo en comparación con el resto de la superficie del laberinto. C. Curso temporal del número de errores cometidos durante la fase de adquisición. En general, el grupo MK-801 cometió un mayor número de errores que el grupo control. D. Gráfica de barras que resume el tiempo de permanencia por cuadrante en la fase de retención. El grupo MK-801 destinó un menor tiempo en el cuadrante objetivo (Q1) que el grupo control, evidenciando deterioro de memoria espacial. Q1-Q4 representan a los cuadrantes 1 a 4. * $P < 0.01$, ANOVA de 2 vías de medidas, efecto tratamiento.

Similar a los resultados con animales juveniles, en la fase de retención nuevamente encontramos que el grupo MK-801 invirtió menos tiempo en explorar el Q1 (Control vs. MK-801 en Q1: 64.78 ± 3.53 vs. 47.38 ± 3.98 s; en Q2: 7.44 ± 1.76 vs. 10.88 ± 2.35 s; en Q3: 11.78 ± 2.46 vs. 10 ± 3.26 ; en Q4: 6 ± 2.11 vs. 21.75 ± 3.54 s; ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto interacción: $F_{(3, 45)} = 8.22$, $P < 0.001$; prueba post-hoc Holm-Šidák, $P < 0.05$; Figura 3D). Los mapas de temperatura de la fase de recuperación en la Figura 3C ilustran de manera representativa que, aunque un animal del grupo MK-801 explora el Q1, su exploración no es preferencial por el Q1 como ocurre con un animal representativo del

grupo control. En conjunto, los resultados indican que el deterioro temprano en el aprendizaje y la memoria espacial inducidos por el MK-801, es un efecto que persiste hasta la etapa adulta.

6.2. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora tempranamente la discriminación espacial

La separación de patrones neuronales es uno de los componentes más finos de los procesos cognitivos y que depende de la integridad funcional del GD, el cual está comprometido en la fisiopatología de la esquizofrenia (Nakahara *et al.*, 2020). Por esta razón, evaluamos la capacidad de los animales para discriminar entre cambios sutiles en la posición espacial de un par de objetos iguales utilizando la prueba OPS descrita por van Goethem *et al.* (2018). Con la finalidad de evaluar de manera confiable la separación de patrones, únicamente analizamos los resultados de aquellos animales que mínimamente invirtieron 7 s de exploración a los objetos durante la fase 1 (T1) y 10 s de exploración durante la fase 2 (T2), como anteriormente se ha reportado (van Goethem *et al.*, 2018). De los datos de exploración registrados en T2, calculamos el índice de discriminación para cada una de las 5 configuraciones espaciales posibles de los objetos (Figura 4A).

Juveniles

En el grupo control, observamos que el índice de discriminación (ID) aumenta progresivamente desde la P1 hasta la P5 (Figura 2B), un hallazgo que reportamos por primera vez en animales juveniles. Esto significa que, a mayor magnitud de desplazamiento del objeto, menor es la demanda cognitiva requerida para diferenciar el cambio en la posición de un objeto. Por el contrario, cuanto menor sea la magnitud del desplazamiento del objeto, mayor es la demanda cognitiva para notar el cambio espacial del objeto en la prueba OPS. Por ejemplo, en la P3 observamos un rendimiento reducido, pero significativo en comparación con la P1, lo cual sugiere que con esta magnitud de desplazamiento del objeto se requiere del reclutamiento de la separación de patrones cuya expresión conductual se denomina discriminación mnemónica espacial (Santoro, 2013). En contraste, los animales del grupo MK-801 diferenciaron de manera eficiente el cambio en la posición espacial del objeto cuando el desplazamiento fue máximo (ID en P5, control vs. MK-801: 0.41 ± 0.035 vs. 0.43 ± 0.07 ; $n = 10$ para el grupo control y $n = 12$ para el grupo MK-801), y mostraron

valores comparables de ID en ausencia de desplazamiento del objeto (ID en P1, control vs. MK-801: 0.001 ± 0.021 vs. -0.01 ± 0.011). De manera interesante, cuando la magnitud de uno de los objetos fue desplazada de manera gradual desde la P4 hasta la P2, la habilidad de discriminación de los animales del grupo MK-801 estuvo reducida (ID en P4, control vs. MK-801: 0.38 ± 0.04 vs. 0.17 ± 0.05 ; ID en P3, control vs. MK-801: 0.25 ± 0.03 vs. 0.1 ± 0.04 ; ID en P2, control vs. MK-801: 0.07 ± 0.03 vs. 0.001 ± 0.01). Estas diferencias en los valores de ID fueron significativas en la P3 (ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento: $F_{(1, 20)} = 8.225$, $P < 0.01$; prueba post-hoc Holm-Šidák, $P < 0.05$).

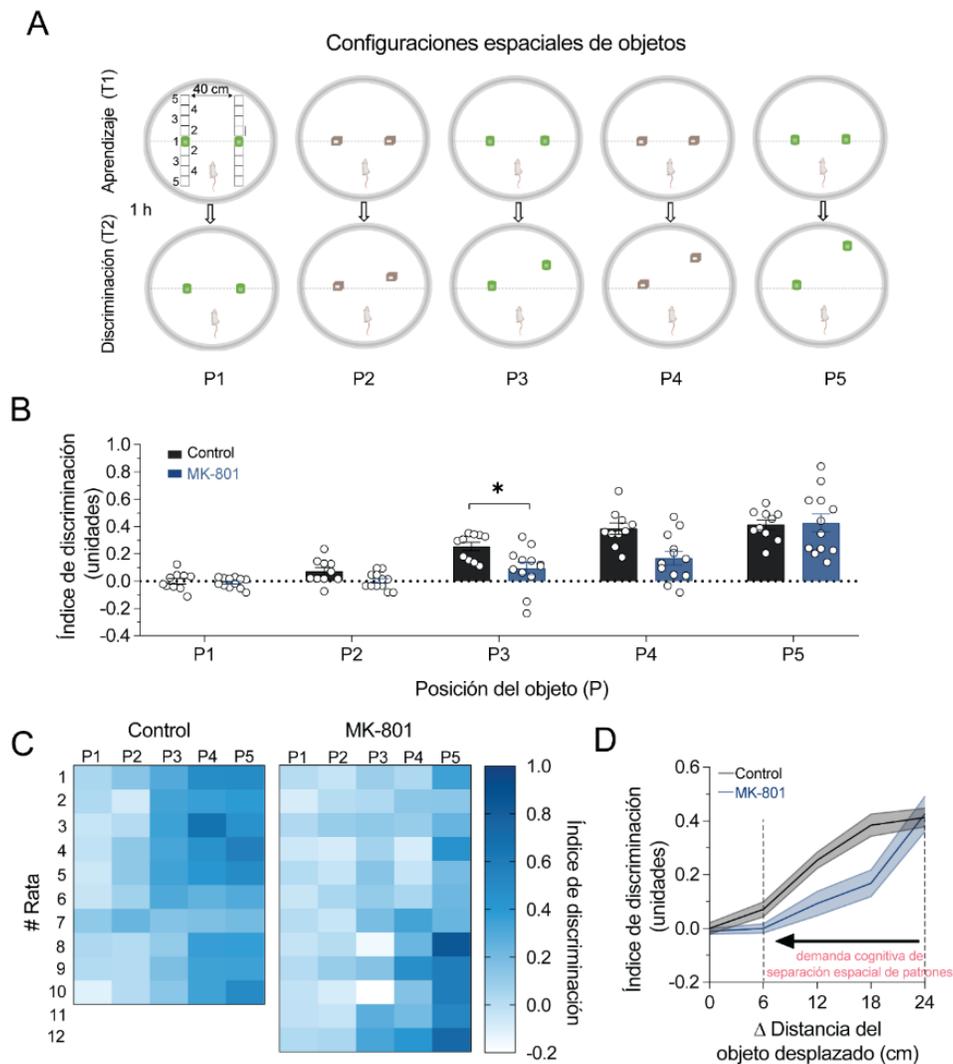


Figura 4. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora tempranamente la discriminación espacial en la prueba de separación de patrones de objetos. A Distintas configuraciones espaciales de un par de objetos

(color verde y amarillo) en las 5 posiciones (P) posibles durante la fase de aprendizaje (T1) y en la fase de prueba (T2) de la tarea de separación de patrones. En la fase de aprendizaje, las configuraciones espaciales de los objetos fueron idénticas en todas las posiciones. En la fase de prueba, uno de los objetos fue desplazado de manera métrica precisa a cada una de las posiciones determinadas (intervalos de 6 cm entre posiciones). B Gráfica de barras resumiendo los valores de índice de discriminación para cada una de las 5 posiciones posibles del objeto desplazado en la prueba de separación de patrones. El grupo control mostró un mejor desempeño en la prueba en función de la magnitud del desplazamiento. De igual manera, el grupo MK-801 exhibió un rendimiento similar al grupo control en la P5, pero en la P3 mostró un rendimiento deteriorado, lo cual sugiere un deterioro en la separación de patrones mediada por el giro dentado, $*P < 0.05$ ANOVA de 2 vías de medidas repetidas seguida de la prueba post hoc de post-hoc Holm-Šidák. C. Mapa de temperatura del grupo control y de grupo MK-801 mostrando el rendimiento (índice de discriminación) de cada uno de los animales en las 5 posiciones posibles donde se observó un rendimiento reducido de los animales en la P3. D. Representación esquemática de la demanda de la separación de patrones en la prueba de separación de objetos en animales control y MK-801. En esencia, el esquema muestra que la demanda cognitiva de la separación de patrones es inversamente proporcional a la magnitud del desplazamiento del objeto en T2. Los animales del grupo MK-801 exhiben un rendimiento deteriorado cuando la demanda de separación de patrones incrementa, mientras que este grupo exhibe un rendimiento similar al grupo control cuando la demanda de separación es baja o nula (P5).

El rendimiento individual de cada animal de los grupos control y MK-801 se muestra en el mapa de temperatura de la Figura 4C. Por lo tanto, aunque los animales del grupo MK-801 discriminan de manera adecuada una nueva posición espacial cuando el desplazamiento es máximo (P5), su habilidad de discriminación espacial se reduce cuando la magnitud del desplazamiento se estrecha gradualmente, una condición que aumenta la demanda de separación de patrones (Figura 4D). En conjunto, estos resultados indican que la discriminación espacial opera desde la etapa juvenil de los animales. Así mismo, el bloqueo postnatal con MK-801 deteriora tempranamente la discriminación espacial, la expresión conductual más probable detrás de la separación de patrones (Santoro, 2013).

Adultos

Consistente con observaciones previas (van Goethem *et al.*, 2018), encontramos que los animales del grupo control discriminan más fácilmente el objeto desplazado cuando la magnitud del desplazamiento es máxima (P5) y esta capacidad de discriminación disminuye cuando el desplazamiento del objeto es menor o nulo (ej. posición 1, ID ≈ 0 ; $n = 6$; Figura 5, barras negras). En comparación con el grupo control, los animales del grupo MK-801 ($n = 6$) mostraron una tendencia a presentar valores reducidos de ID en todas las posiciones, incluyendo un efecto estadísticamente significativo en la P3 (ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento: $F_{(1,10)} = 76.62$, $P < 0.001$; prueba post-hoc Holm-Šidák, $P < 0.05$ vs. Control en P3; Figura 5A, barras azules). Es importante mencionar que también los

animales del grupo MK-801 presentaron un rendimiento reducido en la P4 (prueba post-hoc Holm–Šidák, $P < 0.05$ vs. control) y P5 (prueba post-hoc Holm–Šidák, $P < 0.05$ vs. control), indicando que los déficits cognitivos en la etapa adulta se extienden a procesos cognitivos que no requieren de separación de patrones como la memoria espacial. Las diferencias en el rendimiento de cada animal de los grupos control y MK-801 también se observa en los mapas de temperatura en la Figura 5B. Estos resultados refuerzan la idea de que el deterioro en la separación de patrones forma parte de los déficits cognitivos observados en la esquizofrenia.

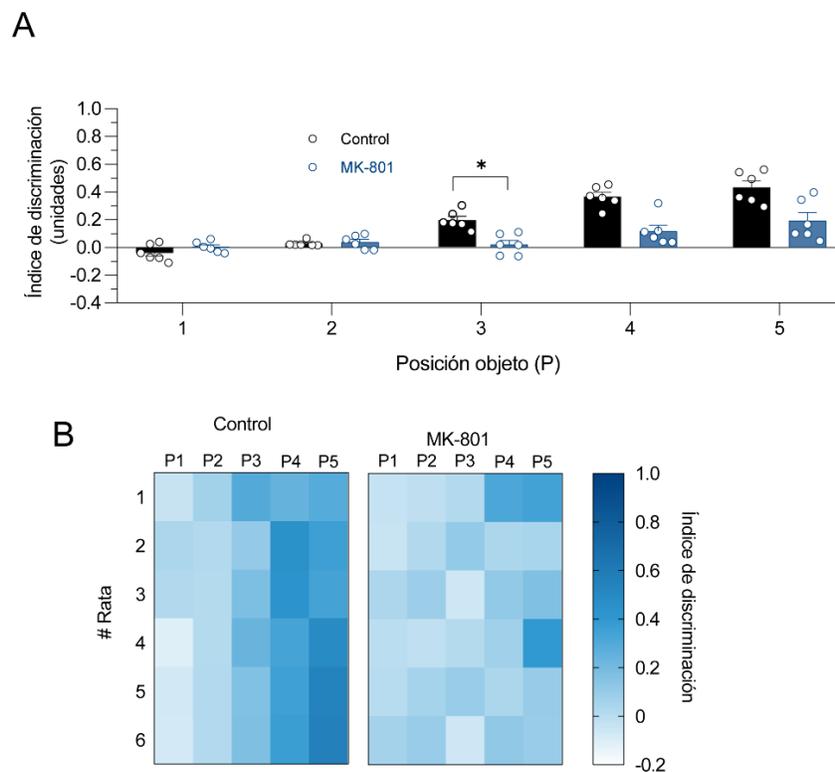


Figura 5. El deterioro en la discriminación espacial inducida por el tratamiento postnatal con MK-801 se mantiene en animales adultos. A. Gráfica de barras resumiendo los valores de índice de discriminación para cada una de las 5 posiciones posibles del objeto desplazado en la prueba de separación de patrones. El grupo MK-801 exhibió un rendimiento deteriorado en la P3, indicando que el deterioro en la etapa juvenil se mantiene en la etapa adulta de los animales. B. Mapa de temperatura del grupo control y del grupo MK-801 mostrando el rendimiento de cada uno de los animales en las 5 posiciones posibles. Observe que independientemente de la posición, los animales del grupo MK-801 presentaron valores reducidos de índice de discriminación. $*P < 0.05$, ANOVA de 2 vías de medidas repetidas seguida de la prueba post-hoc Holm–Šidák.

6.3. La inhibición de GAT1 mejora el deterioro en la memoria espacial inducido por el tratamiento postnatal con MK-801 en animales jóvenes, pero no en animales adultos

Dado que en la esquizofrenia una reducción en la transmisión GABAérgica está correlacionada positivamente con los déficits en múltiples procesos neuronales y cognitivos (Frankle *et al.*, 2015), las intervenciones terapéuticas en la etapa temprana o “prodrómica” orientadas a favorecer su actividad podrían ser más efectivas en comparación con intervenciones en la fase crónica de la esquizofrenia (Insel, 2010). Para determinar si el aumento en los niveles endógenos de GABA reduce los déficits de memoria espacial en el grupo MK-801, evaluamos el efecto de la inhibición farmacológica de GAT1 con dosis de NNC-711 que han demostrado ser efectivas en pruebas de memoria (O’Connell *et al.*, 2001). Encontramos que en animales del grupo MK-801, la administración de NNC-711 en dosis de 0.5 (n = 7) o 1.5 mg/kg (n = 6) durante cada día de la fase de adquisición, no modificó la latencia en comparación con el grupo MK-801 que no recibió tratamiento (Figura 6A).

Sin embargo, estos tratamientos disminuyeron el número de errores durante la fase de adquisición, donde únicamente la dosis de 0.5 mg/kg mostró un efecto significativo (ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento: $F_{(3, 27)} = 10.242$, $P < 0.001$; prueba post-hoc Holm-Šidák, $P < 0.05$ vs. MK-801; Figura 6B). La Tabla 1 resume los valores de latencia y el número de errores durante la fase adquisición para cada condición experimental. En la fase de retención, observamos que los animales del grupo MK-801 que recibieron la dosis de 0.5 mg/kg, pero no la dosis de 1.5 mg/kg del NNC-711, invirtieron más tiempo explorando el cuadrante objetivo que contenía el cajón de escape en comparación con los animales del grupo MK-801 que no recibieron tratamiento farmacológico [Tiempo en Q1 en control: 57.9 ± 5 s; en MK-801: 30.4 ± 5.3 s; en MK-801 + NNC-711 (0.5 mg/kg): 55.1 ± 2.8 s; en MK-801 + NNC-711 (1.5 mg/kg): 24.1 ± 5.7 s; prueba de Kruskal-Wallis $H_{(3)} = 15.75$, $P < 0.01$, prueba post-hoc Dunn, $P < 0.05$ en MK-801 vs. MK-801 + NNC-711 (0.5 mg/kg); Figura 6C]. Estos resultados indican que la inhibición del GAT1 mejora la memoria espacial en animales juveniles expuestos postnatalmente al MK-801.

Tabla 1. Valores de latencia y número de errores en la fase de adquisición del laberinto de Barnes en animales juveniles. Los valores se expresan como la media \pm error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ de la prueba post hoc Holm–Šidák precedida de un ANOVA de 2 vías de medidas repetidas. Los valores de P en el grupo MK-801 se comparan con el grupo control. Los valores de P en el grupo MK-801 + NNC-711 (0.5 o 1.5 mg/kg) se comparan con el grupo MK-801.

Tratamiento	Latencia (s)				Errores (unidades)			
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Control (n=10)	153.2 \pm 11	113.2 \pm 18	39.9 \pm 6.5	21.5 \pm 2.51	21.3 \pm 2.4	20.6 \pm 1.7	7.9 \pm 1.4	6.3 \pm 1
MK-801 (n=8)	117.1 \pm 19	50.6 \pm 9.6*	15.6 \pm 2.2*	14.31 \pm 1.2	32.6 \pm 3.4*	26.5 \pm 3.9	12 \pm 1.1	12.1 \pm 1.2**
MK-801 + NNC-711 (0.5 mg/kg) (n=7)	108.9 \pm 8.8*	41.2 \pm 8.7	33.6 \pm 5.1	16.75 \pm 2.1	17 \pm 2.2*	8.4 \pm 2**	6.9 \pm 1*	3.6 \pm 1**
MK-801 + NNC-711 (1.5 mg/kg) (n=6)	119.5 \pm 17	93.8 \pm 12.9	37.4 \pm 7.6	27.4 \pm 7.4	20.2 \pm 3.4*	18.5 \pm 1.9	10.3 \pm 3.4	10 \pm 3.8

En animales adultos, observamos resultados diferentes al evaluar la dosis efectiva de 0.5 mg/kg. En la fase adquisición, el tratamiento con NNC-711 a 0.5 mg/kg (n = 7) no modificó ni la latencia (Figura 6D) ni el número de errores (Figura 6E) en comparación con grupo MK-801 que no recibió tratamiento farmacológico (n = 8). La Tabla 2 resume los valores de latencia y del número de errores durante la fase de adquisición.

Tabla 2. Valores de latencia y número de errores durante la fase de adquisición en la prueba del laberinto de Barnes en animales adultos. Los valores se expresan como la media \pm error estándar.

Tratamiento	Latencia (s)				Errores (unidades)			
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Control (n=11)	76.6 \pm 18.3	37.1 \pm 11.6	22.4 \pm 3.1	19.2 \pm 2.5	13.1 \pm 2	7.4 \pm 1.4	5.2 \pm 1.1	4.3 \pm 0.6
MK-801 (n=8)	120.4 \pm 18	90.9 \pm 18.3	52.1 \pm 6	35.4 \pm 6.2	24 \pm 4.8	15.1 \pm 2.8	9.4 \pm 2.1	7.9 \pm 1.1
MK-801 + NNC-711 (0.5 mg/kg) (n=7)	144.9 \pm 17	107.5 \pm 27	77.6 \pm 20.5	43.25 \pm 12	26.6 \pm 4.2	9.71 \pm 2	12.3 \pm 2.7	7 \pm 1.4

Así mismo, el tratamiento con NNC-711 en animales MK-801 no mejoró la retención de la memoria espacial (Tiempo en Q1 en control: 62.9 \pm 3.15 s; en MK-801: 44.13 \pm 4 s; en MK-801 + NNC-711 (0.5 mg/kg): 43.3 \pm 6.8 s; Figura 6F). Estos datos indican que la inhibición de GAT1 no mejora los déficits en la memoria espacial en la etapa adulta de animales que fueron tratados postnatalmente con MK-801.

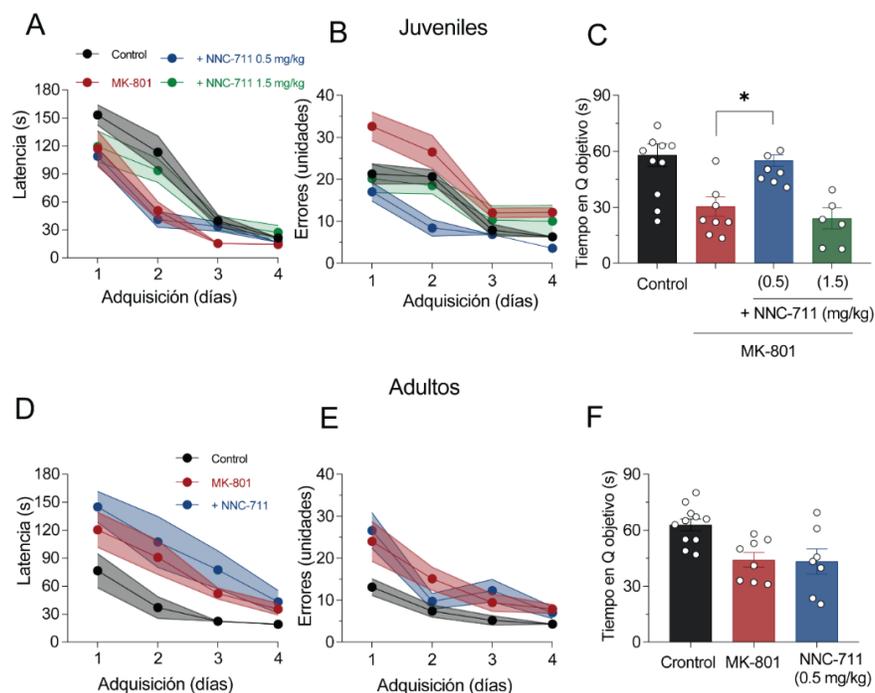


Figura 6. La inhibición de GAT1 mejora la memoria espacial deteriorada por el tratamiento postnatal con MK-801 en animales juveniles, pero no en animales adultos. A. Curso temporal de la latencia para encontrar el cajón de escape durante la fase de adquisición de la prueba de Barnes en animales jóvenes. Note que los animales MK-801 tratados con NNC-711 (0.5 mg/kg) presentaron valores similares de latencia al día 4

en comparación con el grupo MK-801. B. Curso temporal de los errores cometidos durante la fase de adquisición. De manera consistente, los animales MK-801 que recibieron el NNC-711 a la dosis de 0.5 mg/kg mostraron una tendencia a cometer menos errores que el grupo MK-801. C. Gráfica de barras que resume el tiempo de permanencia en el cuadrante objetivo (Q1) en la fase de retención de la prueba de Barnes. El grupo MK-801 que recibió NNC-711 a la dosis de 0.5 mg/kg permaneció más tiempo en el Q1 comparado con el grupo MK-801 que no recibió tratamiento. Control n = 10, MK-801 n = 8, MK-801 + NNC-711 0.5 mg/kg n = 7, MK-801 + NNC-711 1.5 mg/kg n = 6. D. Curso temporal de la latencia o número de errores (E) del grupo control y MK-801 durante la fase adquisición de la prueba de laberinto de Barnes en animales adultos. F. Gráfica de barras resumiendo el tiempo de permanencia en el Q1 durante la fase de retención del laberinto de Barnes en animales adultos. El tratamiento con NNC-711 (0.5 mg/kg i.p.) no mejoró la retención de memoria espacial en animales del grupo MK-801. * $P < 0.05$, prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba post-hoc de Dunn.

6.4. La inhibición de GAT1 no mejora el deterioro en la discriminación espacial en animales adultos tratados postnatalmente con MK-801 pero sí en animales juveniles

Los experimentos con la prueba separación de patrones de objetos sugieren que cuando uno de los objetos es desplazado a la posición 3 (Figura 7A), la demanda de la separación de patrones incrementa. Esta demanda a nivel conductual se refleja como discriminación espacial (Santoro, 2013). Por lo tanto, investigamos si la inhibición de GAT1 con la dosis de NNC-711 que mostró efectos positivos en la memoria espacial podría mejorar la discriminación espacial deteriorada en animales del grupo MK-801. En animales adultos, el tratamiento con NNC-711 (0.5 mg/kg) falló en mejorar el ID (n = 7; Figura 7C). En contraste, los animales jóvenes del grupo MK-801 que fueron tratados con NNC-711 (n = 6) recuperaron su habilidad para discriminar la nueva posición del objeto (prueba de Kruskal-Wallis $H_{(2)} = 11.14$, $P < 0.01$, prueba post hoc de Dunn, $P < 0.05$ vs. MK-801). En conjunto, estos datos indican que la inhibición de GAT1 es efectiva para restablecer la discriminación espacial únicamente en la etapa juvenil de animales que fueron expuestos postnatalmente al MK-801.

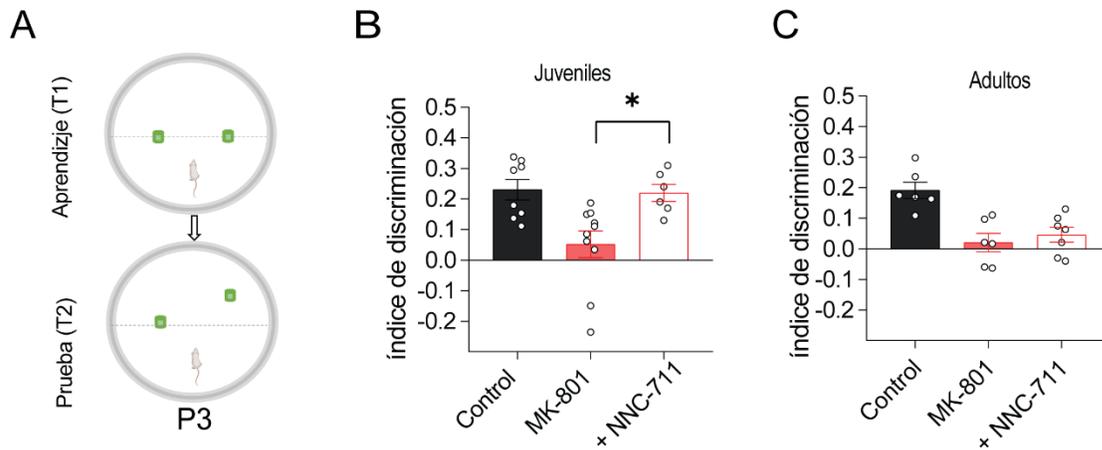


Figura 7. La inhibición de GAT1 mejora la discriminación espacial en animales juveniles tratados postnatalmente con MK-801. A. Configuración espacial seleccionada para evaluar la discriminación espacial en la prueba de separación de patrones de objetos. Valores de índices de discriminación en condición control, MK-801 y MK-801 plus NNC-711 (0.5 mg/kg) en animales jóvenes (panel B) y en animales adultos (panel C). * $P < 0.05$, prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba post-hoc de Dunn. Juveniles: control, $n = 8$, MK-801, $n = 10$ y MK-801 + NNC-711, $n = 6$. Adultos: control y MK-801, $n = 6$ y MK-801 + NNC-711, $n = 7$.

Una vez finalizadas las evaluaciones conductuales de este trabajo experimental, se procedió a realizar registros electrofisiológicos en los cerebros de los animales control y de animales tratados postnatalmente con MK-801. Nos enfocamos en el GD dada su función crítica en el procesamiento de la información multisensorial y su participación en la separación de patrones.

6.5. Identificación farmacológica de las respuestas sinápticas en el GD

En este estudio diferenciamos las respuestas sinápticas en el GD provenientes de la corteza entorrinal lateral y de la corteza entorrinal medial dado que estas sinapsis se especializan en el procesamiento de información sensorial y espacial (Hunsaker *et al.*, 2007). Aunque nuestros registros electrofisiológicos se obtuvieron sistemáticamente mediante la colocación de los electrodos de registro y de estimulación en el tercio medio o el tercio externo de la capa molecular del giro dentado (Figura 8A), corroboramos de manera farmacológica la naturaleza presináptica de las respuestas de la LPP y de la MPP de acuerdo con los patrones de expresión selectiva de los mGluRs acoplados a proteínas $G_{\alpha i}$ (Macek *et al.*, 1996). En particular, los axones que componen la LPP expresan de manera selectiva los mGluRs del

grupo III, pero no los mGluRs del grupo II. Por el contrario, los axones que componen la MPP expresan preferencialmente los mGluRs del grupo II, pero no los mGluRs del grupo III (Macek *et al.*, 1996; Shigemoto *et al.*, 1997). Observamos que los fEPSPs de la LPP, no se deprimen en presencia del agonista selectivo de los mGluRs del grupo II, DCG-IV (5 μ M), pero sí en presencia del agonista selectivo de los mGluRs del grupo III, L-AP4 (20 μ M). En contraste, los fEPSPs de la MPP, únicamente deprimen en presencia del DCG-IV y su magnitud no se vio modificada por el L-AP4 (Figura 8B). Este criterio farmacológico fue utilizado de manera rutinaria para corroborar el origen presináptico de nuestras respuestas electrofisiológicas.

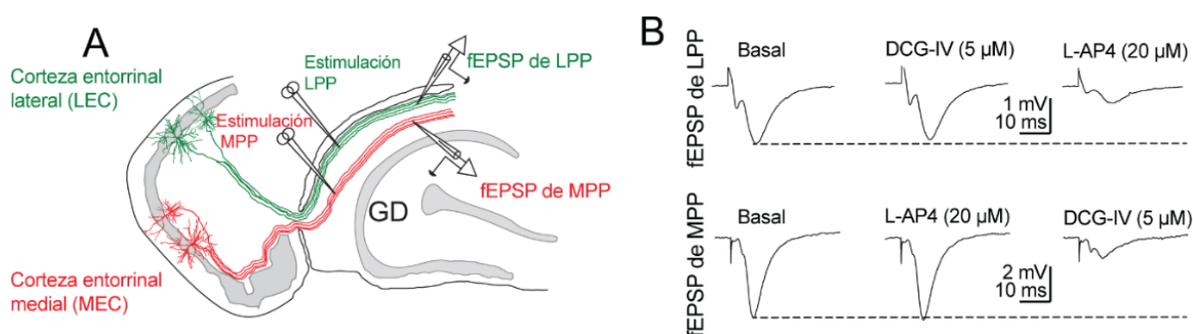


Figura 8. Identificación farmacológica de las respuestas sinápticas de la MPP y LPP. A. Esquema que muestra la posición de los electrodos de estimulación y de registro en el GD. B. fEPSP representativo de la LPP (paneles superiores) o de MPP (paneles inferiores) en condiciones basales y en presencia del agonista DCG-IV (5 μ M) o el agonista L-AP4 (20 μ M). Observe que la magnitud del fEPSP de LPP se deprime solo en presencia del L-AP4, un agonista de los mGluRs del grupo III, pero no en presencia del DCG-IV, un agonista de los mGluRs del grupo II. Por el contrario, la magnitud del fEPSP de la MPP deprime únicamente en presencia del DCG-IV, pero no del L-AP4.

6.6. El tratamiento postnatal con MK-801 reduce selectivamente la transmisión

sináptica basal en la MPP-DG, pero no en la sinapsis LPP-GD de animales jóvenes

Juveniles

Las alteraciones en el funcionamiento de múltiples circuitos neuronales como los de la red hipocampal se hipotetiza que ocurren desde la fase prodrómica de la esquizofrenia (Forsyth & Lewis, 2017). Planteamos una serie de experimentos para diferenciar las respuestas sinápticas de las principales entradas excitadoras de la corteza entorrinal al GD, las sinapsis MPP-GD y LPP-GD. Para este fin, realizamos curvas entrada-salida (I-O) y cuantificamos la

amplitud de los fEPSPs resultantes en función de la magnitud de la corriente. En rebanadas del grupo control, la aplicación de pulsos crecientes de corriente (0-800 μ A; incrementos de corriente de 100 μ A, a 0.067 Hz) resultó en un incremento progresivo en la amplitud de los fEPSPs, cuyas magnitudes fueron superiores en la sinapsis MPP-GD (n = 8 rebanadas / 6 animales) que en la sinapsis LPP-GD (n = 9 rebanadas / 6 animales) (Figura 9A). Esto sugiere que la transmisión sináptica basal es más robusta en la sinapsis MPP-GD.

En la sinapsis LPP-GD, la curva I-O del grupo MK-801 (n = 10 rebanadas / 6 animales) mostraron magnitudes similares de los fEPSPs en comparación con el grupo control (Figura 9B). Sin embargo, en la sinapsis MPP-GD, la curva I-O del grupo MK-801 (n = 8 rebanadas / 6 animales) mostró una reducción significativa en las amplitudes de los fEPSPs en comparación con el grupo control (ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento: $F_{(1, 16)} = 8.31$, $P < 0.01$ vs. control; Figura 9C). Estos resultados indican que el bloqueo postnatal de los receptores NMDA reducen selectivamente la transmisión sináptica basal en la sinapsis MPP-GD de animales juveniles.

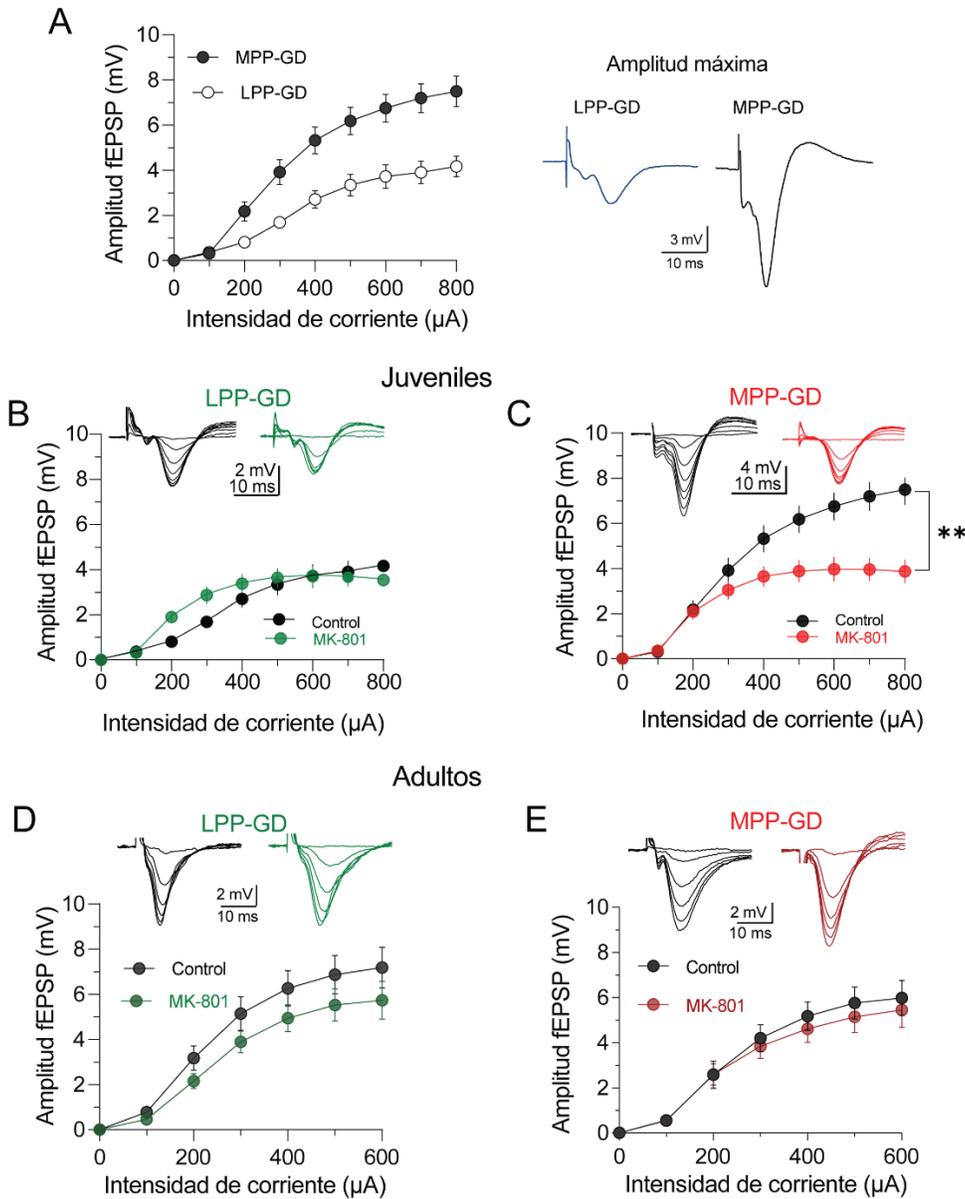


Figura 9. El tratamiento postnatal con MK-801 reduce selectivamente la transmisión sináptica basal en la sinapsis MPP-GD, pero no en la sinapsis LPP-GD de animales juveniles. A. Relación entrada-salida (I-O) en la sinapsis LPP-GD y MPP-GD (panel izquierdo) del grupo control de animales juveniles que muestra la magnitud de la amplitud del fEPSP en respuesta a pulsos crecientes de corriente (0-800 μA , incrementos de 100 μA) y los trazos representativos de la amplitud máxima del fEPSP en ambas sinapsis (panel derecho). B. Relación I-O de las amplitudes de los fEPSPs de la sinapsis LPP-GD o MPP-GD (C) en respuesta a pulsos crecientes de corriente (0-800 μA , incrementos de 100 μA) en los grupos control y el MK-801. Los trazos representativos para cada condición son mostrados en la parte superior de cada panel. * $P < 0.05$ o ** $P < 0.01$, ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento o sinapsis. Control, MPP-GD $n = 8$ rebanadas / 6 animales y LPP-GD $n = 9$ rebanadas / 6 animales. MK-801, MPP-GD $n = 10$ rebanadas / 6 animales y LPP-GD, $n = 10$ rebanadas / 6 animales. D. Relación I-O de las magnitudes de los fEPSPs de la sinapsis LPP-GD (trazos representativos en panel superior) en respuesta a pulsos crecientes de corriente (0-600 μA) en los grupos control y MK-801 de animales adultos. E. Relación I-O de las magnitudes de los fEPSPs de la sinapsis de la MPP-GD en respuesta a pulsos crecientes de corriente (0-600 μA , incrementos de 100 μA) en los grupos control y MK-801 de animales adultos. MPP-GD, control $n = 8$ rebanadas / 6 animales; MK-801 $n = 8$ rebanadas / 6 animales. LPP-GD: control, $n = 7$ rebanadas / 5 animales; MK, $n = 6$ rebanadas / 4 animales.

Adultos

Después determinamos si los cambios observados en animales jóvenes en la transmisión sináptica eran transitorios o persistentes. Por lo tanto, nuevamente construimos curvas I-O (0-600 μ A) con inhibición GABAérgica intacta. En la sinapsis LPP-GD de animales adultos, observamos que las respuestas sinápticas obtenidas de la curva I-O del grupo MK-801 (6 rebanadas / 4 animales) no fueron diferentes del grupo control (n = 7 rebanadas / 5 animales) (Figura 9D), sugiriendo que la transmisión sináptica basal no se modifica por el tratamiento postnatal con MK-801. Un escenario distinto fue observado en la sinapsis MPP-GD. Contrario a lo observado en rebanadas de animales juveniles, la aplicación de pulsos crecientes de corriente (0-600 μ A) en la MPP de rebanadas del grupo MK-801 (n = 8 rebanadas / 5 animales) generó fEPSPs cuyas amplitudes fueron similares en magnitud a las respuestas obtenidas en el grupo control (n = 8 rebanadas / 6 animales; Figura 9E). En principio, este resultado sugería que, bajo estas condiciones, la transmisión sináptica basal en la MPP-GD de animales MK-801 no se encontraba modificada.

Sin embargo, la transmisión sináptica basal se compone principalmente de un componente excitador mediado por la actividad glutamatérgica y un componente inhibitor mediado por la actividad GABAérgica. En particular, las células granulares del GD de adultos reciben una poderosa inhibición GABAérgica de interneuronas locales, tanto a nivel dendrítico como a nivel somático (Sloviter, 1991; Elgueta & Bartos, 2019); la cual se encuentra reducida en pacientes con esquizofrenia (Frankle *et al.*, 2015). Por lo tanto, en un subconjunto de experimentos, realizamos curvas I-O en ausencia y en presencia de picrotoxina (50 μ M), un bloqueador selectivo de los receptores GABA_A, para explorar posibles cambios en la inhibición GABAérgica en el grupo control (Figura 10A) y el grupo MK-801 (Figura 10B). Trazos representativos de los fEPSP en presencia y ausencia de picrotoxina para el grupo control y MK-801 se muestran en la Figura 10C, así como el componente GABAérgico representado como fIPSPs teóricos. En presencia de picrotoxina, encontramos que las amplitudes máximas de los fEPSPs en la sinapsis MPP-GD del grupo control (n = 5 rebanadas/ 5 animales) incrementaron cerca de un 20% en magnitud (Figura 10D), mientras que el grupo MK-801 (n = 5 rebanadas / 5 animales) no presentó cambios en las amplitudes

máximas de los fEPSPs (Δ amplitud máxima fEPSP control vs. MK-801 = 18.37 ± 6.14 vs. $1.87 \pm 2.28\%$, $P < 0.05$, prueba de Mann-Whitney).

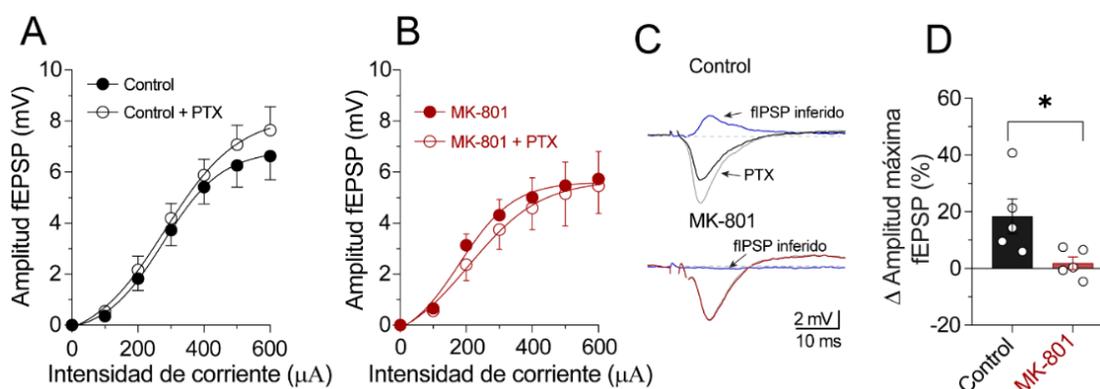


Figura 10. El tratamiento postnatal con MK-801 reduce la transmisión GABAérgica en la sinapsis MPP-GD de animales adultos. A. Relación I-O de fEPSPs de la sinapsis MPP-GD en respuesta a la estimulación creciente de corriente (0-600 μ A) en presencia o ausencia de picrotoxina (antagonista de los receptores GABA_A; 50 μ M) en el grupo control o en (B) el grupo MK-801. C. Panel superior, trazos representativos de fEPSPs obtenidos con una corriente de 600 μ A en ausencia (color negro) o presencia de picrotoxina (50 μ M, color gris) del grupo control. Panel inferior, trazos representativos de fEPSPs obtenidos con una corriente de 600 μ A en ausencia (color rojo) o presencia de picrotoxina (50 μ M, color gris) del grupo MK-801. El componente inhibitorio (representado como fEPSP teórico, trazo en color azul) de la transmisión sináptica basal fue inferido a partir de la sustracción aritmética de la amplitud del fEPSP obtenido sin picrotoxina y con picrotoxina tanto para el grupo control como el grupo MK-801. D. Cambios en la amplitud máxima del fEPSP después de la aplicación de picrotoxina en el grupo control y el grupo MK-801. Observe que al bloquear la transmisión GABAérgica con picrotoxina, el grupo control mostró un incremento en la amplitud del fEPSP, pero en el grupo MK-801 no se observó ningún incremento en la magnitud del fEPSP. $n = 5$ rebanadas / 5 animales para cada grupo. * $P < 0.05$, prueba de Mann-Whitney.

En conjunto, estos resultados indican que el bloqueo del receptor NMDA durante el desarrollo temprano reduce la transmisión GABAérgica a nivel dendrítico en el GD adulto. Esta reducción en el componente inhibitorio probablemente enmascara la ausencia de diferencias en la transmisión sináptica basal en el GD de animales adultos que fueron expuestos postnatalmente con MK-801.

6.7. El tratamiento postnatal con MK-801 reduce la liberación presináptica en ambas divisiones de la vía perforante al giro dentado

Juveniles

A continuación evaluamos la proporción del pulso-pareado (PPR) como un método para inferir el proceso de liberación de neurotransmisores a nivel presináptico (Fioravante &

Regehr, 2011; Petersen *et al.*, 2013). El PPR se obtuvo variando el intervalo entre-estímulos (ISI) desde 40 hasta 500 ms y se calculó como el cociente de la amplitud del segundo fEPSP entre la amplitud del primer fEPSP resultante. Un valor de PPR > 1 indica facilitación en la liberación de neurotransmisor y un valor < 1 indica depresión de la respuesta sináptica.

En condiciones control, observamos una mayor facilitación del pulso-pareado (PPF) en la sinapsis LPP-GD (PPR en LPP-GD = 1.72 ± 0.03 ; n = 28 rebanadas / 15 animales) en comparación con la MPP-GD (PPR en la MPP-GD = 1.22 ± 0.03 ; n = 29 rebanadas / 15 animales; t de Student: $t_{(55)} = 12.01$, $P < 0.001$; Figura 11A). Los registros del PPR fueron específicos de LPP o la MPP debido a que fueron enormemente atenuados en presencia del L-AP4 a 20 μ M (agonista de los mGluRs del grupo III) o del DCG-IV a 5 μ M (agonista de los mGluRs del grupo II), respectivamente (Figura 11B).

En la sinapsis LPP-GD, las rebanadas del grupo MK-801 (n = 9 rebanadas / 7 animales) presentaron una facilitación incrementada en los ISIs evaluados en comparación con el grupo control (ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento: $F_{(1, 16)} = 5.19$, $P < 0.05$; n = 9 rebanadas / 7 animales; Figura 11C-D). Un hallazgo similar fue obtenido en la sinapsis MPP-GD, donde nuevamente observamos que grupo MK-801 (n = 9 rebanadas / 7 animales) incrementó la PPF en comparación con el grupo control (ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento: $F_{(1, 15)} = 4.63$, $P < 0.05$; control, n = 8 rebanadas / 6 animales, Figura 11E-F). Estos datos indican que el bloqueo postnatal del receptor NMDA reduce la liberación presináptica tanto en la LPP como en la MPP.

Adultos

Con respecto al PPR de la LPP en animales adultos, observamos que los valores de PPF obtenidos en todos los ISIs evaluados fueron similares entre el grupo control (n = 10 rebanadas / 7 animales) y MK-801 (n = 7 rebanadas / 6 animales; Figura 12A-B). Este resultado fue sorprendente debido a que en animales juveniles del grupo MK-801 encontramos una PPF aumentada. Examinamos la posibilidad de una variación del PPR en función de la edad. Por lo tanto, comparamos la PPF en animales jóvenes y adultos del grupo control. Encontramos que la PPF aumenta en la etapa adulta (datos no presentados) en comparación con la etapa juvenil. En conjunto, estos datos sugieren que el tratamiento

postnatal con MK-801 interfiere con la regulación dependiente de la edad de la PPF en la sinapsis LPP-GD.

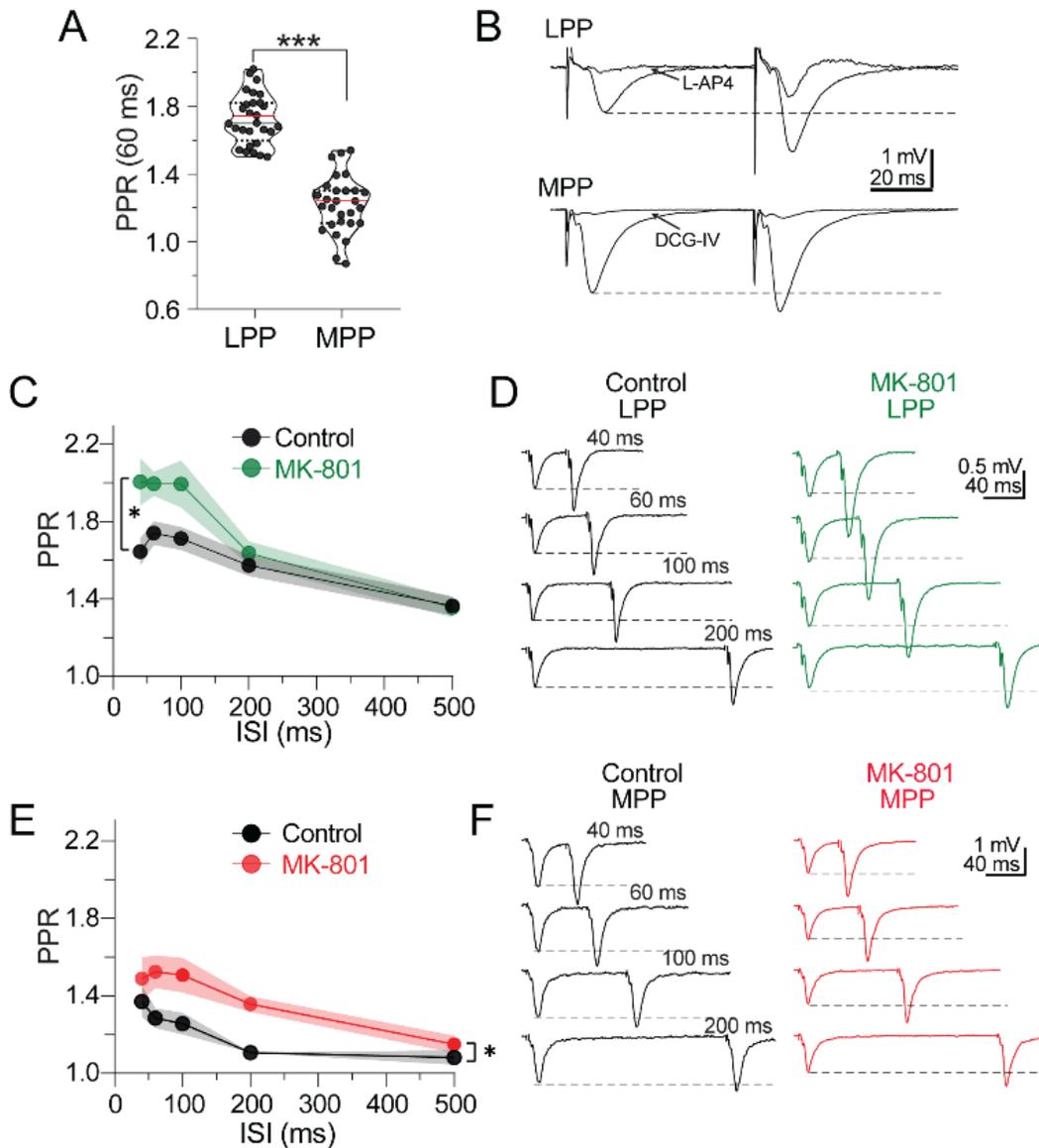


Figura 11. El tratamiento postnatal con MK-801 reduce la liberación presináptica tanto en la LPP como en la MPP de animales juveniles. **A.** Gráfica de violín comparando la relación pulso-pareado (PPR a 60 ms) en el grupo control. Aunque ambas terminales axónicas presentaron facilitación en el PPR (valor promedio > 1), la LPP mostró mayor facilitación que la MPP. **B.** Trazos representativos de la estimulación pulso-pareado en la LPP y la MPP, mostrando reducción del fEPSP en respuesta al L-AP4 (agonista de los mGluRs del grupo III; 20 μ M) o el DCG-IV (agonista de los mGluRs del grupo II, 5 μ M). **C.** Curso temporal del PPR en respuesta a la variación del intervalo entre estímulos (ISI; 40, 60, 100, 200 y 500 ms) en la LPP o la MPP (**E**) en los grupos control y MK-801. Los incrementos en los valores de PPR en el grupo MK-801 sugieren una reducción de la liberación presináptica. **D.** Trazos representativos del PPR a diferentes ISIs en la LPP o la MPP (**F**) de los grupos control y MK-801. * $P < 0.05$, ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento; *** $P < 0.001$, t de Student. MPP-GD: $n = 9$ rebanadas / 7 animales para el grupo control y $n = 8$ rebanadas / 6 animales para el grupo MK-801. LPP-GD: control, $n = 9$ rebanadas / 7 animales para cada grupo.

Con respecto a la sinapsis MPP-GD, observamos que la PPF del grupo MK-801 ($n = 7$ rebanadas / 6 animales) se mantuvo aumentada con respecto al grupo control (ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento: $F_{(1, 12)} = 5.193$, $P < 0.05$; control, $n = 7$ rebanadas / 6 animales; Figura 12C-D). Estos resultados indican que la reducción en la liberación presináptica en la LPP y la MPP por el tratamiento postnatal con MK-801 se mantiene hasta la etapa adulta.

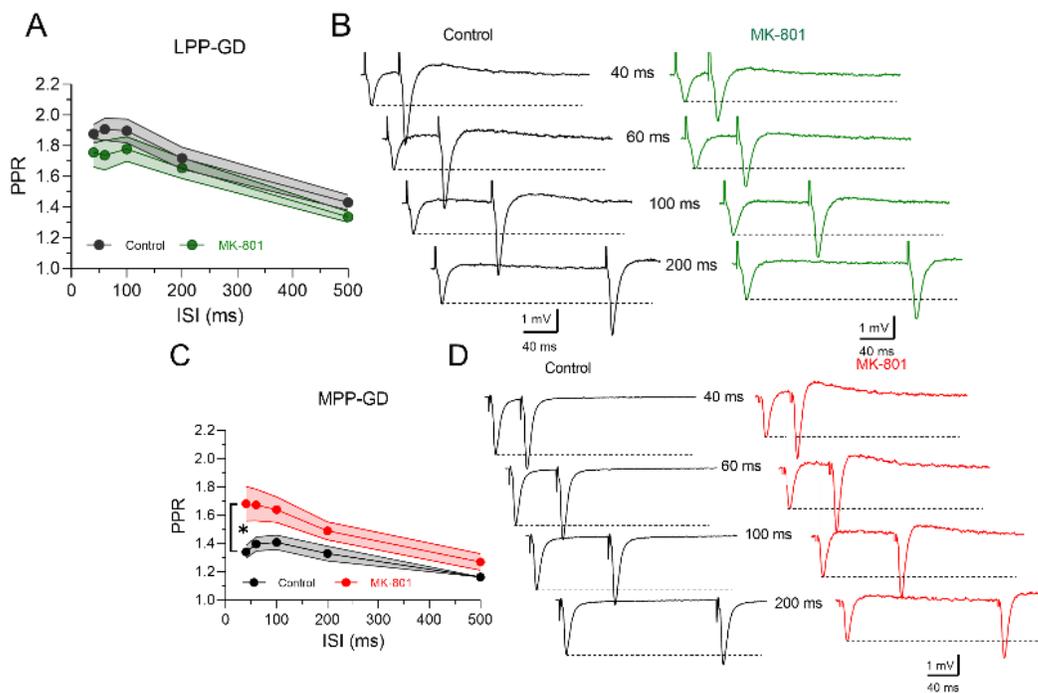


Figura 12. El tratamiento postnatal con MK-801 reduce la liberación presináptica en la MPP de animales adultos. A. Curso temporal del PPR a distintos intervalos entre estímulos (ISI: 40, 60, 100, 200 y 500 ms) en la LPP o la MPP (C) de los grupos control y MK-801. El grupo MK-801 presentó un incremento el PPR, indicando una reducción en la liberación presináptica. B. Trazos representativos del PPR de la LPP o la MPP (D) a diferentes ISIs en los grupos control y MK-801. * $P < 0.05$, ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, efecto tratamiento. LPP-GD, $n = 10$ rebanadas / 7 animales para el grupo control y $n = 7$ rebanadas / 6 animales; MPP-GD, $n = 7$ rebanadas / 6 animales para cada grupo.

6.8. La estimulación de baja frecuencia (LFS) a 3 Hz induce depresión sináptica en la sinapsis MPP-GD, pero no en la sinapsis LPP-GD de animales jóvenes

Dado que la LTD ha sido escasamente investigada en la sinapsis de la vía perforante con el GD, primero determinamos un protocolo de estimulación confiable para inducir LTD. En una exploración preliminar en rebanadas del grupo control, investigamos si la LFS compuesta por 900 pulsos aplicados a 1 o 3 Hz podrían inducir depresión sináptica en las dos divisiones anatómicas de la vía perforante. De manera sorprendente, la LFS a 1 o 3 Hz en la sinapsis LPP-GD no indujeron depresión de la pendiente del fEPSP (LFS a 1 Hz, n = 4 rebanadas/ 4 animales; LFS a 3 Hz, n = 3 rebanadas / 3 animales; Figura 13A-C). En contraste, la LFS a 1 Hz (n = 5 rebanadas / 4 animales) indujo una depresión débil, pero a 3 Hz (n = 4 rebanadas / 4 animales) fue suficiente para inducir una depresión sináptica estable que fue suprimida en presencia del DCG-IV (5 μ M) (Figura 13E-F). Por lo tanto, el fallo en la inducción de depresión sináptica con protocolos clásicos de LFS en la sinapsis LPP-GD es un hallazgo crucial para el marco empírico de la plasticidad sináptica. Este fenómeno requiere de un análisis detallado que va más allá del alcance de este trabajo. Por esta razón, nos enfocamos en estudiar mecanísticamente la LTD en la sinapsis MPP-GD.

6.9. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora la LTD dependiente del receptor CB1 en la sinapsis MPP-GD de animales jóvenes

Juveniles

Nuevamente, evaluamos la eficacia de la LFS a 3 Hz para inducir una LTD sostenida por al menos 90 minutos de registro. En el grupo control (n = 6 rebanadas / 6 animales), la aplicación del protocolo LFS a 3 Hz después de 20 minutos de una respuesta basal generó una LTD persistente (fEPSP a los 90 min post-LFS: $69 \pm 6.25\%$ de la respuesta basal; prueba de Wilcoxon, $P < 0.05$ vs. respuesta basal; Figura 14A-B, símbolos en color negro), cuyo sitio de expresión fue presináptico de acuerdo con el incremento del PPR (PPF antes de la LFS: 1.18 ± 0.08 ; PPF a los 90 min post-LFS: 1.54 ± 0.17 ; prueba de Wilcoxon, $P < 0.05$; Figura 14E, barras en color negro).

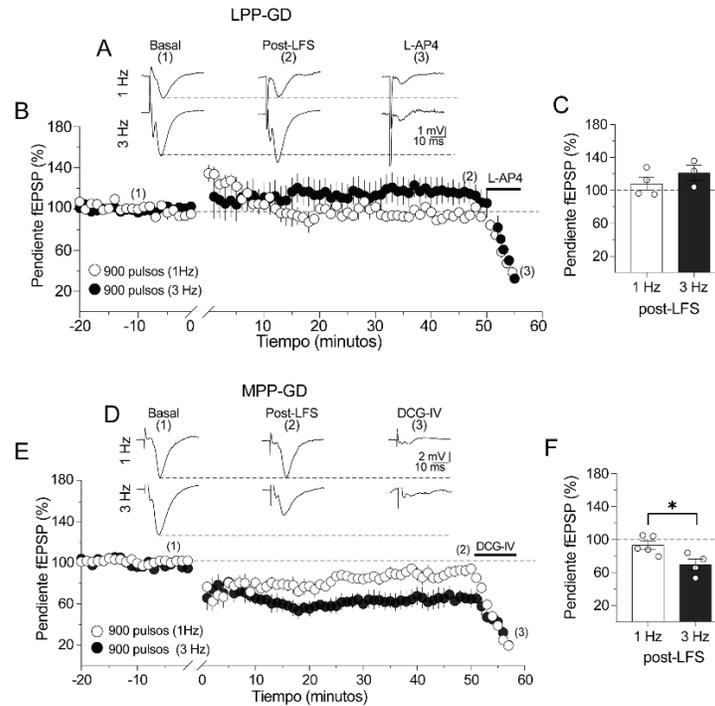


Figura 13. La estimulación de baja frecuencia (LFS) a 3 Hz induce LTD en la sinapsis de la MPP-GD, pero no en la sinapsis de la LPP-GD de animales jóvenes del grupo control. A. Trazos representativos de fEPSPs en la sinapsis LPP-GD en la condición basal (1), 50 minutos después de la LFS (2) y después de la perfusión de L-AP4 (20 μ M). B. Curso temporal de la pendiente del fEPSP de la sinapsis LPP-GD en respuesta a LFS a 1 o 3 Hz. C. Gráfica de barras que cuantifica la magnitud de la pendiente del fEPSP después de la LFS a 1 o 3 Hz, indicando ausencia de LTD. D. Trazos representativos de fEPSPs en la sinapsis MPP-GD en la condición basal (1), 50 minutos después de la LFS (2) y después de la perfusión de DCG-IV (5 μ M). E. Curso temporal de la pendiente del fEPSP de la sinapsis MPP-GD en respuesta a LFS a 1 o 3 Hz. F. Gráfica de barras que cuantifica la magnitud de la pendiente del fEPSP de la sinapsis MPP-GD después de la LFS a 1 o 3 Hz, indicando que la LFS a 3 Hz induce una LTD persistente. * $P < 0.05$, prueba de Mann-Whitney. Para la sinapsis LPP-GD: $n = 4$ rebanadas / 4 animales para 1 Hz y $n = 3$ rebanadas / 3 animales para 3 Hz. Para la sinapsis MPP-GD: $n = 5$ rebanadas / 4 animales para 1 Hz y $n = 4$ rebanadas / 4 animales para 3 Hz.

Así mismo, consistente con Peñasco et al. (2019) con relación a la LTD inducida a 10 Hz, la perfusión del agonista inverso/antagonista de los receptores CB1 AM-251 a 5 μ M durante la LFS a 3 Hz previno la inducción de la LTD (fEPSP a los 90 min post-LFS: $119.7 \pm 10.94\%$ de la respuesta basal; $n = 4$ rebanadas / 4 animales; Figura 14A-B y E, símbolos y barras en color blanco). La perfusión subsiguiente de DCG-IV (5 μ M) al final del registro corroboró el origen en la MPP de las respuestas sinápticas (fEPSP en presencia del DCG-IV: $15.7 \pm 5.22\%$ de la respuesta basal; Figura 14E, barra en color blanco). Además, la perfusión del AM 251 previno los cambios en la PPF (PPF en grupo AM 251 antes LFS: 1.22 ± 0.1 ; PPF a los 90 min post-LFS: 1.2 ± 0.08 ; Figura 14F, barras en color blanco). En resumen, estos

datos demuestran que la sinapsis MPP-GD expresa una LTD presináptica por activación del receptor CB1.

En contraste, en rebanadas del grupo MK-801 ($n = 6$ rebanadas / 6 animales), la LFS a 3 Hz falló en deprimir la pendiente del fEPSP y desencadenó una LTP anormal (fEPSP a los 90 min post-LFS en el grupo MK-801: $139.7 \pm 23.12\%$ de la respuesta basal; prueba de Kruskal-Wallis, prueba post-hoc de Dunn, $P < 0.05$ vs. Control; Figura 14C-D). Las respuestas sinápticas fueron sensibles a la perfusión del DCG-IV, corroborando su naturaleza presináptica en la MPP (fEPSP en presencia del DCG-IV: $42.13 \pm 8.5\%$ de la respuesta basal, prueba de Kruskal-Wallis, prueba post-hoc de Dunn, $P < 0.05$ vs. Control; Figura 14E, barra en color rojo). De manera interesante, la potenciación sináptica anormal no modificó el PPR (PPR antes de la LFS: 1.43 ± 0.07 ; PPR a los 90 min post-LFS: 1.5 ± 0.09 ; Figura 14F, barras en color rojo), sugiriendo que la LTP se expresa a nivel postsináptico. Estos resultados indican que el bloqueo postnatal del receptor NMDA deteriora la LTD en la sinapsis MPP-GD de animales juveniles.

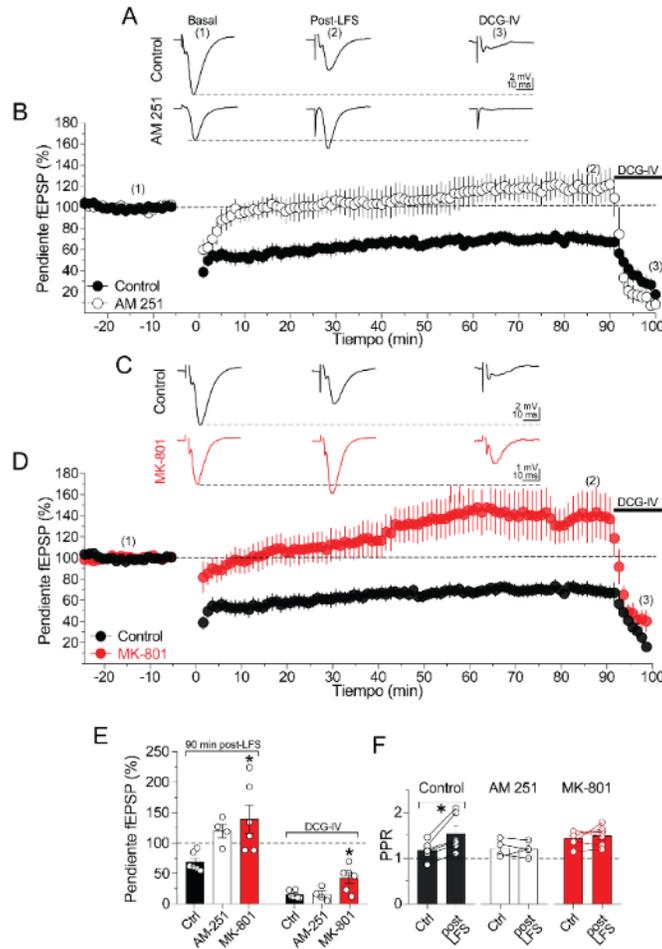


Figura 14. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora la inducción de la LTD dependiente del receptor CB1 en la sinapsis MPP-GD de animales jóvenes. A. Trazos representativos de fEPSPs en la sinapsis MPP-GD en la condición basal (1), 90 minutos después de la LFS a 3 Hz (2) y después de la perfusión de DCG-4 (5 μ M) en los grupos control y control tratado con AM251 durante la LFS (antagonista de los receptores CB1, 5 μ M). B. Curso temporal de la pendiente del fEPSP en respuesta a LFS a 3 Hz o LFS a 3 Hz + AM251 (5 μ M) en el grupo control. La perfusión de AM251 durante la LFS previno la inducción de la LTD. C. Trazos representativos de fEPSPs de la sinapsis MPP-GD en la condición basal (1), 90 minutos después de la LFS a 3 Hz (2) y después de la perfusión de DCG-4 (5 μ M) en los grupos control y MK-801. La LFS indujo una LTP anormal en el grupo MK-801. E. Gráfica de barras que resume la magnitud de respuesta sináptica 90 minutos después de la LFS (panel izquierdo) o en presencia de DCG-IV (panel derecho) en los grupos control, AM251 y MK-801. F. Gráfica de puntos que compara el PPR antes y después de la LFS en los grupos control, AM251 y MK-801. * $P < 0.05$. Únicamente el grupo control mostró un incremento en PPR después de la LFS, indicando que la LTD se expresa de manera presináptica por una reducción de la liberación de neurotransmisores. Control, $n = 6$ rebanadas / 6 animales; AM251, $n = 4$ rebanadas / 4 animales; MK-801, $n = 6$ rebanadas / 6 animales.

Adultos

De igual manera que los animales jóvenes, la LFS a 3 Hz induce LTD en la sinapsis MPP-GD (fEPSP a los 90 min post-LFS: $76.73 \pm 3.76\%$ respuesta basal, Prueba de Wilcoxon, $P < 0.05$; $n = 5$ rebanadas / 5 animales), cuyas respuestas fueron fuertemente atenuadas en

presencia de DCG-IV (5 μ M) (fEPSP en presencia DCG-IV: $20.55 \pm 3.48\%$ respuesta basal; Figura 15A-C, símbolos negros), demostrando que la LTD en la MPP es un mecanismo de plasticidad activo en el GD adulto. Así mismo, en rebanadas del grupo MK-801 (n = 5 rebanadas / 5 animales), la LFS falló en inducir depresión sináptica (fEPSP a los 90 min post-LFS: $113.6 \pm 14.94\%$ respuesta basal; Figura 15A-C, símbolos rojos). Estos resultados confirman que las alteraciones sinápticas en el GD inducidas por el bloqueo postnatal del receptor NMDA se mantienen hasta la etapa adulta. En este caso, el fallo en la inducción de la expresión de la LTD dependiente del receptor CB1.

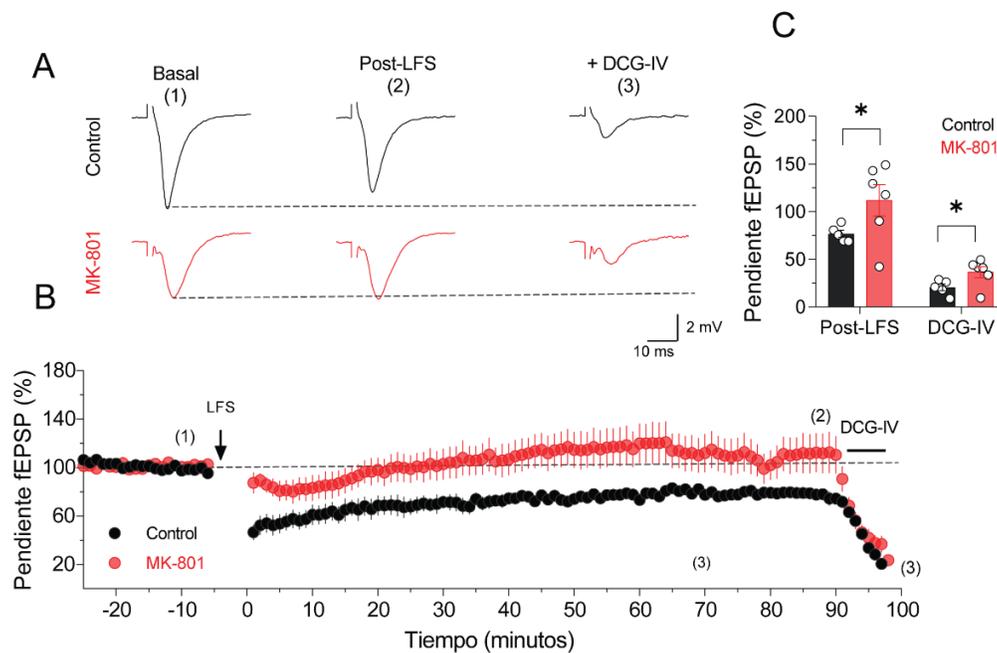


Figura 15. El deterioro en la LTD inducida por el tratamiento postnatal con MK-801 se mantiene hasta la etapa adulta. A. Trazos representativos de fEPSPs en la sinapsis MPP-GD en la condición basal (1), 90 minutos después de la LFS a 3 Hz (2) y después de la perfusión de DCG-4 (5 μ M) en los grupos control y MK-801. B. Curso temporal de la pendiente del fEPSP de la sinapsis MPP-GD en respuesta a la LFS a 3 Hz en los grupos control y MK-801. Nuevamente, la LFS no indujo LTD en el grupo MK-801. C. Gráfica de barras que cuantifica la magnitud de la respuesta después de la LFS en los grupos control y MK-801. n = 5 rebanadas / 5 animales para el grupo control y n = 6 rebanadas / 5 animales para el grupo MK-801. * $P < 0.05$, prueba de Mann-Whitney.

6.10. *El tratamiento postnatal con MK-801 reduce la expresión funcional de los receptores CB1 en la sinapsis MPP-GD de animales juveniles*

Dado el requerimiento del sistema endocannabinoide en la inducción de la LTD en la sinapsis MPP-GD, exploramos si los receptores CB1 o la síntesis de su ligando endógeno el 2-AG podrían contribuir a la LTD deteriorada en animales juveniles del grupo MK-801. Para estos experimentos, perfundimos durante 15 minutos al agonista de los receptores CB1, WIN 55,212-2 (Peñasco *et al.*, 2020) o fisostigmina (10 μ M), un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa que induce la síntesis de 2-AG en rebanadas frescas de hipocampo (Wang, Jia, *et al.*, 2018). En comparación con el grupo control (n = 6 rebanadas / 5 animales), encontramos que la perfusión de WIN 55-212,2 en rebanadas del grupo MK-801 (n = 6 rebanadas / 5 animales) indujo una LTD de menor magnitud (fEPSP a los 90 min post-WIN en control vs. MK-801: $43.01 \pm 6.53\%$ vs. $74.11 \pm 12.16\%$ de la respuesta basal; t de Student: $t_{(10)} = 2.25$, $P < 0.05$; Figura 16A-B, E), indicando una expresión funcional (véase definición en página 10) reducida de los receptores CB1 presinápticos.

En contraste, la perfusión de fisostigmina indujo una depresión sináptica en rebanadas del grupo control (n = 6 rebanadas / 6 animales), esta depresión se debe al aumento en la síntesis de 2-AG a través de la vía de señalización receptores acetilcolina-M1/M5-PKC-diacilglicerol lipasa (Wang, Jia, *et al.*, 2018). Sin embargo, las rebanadas del grupo MK-801 (n = 5 rebanadas / 5 animales) mostraron una tendencia a presentar una LTD de menor magnitud en comparación con el grupo control (fEPSP a los 90 min post-fisostigmina en control vs. MK-801: fEPSP a los 90 min post-WIN en control vs. MK-801 vs. $77.65 \pm 9.65\%$ de la respuesta basal; Student's t-test: $t_{(9)} = 2.15$; $P > 0.05$; Figura 16C-D, F). Dado que la activación de los receptores CB1 o la estimulación de la síntesis de 2-AG con fisostigmina indujeron valores similares de LTD en las rebanadas del grupo MK-801 (Figura 16G), nuestros resultados sugieren que el tratamiento postnatal con MK-801 no interfiere con la síntesis de 2-AG en las células granulares. Así mismo, la LTD disminuida en respuesta a la fisostigmina en rebanadas de animales del grupo MK-801 puede ser atribuida a desregulación funcional de los receptores CB1.

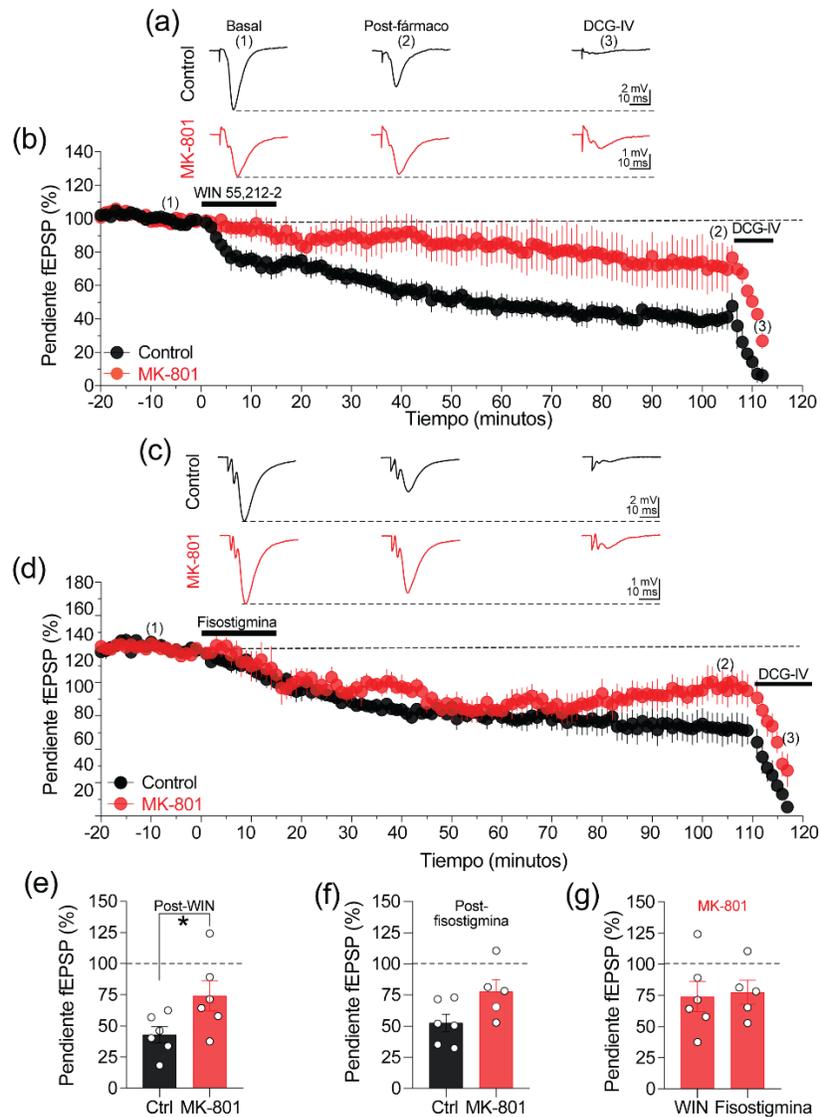


Figura 16. El tratamiento con MK-801 reduce la expresión funcional de los receptores CB1, pero no la síntesis de 2-AG en la sinapsis MPP-GD de animales juveniles. A. Trazos representativos de fEPSPs en la sinapsis MPP-GD en la condición basal (1), 90 minutos después de perfusión de WIN 55,212-2 (agonista de los receptores CB1, 5 μ M) (2) y después de la perfusión de DCG-4 (5 μ M) en los grupos control y MK-801. B. Curso temporal de la pendiente del fEPSP de la sinapsis MPP-GD en respuesta a la perfusión de WIN 55, 212-2 (5 μ M, 15 minutos) en los grupos control y MK-801. C. Similar al panel A, pero trazos representativos en respuesta a la perfusión de fisostigmina (inhibidor de la acetilcolinesterasa, 10 μ M). D. Curso temporal de la pendiente del fEPSP de la sinapsis MPP-GD en respuesta a la perfusión de fisostigmina (10 μ M, 15 minutos) en los grupos control y MK-801. E. La perfusión de WIN 55, 212-2 indujo una menor depresión sináptica en comparación con el grupo control. F. La perfusión de fisostigmina en el grupo MK-801 resultó en una reducción aparente (pero no significativa) en la depresión sináptica en comparación con el grupo control. G. Dado que la activación de los receptores CB1 con WIN 55, 212-2 o la estimulación de la síntesis de 2-AG con fisostigmina indujeron valores similares de depresión sináptica, el tratamiento postnatal con MK-801 no modifica la síntesis de 2-AG. WIN 55-212,2, n=6 rebanadas/6 animales para cada grupo. Fisostigmina, n=6 rebanadas para el grupo control y n=5 rebanadas/5 animales para el grupo MK-801. * $P < 0.05$, prueba t de Student.

6.11. *La inhibición de MAGL restaura la LTD en la sinapsis MPP-GD de animales postnatalmente tratados con MK-801*

Datos previos muestran una actividad incrementada de la enzima MAGL en individuos con esquizofrenia (Kaya *et al.*, 2019). Por lo tanto, exploramos si un incremento en la señalización de 2-AG por la inhibición enzimática de MAGL puede restablecer la inducción de LTD en rebanadas del grupo MK-801. Para estos experimentos, las rebanadas MK-801 fueron perfundidas con el inhibidor irreversible de la enzima MAGL, JZL 184 (1 μ M), el cual fue perfundido por los últimos 10 minutos de la respuesta basal y 5 minutos durante la LFS. Previo a la LFS, la perfusión del JZL 184 no modificó la respuesta basal. De manera sorprendente, el JZL 184 restauró la pérdida de LTD en la sinapsis MPP-GD de las rebanadas del grupo MK-801 (fEPSP a los 90 min post-LFS en MK-801 + JZL 184: 58.46 ± 11.68 % de la respuesta basal, $n = 5$ rebanadas / 5 animales; t de Student: $t_{(9)} = 2.94$, $P < 0.01$ vs. MK-801; Figura 17A-C). La perfusión del DCG-IV al final de los registros corroboró el origen presináptico en la MPP de las respuestas sinápticas (fEPSP en presencia del DCG-IV: 27 ± 7.43 % de la respuesta basal). Así mismo, la inducción de la LTD fue acompañada de un incremento en la PPF (PPR en la respuesta basal: 1.38 ± 1.11 ; PPR a los 90 min post-LFS: 1.77 ± 0.09 ; t de Student pareada: $t_{(4)} = 2.97$, $P < 0.05$; Figura 18D), cuya facilitación fue similar en magnitud en comparación con el grupo control (ver barras negras en la Figura 15F). La Figura 18E muestra la gráfica de probabilidad acumulada que muestra la magnitud de la respuesta sináptica después de la LTD en los grupos MK-801 y MK-801 + JZL 184. En conjunto, estos datos demuestran que la inhibición de MAGL restaura la LTD en la sinapsis MPP-GD de animales MK-801.

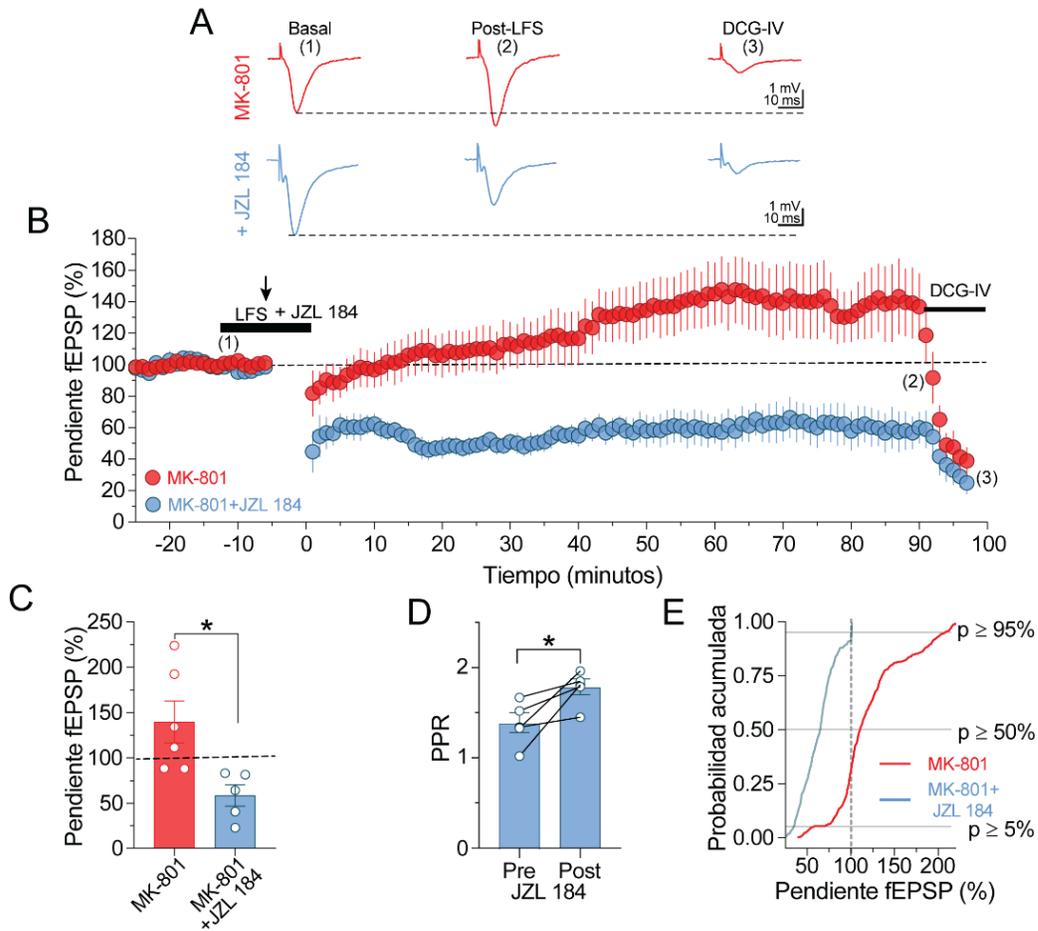


Figura 17. La inhibición de MAGL restaura la LTD dependiente del receptor CB1 en la sinapsis MPP-GD de animales juveniles. A. Trazos representativos de fEPSPs en la sinapsis MPP-GD en la condición basal (1), 90 minutos después de la LTD (2) y después de la perfusión de DCG-IV (5 μ M) en los grupos MK-801 y MK-801 + JZL 184 (inhibidor irreversible de MAGL, 1 μ M). B. Curso temporal de la pendiente del fEPSP de la sinapsis MPP-GD en respuesta a la perfusión de JZL 184 (1 μ M, 10 minutos) durante la LFS en el grupo MK-801. Gráfica de barras que resume la magnitud de la pendiente de los tratamientos. D. Cambios del PPR antes y después de la LTD en los grupos MK-801 y MK-801 + JZL 184. E. Gráfica de probabilidad acumulada de la respuesta sináptica después de la LFS. Los valores de la pendiente del fEPSP corresponden a los minutos 11 y 90 minutos. * $P < 0.05$, t de Student.

6.12. *La estimulación en ráfaga teta (TBS) induce LTP en las dos divisiones anatómicas de la vía perforante que convergen en el giro dentado*

En el GD, patrones de estimulación fisiológica y conductualmente relevantes como la estimulación TBS inducen potenciación sináptica (Lopez-Rojas *et al.*, 2016). Estos patrones de estimulación mimetizan la actividad neuronal cuando un animal se encuentra comprometido en tareas cognitivas. En una exploración preliminar, validamos la eficacia del protocolo TBS compuestos por 1 tren (x1), 2 trenes (x2) o 3 trenes (x3) tanto en la sinapsis

MPP-GD como LPP-GD en rebanadas de animales juveniles. Un tren consistió en 10 ráfagas a 5 Hz y cada ráfaga se compuso de 5 pulsos de corriente a 100 Hz (basado en Larson and Munkácsy, 2015); el intervalo entre trenes fue de 10 s. Una respuesta basal fue registrada por 20 minutos, seguido de la estimulación TBS y la respuesta fue registrada por 60 minutos. Al final del registro, las respuestas sinápticas fueron corroboradas con DCG-IV (5 μ M) o L-AP4 (20 μ M). Encontramos que únicamente la estimulación TBS x 3 indujo potenciación sináptica tanto en la sinapsis LPP-GD (Figura 18A-C) como la sinapsis MPP-GD (Figura 18D-F). Por lo tanto, en los siguientes experimentos utilizamos el protocolo TBS x 3 para evaluar la LTP en animales del grupo MK-801.

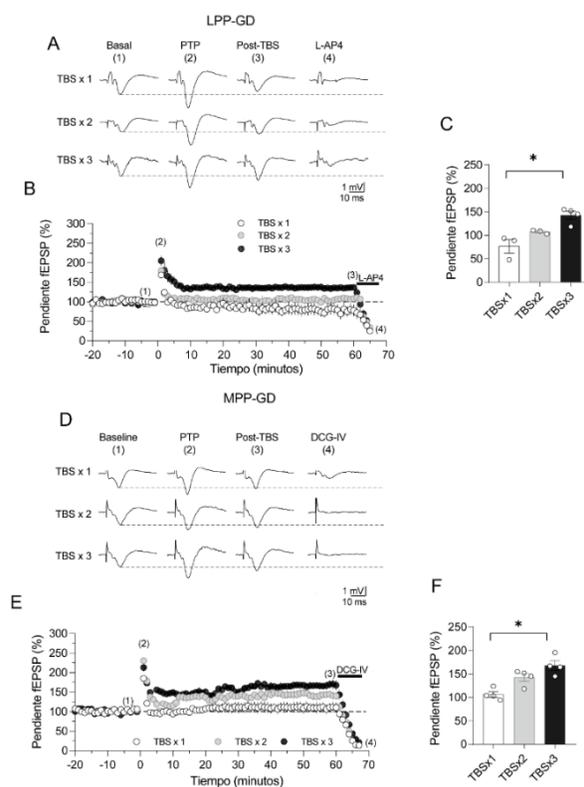


Figura 18. La estimulación en ráfaga teta induce LTP en las sinapsis LPP-GD y en la MPP-GD. A. fEPSPs representativas durante la basal (1), PTP (2), post-TBS (3), y L-AP4 20 μ M (4) de TBS x 1 (un tren, paneles superiores), TBS x 2 (2 trenes, paneles intermedios) y TBS x 3 (3 trenes, paneles inferiores). Un tren consistió en 10 ráfagas a 5 Hz; una ráfaga consistió en 5 pulsos de corriente a 100 Hz. Los trenes fueron repetidos cada 10 s. B. Curso temporal de la pendiente del fEPSP en respuesta a TBS x 1 (símbolos blancos), x 2 (símbolos grises), y x 3 (símbolos negros) seguido de la perfusión del L-AP4 (20 μ M). C. Gráfica de barras resumiendo los cambios en la pendiente del fEPSP a los 60 minutos después de TBS. n = 3 rebanadas / 3 animales para TBS x 1; n = 3 rebanadas / 3 animales para TBS x 2; n = 4 rebanadas / 3 animales para TBS x 3. D. fEPSPs representativas durante la basal (1), PTP (2), post-TBS (3), y DCG-IV 5 μ M (4) de TBS x 1 (un tren, paneles superiores), TBS x 2 (2 trenes, paneles intermedios) y TBS x 3 (3 trenes, paneles inferiores). E. Curso temporal de la pendiente del fEPSP en respuesta a TBS x 1 (símbolos blancos), x 2 (símbolos grises), y x 3 (símbolos negros) seguido de la perfusión del DCG-IV (5 μ M). Aunque la TBS x 2 indujo potenciación sináptica, TBS x 3 generó una mayor potenciación. F. Gráfica de barras resumiendo los cambios en la pendiente del fEPSP a los 60 minutos después de TBS. n = 3 rebanadas / 3 animales para TBS x 1; n = 4 rebanadas / 3 animales para TBS x 2; n = 4 rebanadas / 4 animales. * $P < 0.05$, prueba de Mann-Whitney.

de barras resumiendo los cambios en la pendiente del fEPSP a los 60 minutos después de TBS. n = 3 rebanadas / 3 animales para TBS x 1; n = 4 rebanadas / 3 animales para TBS x 2; n = 4 rebanadas / 4 animales. * $P < 0.05$, prueba de Mann-Whitney.

El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora progresivamente la LTP en la sinapsis MPP-GD de animales jóvenes

Juveniles

Después, evaluamos la capacidad de la sinapsis MPP-GD para expresar LTP en condiciones control y MK-801. Para estos experimentos y experimentos sucesivos, registramos una respuesta basal de 20 minutos, seguido de la aplicación del protocolo TBS x 3 y extendimos el tiempo de registro hasta 90 minutos después de la estimulación TBS. De manera similar al grupo control (n = 8 rebanadas / 7 animales), la estimulación TBS en el grupo MK-801 (n = 7 rebanadas / 7 animales) indujo la típica potenciación post-tetánica (PTP) seguida de una reducción gradual en la pendiente del fEPSP que se mantuvo potenciada por 90 minutos (fEPSP de la PTP en control vs. MK-801: $171.4 \pm 16\%$ vs. $135.9 \pm 9.43\%$ de la respuesta basal; Figura 19A-B). Aunque la LTP en el grupo MK-801 aparentemente estuvo reducida como se visualiza en los mapas de temperatura (Figura 19D), esta reducción no fue significativa con respecto al grupo control (fEPSP a los 90 min post-TBS en control vs. MK-801: $199.8 \pm 11.65\%$ vs. $198.9 \pm 29.47\%$ de la respuesta basal; $P > 0.05$, prueba de Mann-Whitney; Figura 19C). Estos registros fueron específicos de la MPP dado que deprimieron en presencia del DCG-IV, aunque con diferente sensibilidad farmacológica (fEPSP en control vs. MK-801: $18.27 \pm 2.24\%$ vs. $32.46 \pm 5.16\%$ de la respuesta basal, $P < 0.05$, prueba de Mann-Whitney). La reducción en la sensibilidad farmacológica al DCG-IV en el grupo MK-801 sugiere una expresión funcional reducida de los mGluRs del grupo II, un hallazgo sistemático común en todos nuestros experimentos y que resaltamos nuevamente hasta la sección de la discusión. Después, al analizar el decaimiento de la PTP (τ_{PTP}) con una función de decaimiento exponencial de una fase, encontramos que los valores de τ entre grupos no presentaron diferencias significativas (τ_{PTP} en control vs. MK-801: 65 ± 3 vs. 83.94 ± 16.34 s, $P > 0.05$, prueba de Mann-Whitney: inserto in la Figura 19B). En conjunto, estos datos indican que el tratamiento postnatal con MK-801 no suprime la capacidad de la sinapsis MPP-GD de expresar LTP en animales juveniles.

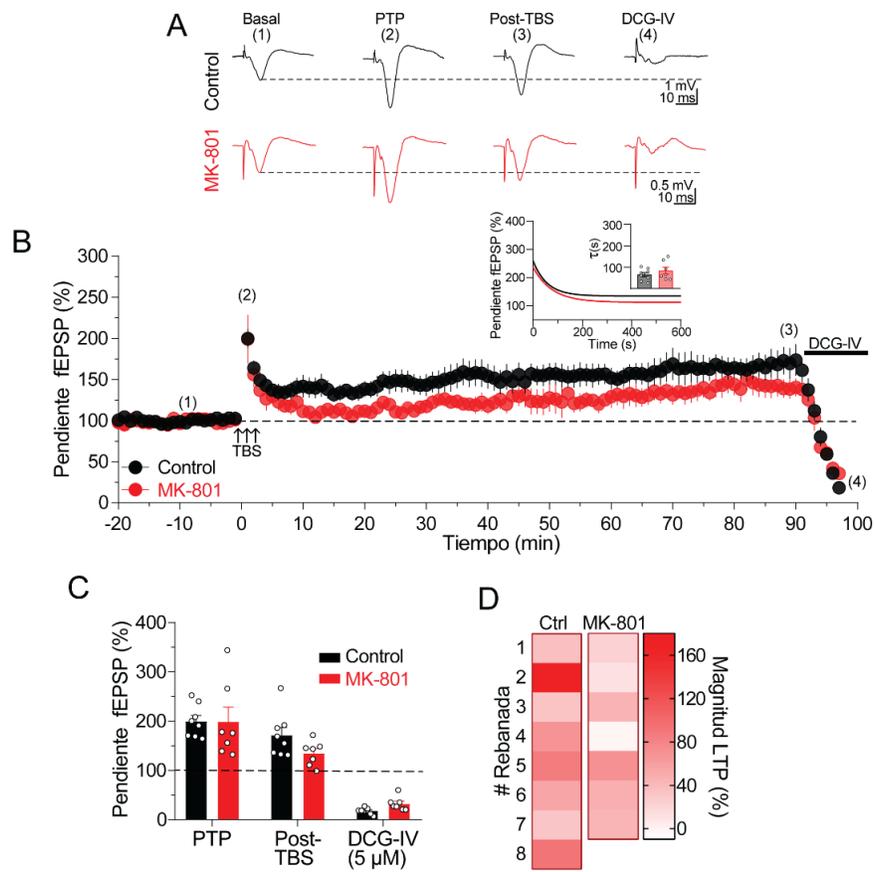


Figura 19. El tratamiento postnatal con MK-801 debilita, pero no evita la expresión de la LTP inducida por estimulación en ráfaga teta (TBS) en la sinapsis MPP-GD de animales jóvenes. A. Trazos representativos de los fEPSPs de la sinapsis MPP-GD en la condición basal (1), PTP (2), 90 minutos después de la estimulación TBS (3) y durante la perfusión de DCG-IV (4) en los grupos control y MK-801. B. Curso temporal de la pendiente del fEPSP después de la aplicación de un protocolo TBS en los grupos control y MK-801. La flecha indica el número de trenes TBS repetidos cada 10 s. Un tren se compuso de 10 ráfagas a 5 Hz, cada ráfaga se compuso de 5 pulsos de corriente a 100 Hz. C. Gráfica de barras que compara la magnitud de la respuesta sináptica durante la PTP, 90 minutos después de la TBS y en presencia de DGC-IV (5 μ M). D. Mapa de temperatura que muestra la magnitud de la LTP en cada una de las rebanadas de los grupos control y MK-801. Observe que, aunque el grupo MK-801 presentó valores de LTP de menor magnitud comparado con el grupo control. Grupo control, n=8 rebanadas/7 animales; grupo MK-801, n=7 rebanadas/7 animales.

Adultos

En animales adultos, una respuesta basal fue registrada por 20 minutos seguida de la aplicación del protocolo TBS x 3. Las respuestas sinápticas resultantes fueron registradas por 90 minutos seguidas de su identificación farmacológica con DCG-IV (5 μ M). En condiciones control (n = 3 rebanadas / 3 animales), encontramos que la estimulación TBS no indujo LTP (fEPSP a los 90 minutos post-TBS: $115.1 \pm 7.7\%$ de la respuesta basal; Figura 20A-B;

símbolos en color blanco). Sin embargo, las células granulares del DG adulto se caracterizan por ser células silentes debido a su naturaleza altamente hiperpolarizada (< -80 mV) y a la fuerte inhibición GABAérgica local (Schmidt-Hieber *et al.*, 2004; Elgueta & Bartos, 2019). Entonces, en presencia de picrotoxina ($50 \mu\text{M}$) repetimos la estimulación TBS para bloquear la transmisión GABAérgica mediada por los receptores GABA_A . Bajo estas condiciones experimentales, la estimulación TBS indujo una enorme PTP ($\approx 400\%$ de la respuesta basal) y una potenciación sináptica robusta (fEPSP a los 90 minutos post-TBS: $189.2 \pm 4.7\%$ de la respuesta basal; $n = 5$ rebanadas / 5 animales; Figura 20A-B, símbolos en color negro). Estos datos apoyan la idea que la LTP en la sinapsis MPP-GD es difícil de inducir en presencia de la inhibición GABAérgica (Schmidt-Hieber *et al.*, 2004; Schreurs *et al.*, 2017).

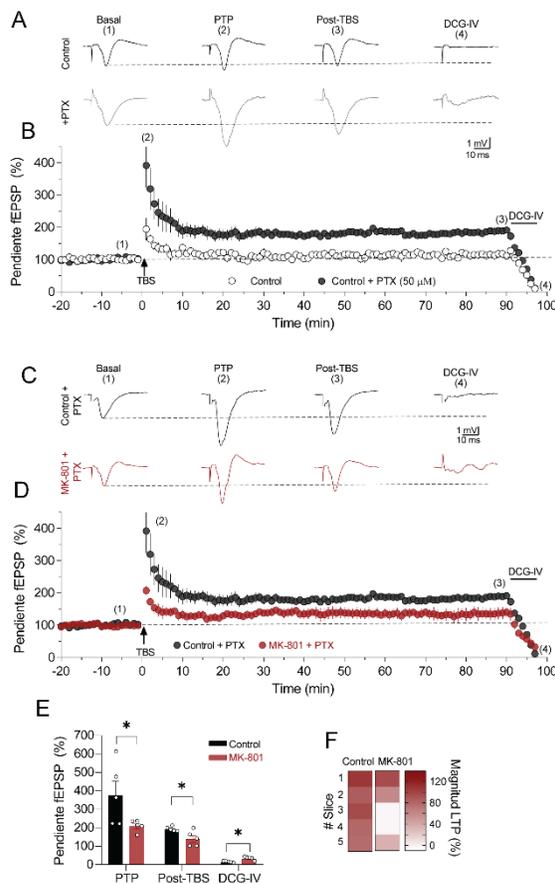


Figura 20. Las células granulares reducen progresivamente su capacidad para expresar LTP en la sinapsis MPP-GD de animales adultos en respuesta al tratamiento postnatal con MK-801. A. Trazos representativos de la basal (1), PTP (2), post-TBS (3) y en presencia de DCG-IV (4) en el grupo control sin picrotoxina (panel superior) y con picrotoxina (panel inferior). B. Curso temporal de la pendiente del fEPSP después de la estimulación TBS (3 trenes) en presencia o ausencia de picrotoxina en el grupo control, mostrando que el bloqueo de la inhibición GABAérgica es necesaria para la inducción de la LTP. C. Similar a A, pero se muestran trazos representativos en presencia de picrotoxina ($50 \mu\text{M}$) de los grupos control y MK-801. D. Curso temporal de la potenciación sináptica en los grupos control y MK-801. E. Gráfica de barras que compara la magnitud de la PTP, la respuesta 90 minutos post-TBS y la respuesta en presencia de DCG-IV ($5 \mu\text{M}$). Los valores menores de PTP y post-TBS en el grupo MK-801 sugieren reducción tanto en la inducción como en la expresión de la LTP. F. Mapa de temperatura mostrando la magnitud de la LTP para cada una de las rebanadas de los grupos control y MK-801. $*P < 0.05$, prueba de Mann-Whitney; $n = 5$ rebanadas/5 animales para cada grupo.

Con respecto al grupo MK-801, observamos que la estimulación TBS indujo tanto una PTP disminuida como una potenciación sináptica reducida, cuyas respuestas fueron deprimidas por el DCG-IV (fEPSP de la PTP en control vs. MK-801: 391.8 ± 68.9 vs. $206.9 \pm 13.9\%$ de

la respuesta basal, $P < 0.05$, prueba de Mann-Whitney; fEPSP a los 90 minutos post-TBS en control vs. MK-801: 189.3 ± 1.9 vs. $135.2 \pm 17.27\%$ de la respuesta basal, $P < 0.05$, prueba de Mann-Whitney; $n = 5$ rebanadas / 5 animales para cada grupo; Figura 20C-E). Los mapas de temperatura en la Figura 20F ilustran la LTP robusta en las rebanadas del grupo control y la LTP disminuida en el grupo MK-801. En conjunto, las observaciones de animales juveniles y de adultos indican que el tratamiento postnatal con MK-801 deteriora de manera progresiva la capacidad de la sinapsis MPP-GD para expresar potenciación sináptica.

6.13. *El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora tempranamente la LTP en la sinapsis LPP-GD*

Juveniles

Similar a los experimentos de TBS en la sinapsis MPP-GD, aplicamos la estimulación TBS x 3 en la LPP y registramos la respuesta por 90 minutos seguida de la perfusión de L-AP4 ($20 \mu\text{M}$). En comparación con el grupo control ($n = 7$ rebanadas / 6 animales), las rebanadas del grupo MK-801 ($n = 7$ rebanadas / 7 animales) exhibieron una PTP comparable en magnitud al grupo control, pero no expresaron LTP (fEPSP de la PTP en control vs. MK-801: $213.4 \pm 23.13\%$ vs. $239.9 \pm 18.28\%$ de la respuesta basal; fEPSP a los 90 min-post TBS en control vs. MK-801: $144.6 \pm 13.28\%$ vs. $105.5 \pm 10.9\%$ de la respuesta basal, $P < 0.05$, prueba de Mann-Whitney; Figura 21A-C). Ambas respuestas fueron específicas de la LPP dado que las respuestas deprimieron en presencia del L-AP4 (fEPSP en control vs. MK-801: $23.18 \pm 3.82\%$ vs. $28.01 \pm 4.33\%$ de la respuesta basal; Figura 21C). Además, al realizar un análisis de la constante de decaimiento de la PTP (τ_{PTP}), encontramos que el decaimiento de la τ_{PTP} fue más rápido en rebanadas de grupo MK-801 en comparación con el grupo control (τ_{PTP} en control vs. MK-801: 114 ± 23.38 vs. 47.03 ± 5.88 s; prueba de Mann-Whitney, $P < 0.05$: inserto en la Figura 21B), lo cual sugiere una desregulación de la plasticidad de corto plazo. Los mapas de temperatura en la Figura 21D muestran la escasa potenciación sináptica en cada una de las rebanadas del grupo MK-801 en comparación con el grupo control.

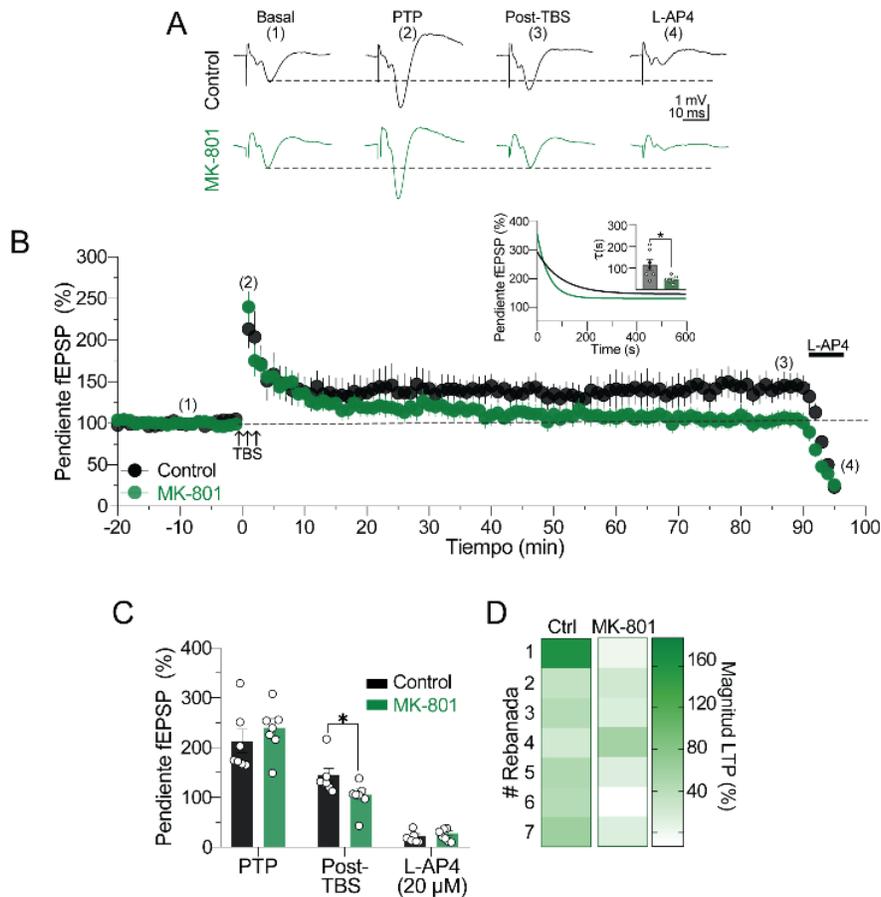


Figura 21. El tratamiento postnatal con MK-801 deteriora la LTP inducida por estimulación TBS en animales juveniles. **A.** Trazos representativos de los fEPSPs de la sinapsis LPP-GD en la condición basal (1), PTP (2), 90 minutos después de la estimulación TBS (3) y durante la perfusión de L-AP4 (4) en los grupos control y MK-801. **B.** Curso temporal de la pendiente del fEPSP después de la aplicación de un protocolo TBS x 3 en los grupos control y MK-801. La flecha indica el número de trenes TBS repetidos cada 10 s. Un tren se compuso de 10 ráfagas a 5 Hz, cada ráfaga se compuso de 5 pulsos de corriente a 100 Hz. El inserto compara el decaimiento de la PTP mediante la τ_{PTP} (determinada en segundos). **C.** Gráfica de barras que compara la magnitud de la respuesta sináptica durante la PTP, 90 minutos después de la TBS y en presencia de L-AP4 (20 μ M). **D.** Mapa de temperatura que muestra la magnitud de la LTP en cada una de las rebanadas de los grupos control y MK-801. Observe que el grupo MK-801 no presentó potenciación sináptica. * $P < 005$, prueba de Mann-Whitney. Grupo control, $n = 7$ rebanadas / 6 animales; grupo MK-801, $n = 7$ rebanadas / 7 animales.

Adultos

Para este conjunto de experimentos, los registros se realizaron en presencia de picrotoxina (50 μ M) para bloquear la transmisión GABAérgica. De manera similar a los hallazgos con animales jóvenes, la estimulación TBS x3 falló en inducir LTP en las rebanadas del grupo MK-801 (fEPSP de la PTP en control vs. MK-801: $279.9 \pm 14.4\%$ vs. $262 \pm 24.1\%$ de la respuesta basal; fEPSP a los 90 min-post TBS en control vs. MK-801: $186.3 \pm 16.6\%$ vs. 117

$\pm 18.14\%$ de la respuesta basal, $P < 0.05$, prueba de Mann-Whitney; $n = 5$ rebanadas / 5 animales para cada grupo; Figura 22A-C). La perfusión del L-AP4 al final de los registros demostró que las respuestas sinápticas fueron específicas de la LPP (fEPSP en control vs. MK-801: $23.6 \pm 2.65\%$ vs. $18.8 \pm 4.1\%$ de la respuesta basal; Figura 22C). Así mismo, el mapa de temperatura en la Figura 22D muestra que las rebanadas del grupo control expresan una LTP robusta que no se observa en las rebanadas del grupo MK-801. Estos hallazgos refuerzan la idea de que el tratamiento postnatal con MK-801 deteriora tempranamente la LTP y este efecto persiste hasta la etapa adulta.

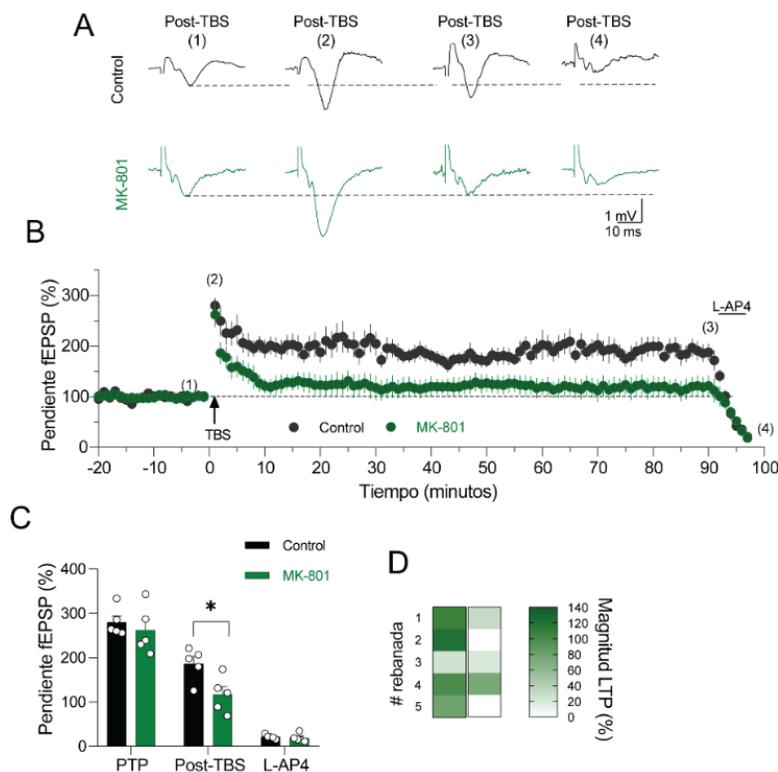


Figura 22. El deterioro en la LTP en la sinapsis LPP-GD inducida por el tratamiento postnatal con MK-801 se mantiene en animales adultos. **A.** Trazos representativos de la basal (1), PTP (2), post-TBS (3) y en presencia del L-AP4 (4) en los grupos control (panel superior) y MK-801 (panel inferior). **B.** Curso temporal de la pendiente del fEPSP después de la estimulación TBS x 3 (3 trenes) en presencia picrotoxina ($50 \mu\text{M}$) en los grupos control y MK-801. **C.** Gráfica de barras que compara la magnitud de la PTP, la respuesta 90 minutos post-TBS y la respuesta en presencia de L-AP4 ($20 \mu\text{M}$). La estimulación TBS no induce LTP en el grupo MK-801. **D.** Mapa de temperatura mostrando la magnitud de la LTP para cada una de las rebanadas de los grupos control y MK-801. * $P < 0.05$, prueba de Mann-Whitney; $n = 5$ rebanadas / 5 animales para cada grupo.

6.14. *El bloqueo postnatal del receptor NMDA debilita la LTP en la sinapsis fibras musgosas-CA3 de animales juveniles*

Finalmente, investigamos si el tratamiento postnatal con MK-801 interfiere con la expresión de la LTP en el siguiente revelo sináptico hipocampal compuesto por las fibras musgosas (los axones de las células granulares) y la región CA3 cuya singularidad principal es que es un fenómeno independiente de los receptores NMDA (Harris & Cotman, 1986). Nos enfocamos en animales juveniles y utilizamos el protocolo canónico de estimulación de alta frecuencia (HFS) compuesto por 100 pulsos a 100 Hz, repetido 3 veces.

En comparación con el grupo control, la aplicación del protocolo HFS en el grupo MK-801 indujo una PTP de magnitud similar y una potenciación sináptica debilitada (fEPSP en la PTP, control vs. MK-801: $221 \pm 14.5\%$ vs. $200.1 \pm 21.5\%$ de la respuesta basal; fEPSP a los 90 minutos post-HFS en control vs. MK-801: $161 \pm 8.27\%$ vs. $118.2 \pm 6.87\%$ de la respuesta basal, $P < 0.01$, prueba de Mann-Whitney; Figura 23A-C). Así mismo, al graficar las respuestas post-HFS como probabilidad acumulada, se observó que las respuestas sinápticas del grupo MK-801 presentan valores disminuidos de la pendiente del fEPSP durante todo periodo de registro (Figura 23D).

Los mapas de temperatura en la Figura 24E corroboran visualmente la LTP disminuida en el grupo MK-801 en comparación con el grupo control. Por lo tanto, aunque la inducción de la LTP en la sinapsis fibras musgosas es un fenómeno independiente del receptor NMDA, el bloqueo postnatal del receptor NMDA debilita la LTP en la sinapsis fibras musgosas-CA3.

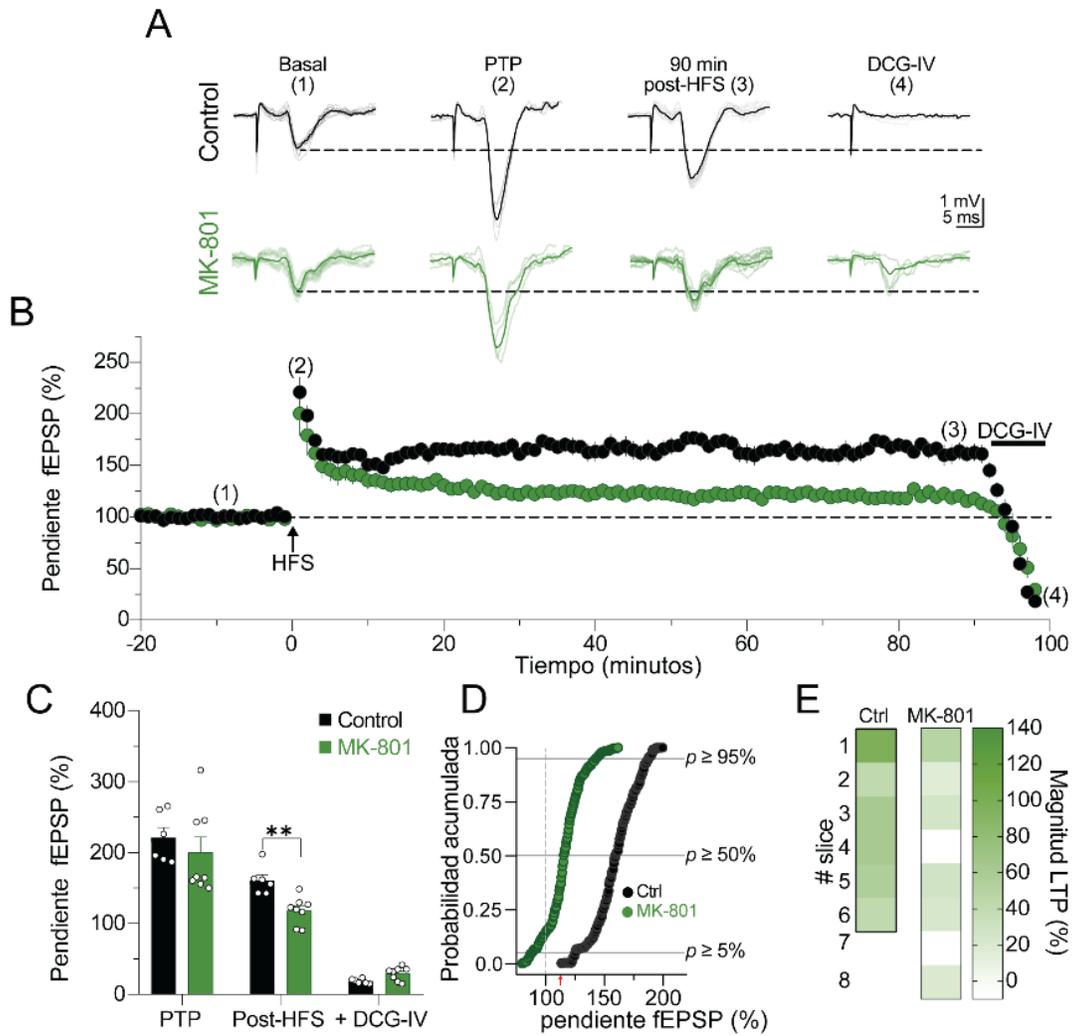


Figura 23. El bloqueo postnatal del receptor NMDA debilita la LTP en la sinapsis fibras musgosas-CA3 en animales juveniles. A. fEPSPs representativos de la condición basal (1), PTP (2), 90 minutos post-HFS (3) y en presencia de DCG-IV (4) de los grupos control y MK-801. B Curso temporal de la magnitud de la LTP en ambas condiciones experimentales. La línea sólida representa el tiempo de perfusión del DCG-IV (5 μ M). La flecha indica el momento de aplicación de la HFS. C. Gráfica de barras que resume los cambios en la pendiente del fEPSP durante la PTP, post-HFS y la perfusión de DCG-IV. D. Gráfica de probabilidad acumulada mostrando la distribución de las respuestas sinápticas después de la estimulación HFS. Los valores de la pendiente del fEPSP corresponden al minuto 11 al minuto 90. E. Mapas de temperatura que ilustran la potenciación sináptica reducida en las rebanadas del grupo MK-801. * $P < 0.01$, prueba de Mann-Whitney. Control, $n = 6$ rebanadas / 6 animales y MK-801, $n = 8$ rebanadas / 7 animales.

7. DISCUSIÓN

En este estudio demostramos que el bloqueo transitorio de los receptores NMDA durante el desarrollo postnatal temprano es suficiente para inducir deterioro en memorias de tipo espacial y una serie de alteraciones sinápticas en la vía perforante (lateral y medial) y el GD. Las modificaciones a nivel conductual y neuronal fueron examinadas en dos etapas relevantes para la esquizofrenia: la etapa juvenil y la etapa adulta. La etapa juvenil podría explicar varios de los cambios cognitivos y neurofisiológicos que ocurren desde la fase prodrómica de la esquizofrenia y la etapa adulta temprana que coincide con la fase de diagnóstico clínico de la esquizofrenia.

A nivel conductual demostramos que, desde la etapa juvenil, los animales que fueron tratados postnatalmente con MK-801 exhiben un deterioro en la memoria espacial y deterioro en uno de los componentes más finos de la memoria episódica, la discriminación espacial, donde el giro dentado desempeña un papel fundamental. Así mismo, presentamos evidencia de que la inhibición farmacológica de GAT1 mejora los déficits en la memoria y discriminación espacial inducidos por el tratamiento postnatal con MK-801 en animales juveniles, pero no en animales adultos. Estos hallazgos coinciden con una reducción en la transmisión GABAérgica a nivel dendrítico en el GD, de acuerdo nuestros análisis de curvas I-O.

A nivel neuronal, en la sinapsis LPP-GD, reportamos una desregulación persistente en la liberación presináptica de glutamato y una LTP deteriorada desde la etapa juvenil en animales expuestos postnatalmente al MK-801. Así mismo, la fuerza sináptica basal parece evolucionar desde un estado no afectado en la etapa temprana hacia un estado deteriorado en la etapa adulta. En la sinapsis MPP-GD, el bloqueo postnatal del receptor NMDA reduce tempranamente tanto la fuerza sináptica basal como la liberación presináptica de glutamato, debilita de manera progresiva la LTP y deteriora la LTD dependiente del receptor CB1 parcialmente explicada por una reducción en la expresión funcional de los receptores CB1. Sorprendentemente, esta LTD deteriorada es restablecida por la inhibición farmacológica de MAGL, enzima responsable de la síntesis del 2-AG. Así mismo, la desregulación en la plasticidad sináptica se extiende a otras sinapsis hipocampales como la sinapsis fibras musgosas-CA3 donde el tratamiento postnatal con MK-801 debilita la LTP independiente del receptor NMDA.

7.1. Memoria espacial

Los déficits cognitivos como la memoria de trabajo, la memoria episódica y la memoria visual están bien documentados en la fase crónica de la esquizofrenia (Tamminga et al., 2010; McCutcheon et al., 2023) y en la etapa adulta de modelos animales basados en la hipofunción transitoria del receptor NMDA (Wang et al., 2001; Nozari et al., 2014; Hernández-Frausto et al., 2019). Sin embargo, uno de los retos actuales en el estudio de la esquizofrenia es identificar posibles indicadores de estado cognitivo en una fase prodrómica que predigan el desarrollo de la esquizofrenia (Insel, 2010). En este marco contextual, la memoria y la navegación espacial son esenciales para el funcionamiento apropiado de procesos cognitivos de orden superior como la memoria de trabajo y la memoria episódica (ver Eichenbaum, 2017).

Nuestros hallazgos revelan que no sólo la memoria espacial está comprometida desde la etapa juvenil, sino que estos déficits persisten hasta la etapa adulta de los animales que fueron expuestos postnatalmente al MK-801. De manera similar, aunque menos estudiado, hay evidencia de que individuos con esquizofrenia también presentan déficits en la memoria y la navegación espacial (Folley *et al.*, 2010; Wilkins *et al.*, 2013; Cogné *et al.*, 2017). En contraste con nuestros resultados, estudios previos no encontraron alteraciones en la memoria de reconocimiento en la etapa juvenil, pero sí en la etapa adulta de animales tratados postnatalmente con MK-801 (Hernández-Frausto *et al.*, 2019). Por lo tanto, nuestros datos sugieren que pruebas de memoria que demandan un mayor procesamiento de información espacial y de navegación espacial, como la prueba de laberinto de Barnes, son más adecuadas para detectar déficits cognitivos en la etapa temprana de modelos animales tipo esquizofrenia como el bloqueo postnatal de los receptores NMDA.

7.2. Separación de patrones y discriminación mnemónica

En primera instancia, en este estudio demostramos por primera vez que al igual que en la etapa adulta (van Goethem *et al.*, 2018), la discriminación espacial opera fisiológicamente desde la etapa juvenil en ratas macho. Así mismo, otro resultado crucial de este estudio y que es consistente con la reducción en volumen que experimenta el giro dentado de individuos con esquizofrenia (Nakahara *et al.*, 2020), fue que la discriminación espacial está deteriorada en animales del grupo MK-801 tanto en la etapa juvenil como en la etapa adulta.

Teóricamente, la discriminación mnemónica es la manifestación conductual de la separación de patrones que ocurre en el giro dentado (Santoro, 2013) y que nos permite diferenciar que dos eventos o experiencias cercanas en el tiempo son esencialmente diferentes a pesar de una alta similitud en contenido o información (Yassa & Stark, 2011). En otras palabras, el GD, a través de la separación de patrones maximiza las pequeñas diferencias en la información cortical para almacenarlas como memorias independientes en la región CA3 (Leutgeb *et al.*, 2007). El fallo en la separación de patrones podría conducir inevitablemente a un falso reconocimiento de que una experiencia actual similar a una experiencia pasada es esencialmente idéntica (İmamoğlu *et al.*, 2023).

Consistente con nuestros resultados, estudios previos han reportado que la discriminación mnemónica está deteriorada en individuos con «primer episódico psicótico» (Kraguljac *et al.*, 2021) e incluso en una condición denominada esquizotipia multidimensional (individuos de 18 a 25 años) caracterizada por síntomas subclínicos positivos, negativos y cognitivos de la esquizofrenia (Sahakyan *et al.*, 2023). En línea con esta evidencia, un estudio reciente demostró que la discriminación mnemónica esta disminuida en niños y adolescentes (11-17 años) con alto riesgo de esquizofrenia (İmamoğlu *et al.*, 2023). En general, la evidencia anterior sugiere fuertemente que la capacidad de discriminación espacial está deteriorada desde la fase temprana o prodrómica de la esquizofrenia, una predicción derivada de estudios computacionales en el GD (Faghihi & Moustafa, 2015) y que ahora ha sido demostrada.

Dada la coincidencia en la discriminación mnemónica deteriorada entre individuos con alto riesgo de esquizofrenia y nuestro modelo experimental, proponemos que la discriminación mnemónica podría ser utilizada como un marcador del estado cognitivo que permita identificar individuos con un alto riesgo de desarrollar esquizofrenia (background genético y antecedentes familiares). Aunque desafiante, este *screening* permitiría intervenciones terapéuticas tempranas y modificaría el pronóstico de la enfermedad, como ha sido sugerido previamente (Insel, 2010). A nivel preclínico, los modelos animales que mimeticen el fenotipo esquizofrenia deben reproducir la discriminación mnemónica deteriorada en el estado juvenil de los animales.

7.3. Modulación farmacológica de GAT1 en procesos de memoria

La reducción en la transmisión GABAérgica es un fenómeno bien documentado en individuos con esquizofrenia y en estudios post-mortem de esta población (Konradi *et al.*, 2011; Frankle *et al.*, 2015; Shaw *et al.*, 2020). Incluso, la evidencia molecular derivada de modelos animales apoya esta desregulación de acuerdo con la expresión disminuida de proteínas clave para la regulación de la actividad GABAérgica como GAD-67, la proteína PV y el vGAT (Li *et al.*, 2015; Murueta-Goyena *et al.*, 2018). En este estudio demostramos que favorecer la transmisión GABAérgica a través de la inhibición de GAT1, el principal transportador de la recaptura de GABA (Song *et al.*, 2013), es suficiente para mejorar la memoria y la discriminación espacial en animales jóvenes que fueron tratados postnatalmente con MK-801, pero no en animales adultos. Aunque son múltiples las posibilidades que podrían explicar este efecto diferencial, tales como cambios dependientes de la edad en la síntesis y liberación de GABA e incluso en la recaptura de GABA, todas las posibilidades convergen de manera sugerente en una reducción de la transmisión GABAérgica que inicia en la fase prodrómica de la esquizofrenia. En apoyo a esta idea, nuestros resultados de curvas I-O en la sinapsis MPP-GD (especializada en el procesamiento de información espacial) del grupo MK-801, indican una reducción dependiente de la edad en la inhibición GABAérgica (nivel dendrítico), donde la transmisión GABAérgica disminuye desde la etapa juvenil y deteriora aún más la etapa adulta. Lo anterior sugiere que las intervenciones terapéuticas orientadas a favorecer la actividad GABAérgica como la inhibición de GAT1 en la etapa temprana de la esquizofrenia podrían ser efectivas para mejorar las capacidades cognitivas de individuos con alto riesgo de esquizofrenia; esto debido a que los niveles de GABA, aunque reducidos son susceptibles de modulación farmacológica.

Además, otro punto importante para destacar es la relación entre la inhibición de GAT1 y su efecto positivo sobre la discriminación espacial a través de la modulación de la inhibición tónica en el GD. A diferencia de la inhibición fásica (mediada por receptores GABA_A que contienen la subunidad α 1-3) que se caracteriza por ser rápida y selectiva (nivel sináptico); la inhibición tónica ocurre cuando el GABA sináptico difunde hacia sitios extrasinápticos e induce la activación persistente o tónica de ciertas isoformas de los receptores GABA_A (ej. receptores que contienen la subunidad α 4-6 o a la subunidad δ) (Farrant & Nusser, 2005). En

el GD, la inhibición tónica contribuye a la baja actividad de disparo de las células granulares y facilita la discriminación de experiencias similares que demandan de la separación de patrones (Engin *et al.*, 2015). En este estudio, observamos que la inhibición de GAT1 restableció la discriminación espacial de los animales juveniles del grupo MK-801. Este efecto podría deberse parcialmente a un incremento en la inhibición tónica dado que la inhibición de GAT1 con NNC-711 aumenta los niveles de GABA extracelulares necesarios para generar una inhibición tónica (Song *et al.*, 2013). De manera colectiva, la información previa apoya la idea de que favorecer la inhibición tónica en una fase temprana de la esquizofrenia podría mejorar la discriminación de memorias similares dependientes de la separación de patrones. Así mismo, los receptores GABA_A extrasinápticos figuran como posibles blancos terapéuticos para aumentar la inhibición tónica en la esquizofrenia. Un candidato digno de explorar con moduladores alostéricos positivos es el receptor GABA_A que contine la subunidad $\alpha 5$ dado que estos receptores son cruciales para la discriminación de experiencias similares en roedores (Engin *et al.*, 2015).

Una posible explicación de la ausencia de efecto de la inhibición de GAT1 con NNC-711 en animales adultos puede ser atribuida a cambios en la expresión de GAT1. Consistente con esta idea, la inhibición de GAT1 con NNC-711 no modifica las corrientes post-sinápticas inhibitorias en neuronas piramidales de la capa II/III de la corteza prefrontal de animales adultos tratados postnatalmente con fenciclidina (Kjaerby *et al.*, 2014), lo cual es indicativo de una expresión funcional reducida de GAT1. Una condición similar puede ocurrir en el hipocampo tanto en la etapa juvenil como en la etapa adulta, aunque esto requiere de investigación adicional.

Finalmente, un resultado que merece especial atención es la dosis de NNC-711 (0.5 mg/kg) que generó efectos positivos en las pruebas de memorias en animales juveniles del grupo MK-801. Por ejemplo, estudio previos han reportado que el NNC-711 en dosis de 0.25 a 1.5 mg/kg producen efectos positivos en pruebas que evalúan la adquisición de memorias de tipo aversivo y memorias de tipo espacial (O'Connell *et al.*, 2001). En contraste, dosis superiores no presentan efectos (10 mg/kg) o incluso deterioran la memoria espacial (20 mg/kg), dependiendo de si son evaluadas en rata o ratón adulto (Schmitt & Hiemke, 2002; Sałat *et al.*, 2015). En conjunto, estos resultados sugieren que únicamente dosis bajas de NNC-711

son efectivas para mejorar el procesamiento de información espacial. Consistente con estos resultados, estudios recientes demuestran que la actividad de interneuronas PV⁺ y SOM⁺ es necesaria para la consolidación de memorias de miedo y la codificación de memorias episódicas con alta similitud en contenido (Xia *et al.*, 2017; Morales *et al.*, 2021). Por lo tanto, favorecer los niveles de GABA a través de la inhibición de GAT1 debería incrementar la actividad de interneuronas locales en regiones como el GD y el área CA3 para favorecer tanto la discriminación como la memoria espacial en animales del grupo MK-801.

Una posible explicación del por qué no observamos efectos con la dosis de NNC-711 de 1.5 mg/kg es debido a la pérdida de la inhibición selectiva de las células granulares por interneuronas locales PV⁺ o SOM⁺ que son relevantes para el procesamiento cognitivo (Guzman *et al.*, 2021; Morales *et al.*, 2021). Por ejemplo, aunque en el GD la inhibición GABAérgica es regulada principalmente por la actividad de interneuronas PV⁺, SOM⁺ y células tipo hilares asociadas a la vía perforante (Ewell & Jones, 2010; Lee *et al.*, 2016; Elgueta & Bartos, 2019), también hay otros subtipos de interneuronas involucradas en la inhibición como las interneuronas CCK⁺, Neuropeptido Y⁺ y neurogliaformes (Houser, 2007). Por lo tanto, aunque favorecer la actividad GABAérgica mediante una dosis superior (1.5 mg/kg) de NNC-711 resultaría en una mayor inhibición GABAérgica local, esto no se traduciría en un efecto mejor o igual que el de la dosis de 0.5 mg/kg debido a que inhibición debe ser selectiva y no generalizada, como lo predicen los modelos computacionales (Faghihi & Moustafa, 2015).

Por otra parte, es importante mencionar que, aunque el efecto terapéutico de los antipsicóticos tanto típicos como atípicos se atribuye al bloqueo de los receptores D2 en el estriado asociativo (Maia & Frank, 2017), todos ellos exhiben afinidades distintas por otros receptores como los D1/D5, cuya activación es esencial para la consolidación de la memoria y la memoria de trabajo (Lewis & Sweet, 2009). Aunque no encontramos estudios que hayan examinado el impacto de los antipsicóticos en la memoria espacial y la discriminación espacial en modelos animales basados en el bloqueo postnatal de los receptores NMDA, las observaciones neuropsicológicas han revelado efectos diferenciales de los antipsicóticos en el funcionamiento cognitivo. Generalmente los antipsicóticos típicos como la clorpromazina empeoran los síntomas cognitivos de la esquizofrenia porque presentan afinidad por los

receptores D1/D5, cuya activación es crítica para la memoria de trabajo (Lewis & Sweet, 2009). En contraste, los antipsicóticos atípicos que se caracterizan por ser antagonistas de los receptores 5-HT_{2A} y de los receptores D2, incluso se piensa que mejoran el funcionamiento cognitivo. Por ejemplo, sertindol, un antipsicótico de segunda generación, mejora el funcionamiento cognitivo en pacientes con esquizofrenia (Nielsen *et al.*, 2015), un efecto que al menos podría atribuirse al bloqueo de los receptores 5-HT_{2A-C} (Cronenwett, 2016) y posiblemente al bloqueo de otros receptores a serotonina como el 5-HT₆. Sin embargo, en la esquizofrenia, la transmisión dopaminérgica está reducida a nivel cortical y al menos la memoria de trabajo requiere de la activación de los receptores D1 en la corteza prefrontal dorsolateral (Lewis & Sweet, 2009). Por lo tanto, dado el requerimiento del receptor D1 en la memoria de trabajo, este receptor podría ser un blanco terapéutico para favorecer el funcionamiento cognitivo. En apoyo a esta idea, en un estudio previo, observamos que la activación de los receptores D1/D5 restablece la potenciación de la excitabilidad intrínseca de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratas juveniles tratadas postnatalmente con MK-801 (Griego *et al.*, 2022), la cual es una forma de plasticidad no sináptica que contribuye a la formación de la memoria (Debanne *et al.*, 2019).

7.4. Cambios en la transmisión sináptica y la liberación presináptica en la vía perforante

De manera funcional, las entradas excitadoras que proyectan al giro dentado transfieren distintos tipos de información cortical. La MPP transfiere información espacial desde la corteza entorrinal media y la LPP transfiere información multisensorial desde la corteza entorrinal lateral (Hunsaker *et al.*, 2007; Fernández-Ruiz *et al.*, 2021). Consistente con observaciones anteriores (Segev *et al.*, 2020; Griego *et al.*, 2022), nuestros resultados muestran que el tratamiento postnatal con MK-801 reduce tempranamente la transmisión sináptica basal en la MPP-GD, explicada parcialmente por una reducción en la liberación presináptica de glutamato y una menor excitabilidad presináptica. Por el contrario, en la sinapsis LPP-GD a pesar de experimentar tempranamente una reducción en la liberación presináptica de glutamato, esto no contribuye a la reducción en la transmisión sináptica basal, sugiriendo la participación de posibles mecanismos compensatorios a nivel postsináptico (ej. canales iónicos dependientes de voltaje). En línea con nuestras observaciones, el bloqueo transitorio de los receptores NMDA durante el desarrollo postnatal interfiere con la expresión

de varias proteínas presinápticas responsables de la liberación de neurotransmisores en modelos animales (Maher & LoTurco, 2012; Saggi *et al.*, 2013; Pinzón-Parra *et al.*, 2022). Algunos de estos cambios en la maquinaria de liberación presináptica también han sido identificados en pacientes con esquizofrenia (Egbujo *et al.*, 2016). A pesar de que las alteraciones en la transmisión sináptica están presentes en ambas divisiones de la vía perforante, nuestros datos sugieren alteraciones más robustas en el procesamiento de información espacial que está mediada por la MPP-GD en comparación con la información multisensorial que está mediada por la LPP-GD.

7.5. Potenciación sináptica inducida por LFS en la sinapsis LPP-GD

La LTD es una forma de plasticidad sináptica que contribuye a la adquisición de información novedosa (Manahan-Vaughan & Braunewell, 1999), sin embargo, este fenómeno en las sinapsis de la vía perforante y el giro dentado ha sido escasamente explorado. Nuestro estudio reveló que la sinapsis LPP-GD no expresa LTD con LFS a 1 o 3 Hz. La ausencia de depresión sináptica en la sinapsis LPP-GD va más allá del alcance de esta investigación, pero estudios previos apoyan nuestra conclusión. Por ejemplo, la LFS a 1 Hz en condiciones *in vitro* falla en inducir LTD (Blaise & Bronzino, 2003) y la estimulación superior a 10 Hz induce LTP en rebanadas hipocampales de ratones adultos (Egaña-Huguet *et al.*, 2021). Así mismo, un estudio *in vivo* en ratas, reportó que la LFS a 1 Hz induce una potenciación sináptica de inicio lento (Gonzalez *et al.*, 2014).

7.6. Mecanismos que contribuyen a la LTD deteriorada en la sinapsis MPP-GD

Con respecto a la sinapsis MPP-GD, la LTD inducida con LFS a 10 Hz es dependiente de la activación del receptor CB1 mediada por el 2-AG, pero no por la anandamida (Peñasco *et al.*, 2019). Sin embargo, en este estudio exploramos la eficacia de la frecuencia de estimulación a 1 o 3 Hz, un patrón de actividad fisiológico que mimetiza el rango teta-delta de descarga de las células estelares y piramidales de la corteza entorrinal (Gloveli *et al.*, 1997; Deshmukh *et al.*, 2010). Este patrón de estimulación demostró que la LFS a 3 Hz induce una LTD presináptica que también es dependiente del receptor CB1.

En rebanadas hipocampales de animales juveniles tratados postnatalmente con MK-801 se observó un fenómeno atípico en respuesta a la estimulación LFS, ya que en lugar de observar LTD se produjo potenciación sináptica postsináptica. Este fallo en la inducción de la LTD

persistió en la etapa adulta. En este estudio, utilizando estrategias experimentales previamente validadas, investigamos tres puntos clave en la cascada de señalización requerida para expresión de la LTD en la etapa juvenil: la activación directa de los receptores CB1 con 5 μ M WIN 55,212-2 (Fontaine *et al.*, 2020), la estimulación de la síntesis postsináptica del 2-AG con 10 μ M fisostigmina (Wang, Jia, *et al.*, 2018) y la inhibición de la degradación presináptica del 2-AG con 1 μ M JZL 184 (Wang, Cox, *et al.*, 2018). Nuestros resultados revelaron que la ausencia de LTD podría deberse a una expresión funcional reducida de los receptores CB1 o a una degradación acelerada del 2-AG, pero no a una reducción en la síntesis de 2-AG a nivel postsináptico, dado que en rebanadas de animales del grupo MK-801 tanto la activación directa de los receptores CB1 como la estimulación de la síntesis endógena del 2-AG con fisostigmina generaron magnitudes de depresión similares. Estos resultados son consistentes con estudios en modelos animales tipo esquizofrenia que reportan una reducción en la expresión del receptor CB1 (Kaminitz *et al.*, 2014; Szűcs *et al.*, 2016; Osborne *et al.*, 2019).

Por otra parte, aunque la relación de MAGL y la esquizofrenia está menos estudiada, un estudio previo en pacientes esquizofrénicos encontró niveles séricos elevados de la enzima MAGL (Kaya *et al.*, 2019). De hecho, aunque esta relación es menos directa, un estudio en neuronas cultivadas de hipocampo (neuronas piramidales de CA1) reportó un incremento en la expresión de MAGL asociado con la desregulación de la neuropilina-1, un factor de crecimiento comúnmente asociado a la fisiopatología de esquizofrenia (Du *et al.*, 2013). Estos datos expanden el abanico de posibilidades donde el fallo en la inducción en la LTD en el grupo MK-801 puede ser atribuida parcialmente a una degradación acelerada del 2-AG por una actividad aumentada de MAGL, lo cual requiere investigación adicional.

Por último, un hallazgo crucial de nuestro estudio fue que la inhibición enzimática de MAGL durante la LFS restaura la LTD en la sinapsis MPP-GD del grupo MK-801, un mecanismo de plasticidad involucrado en la codificación de información novedosa (Manahan-Vaughan & Braunewell, 1999). Este resultado sugiere que a nivel conductual favorecer la señalización del 2-AG a través de la inhibición farmacológica de MAGL puede mejorar los déficits cognitivos de memoria episódica y discriminación espacial presentes en la esquizofrenia, que como se mencionó previamente requieren de un elevado procesamiento de información

espacial. Por ejemplo, la inhibición de MAGL alivia los déficits en la memoria espacial en un modelo de Alzheimer (Hashem *et al.*, 2021).

7.7. Potenciación sináptica

La potenciación sináptica es una forma de plasticidad que ocurre durante la formación de nuevas memorias a través de un fortalecimiento de las conexiones sinápticas activadas durante el aprendizaje (Whitlock *et al.*, 2006; Nabavi *et al.*, 2014). En este estudio proveemos evidencia que el bloqueo postnatal transitorio del receptor NMDA es suficiente para deteriorar tempranamente la LTP presináptica en la LPP-GD y debilitar la LTP de manera progresiva en la sinapsis MPP-GD.

El efecto diferencial en el grado de afectación de la potenciación sináptica entre la sinapsis LPP-GD y MPP-GD merece especial atención. Por ejemplo, en rebanadas del grupo MK-801 después de la activación de los receptores NMDA postsinápticos (Hanse & Gustafsson, 1992; Wang *et al.*, 2002), la LTP en la sinapsis MPP-GD podría inducirse a través de una serie de vías de señalización redundantes como la vía CaMKII y la vía PKA-ERK1/2 (Wu *et al.*, 2006; Welsby *et al.*, 2009) que garantizan su expresión a nivel postsináptico. De este modo, el defecto en la vía de señalización del receptor de CaMKII puede ser compensada por la vía de señalización de PKA-ERK1/2 y viceversa. Esto podría explicar por qué la sinapsis MPP-GD de animales del grupo MK-801 presentó potenciación sináptica, aunque en magnitud disminuida, tanto en la etapa juvenil como adulta.

En contraste, en la sinapsis LPP-GD, la LTP requiere inicialmente de la activación de los receptores NMDA y mGluRs del grupo I, cuyos eventos moleculares sucesivos convergen en la síntesis del 2-AG (Wang *et al.*, 2016). El 2-AG difunde retrógradamente a las terminales de la LPP y activa receptores CB1 que incrementan la liberación del glutamato a través de la vía de señalización no canónica receptor CB₁ /FAK/ROCK (Wang, Jia, *et al.*, 2018). En este estudio encontramos que la LTP inducida por TBS en la sinapsis LPP-GD incrementa la liberación presináptica, lo cual sugiere que los mecanismos moleculares que subyacen a la LTP inducida con protocolos de alta frecuencia (Wang *et al.*, 2016) son los mismos mecanismos reclutados por la estimulación en ráfaga teta. Así mismo, aunque no investigamos los mecanismos que subyacen a la LTP deteriorada, nuestras observaciones en la sinapsis MPP-GD y las de otros estudios sugieren que una expresión funcional reducida

de los receptores CB1 o una degradación acelerada del 2-AG (Kaminitz *et al.*, 2014; Szűcs *et al.*, 2016; Osborne *et al.*, 2019) podría explicar la ausencia de la LTP. De acuerdo con estos datos, sugerimos que favorecer la actividad del receptor CB1 puede potencialmente revertir el fallo en la inducción de la LTP en animales tratados postnatalmente con MK-801. Entre las posibles estrategias farmacológicas dignas de explorar se encuentran: la activación directa de los receptores CB1 y la inhibición de la degradación del 2-AG. Una posibilidad adicional es la activación directa de los mGluRs del grupo I, cuya expresión está reducida en pacientes con esquizofrenia (revisado en Vinson and Conn, 2012).

Debido a que encontramos múltiples alteraciones en la plasticidad sináptica en el giro dentado en respuesta al bloqueo postnatal sistémico del receptor NMDA, una interrogante inmediata fue si la hipofunción de estos receptores impactaría en la potenciación sináptica en el siguiente relevo sináptico cuya característica principal es que es un evento independiente del receptor NMDA (Zalutsky & Nicoll, 1990). Nuestros resultados demuestran que efectivamente, interferir con la funcionalidad de los receptores NMDA en el desarrollo postnatal temprano debilita la LTP independiente del receptor NMDA (que no requiere de la activación de los receptores NMDA) en la sinapsis fibras musgosas-CA3. Curiosamente, al igual que en el área CA3 de pacientes con esquizofrenia (Tamminga *et al.*, 2010), las neuronas piramidales de CA3 presentan hiperexcitabilidad debido a la desregulación en la actividad de múltiples canales de K^+ , tales como las conductancias de los canales rectificadores entrantes de K^+ y de los canales de potasio activados por calcio, la AHP media y lenta (Márquez *et al.*, 2023). Este fenómeno de hiperexcitabilidad también ocurre cuando los receptores NMDA son silenciados selectivamente en las células granulares del giro dentado. Incluso lo más llamativo es que esta manipulación experimental reproduce algunas características del fenotipo esquizofrenia como la interacción social reducida y miedo elevado (Segev *et al.*, 2020). En conjunto, nuestras observaciones y la de otros estudios sugieren que la hiperexcitabilidad en neuronas piramidales de CA3 puede ser atribuida a la disfunción postnatal de los receptores NMDA.

7.8. Plasticidad y conducta

Por otra parte, aunque no conocemos de manera exacta cómo cada forma de plasticidad contribuye al procesamiento de información en el giro dentado durante la adquisición de una

memoria, existen algunos estudios que han demostrado una correlación positiva entre la LTP y la ejecución de tareas cognitivas que involucran el procesamiento de información multisensorial y espacial entre la corteza entorrinal y el GD.

Por ejemplo, un estudio en pacientes con epilepsia farmacorresistente demostró que la estimulación TBS en la corteza entorrinal mejora la discriminación mnemónica que involucra aspectos espaciales y no espaciales (características de objetos: formas, colores, detalles, etc.) en individuos sanos (Titiz *et al.*, 2017). En estudios en animales, la interferencia con elementos moleculares esenciales para la expresión de la LTP deteriora la memoria que involucra el procesamiento de información de multisensorial. Por ejemplo, el bloqueo del receptor CB1, que es esencial para la expresión de la LTP en la LPP-GD, deteriora el rendimiento en una prueba de discriminación de olores (Wang *et al.*, 2016). En contraste, en un modelo de autismo (*Fmr1*⁻) que exhibe deterioro en la memoria de olores y en la inducción de LTP en la sinapsis LPP-GD, el incremento en la señalización del 2-AG a través de la inhibición enzimática de MAGL mejora tanto la LTP como la memoria de olores (Wang, Cox, *et al.*, 2018).

De manera similar, manipulaciones experimentales que aumentan de manera selectiva la LTP en la sinapsis MPP-GD se correlacionan positivamente con una adquisición rápida de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (Saab *et al.*, 2009). Esta observación sugiere que la LTP podría ser relevante para la adquisición de memorias de tipo espacial, especialmente en aquellas memorias que se adquieren en múltiples ensayos como la prueba del laberinto acuático de Morris (Saab *et al.*, 2009) y el laberinto de Barnes, como investigamos en nuestro estudio.

Desafortunadamente no hay estudios que relacionen directamente los procesos de plasticidad con la discriminación mnemónica espacial. Sin embargo, dado que la sinapsis MPP-GD se especializa mayormente en el procesamiento de información espacial, hipotetizamos que los procesos de plasticidad, en particular la depresión sináptica dependiente del receptor CB1, podría tener un rol crucial en la discriminación espacial. Esta propuesta deriva de observaciones previas donde la codificación de información de objetos desencadena depresión sináptica y la inducción de depresión sináptica facilita la discriminación de un evento nuevo y el cambio en la posición espacial de objetos (Manahan-Vaughan &

Braunewell, 1999; Kemp & Manahan-Vaughan, 2008). Si esto es cierto, interferir con la señalización del 2-AG debería deteriorar la discriminación espacial en la prueba de separación de patrones, aunque esta aseveración requiere de investigación adicional.

Finalmente, un aspecto a resaltar es el rol crucial del sistema endocannabinoide a través de la vía de señalización Diacilglicerol lipasa/2-AG/ receptor CB1 en múltiples formas de plasticidad sináptica en el giro dentado. Esto es llamativo, dado que mientras la depresión sináptica en la sinapsis MPP-GD es dependiente de la activación de los receptores CB1, la activación de estos receptores en la sinapsis LPP-GD induce potenciación sináptica. Estas diferencias se deben a que los receptores CB1 de la MPP y de la LPP están acoplados a diferentes vías de la señalización donde el resultado final es la disminución en la liberación (Fontaine *et al.*, 2020) o el incremento en la liberación presináptica (Wang *et al.*, 2016; Wang, Jia, *et al.*, 2018; Vyleta & Snyder, 2021), respectivamente. Estos cambios de la liberación presináptica son los responsables de la expresión de la LTD en la MPP y de la LTP en la LPP, un fenómeno que también fue observado sistemáticamente en nuestros análisis de PPR en los experimentos de plasticidad sináptica. Esto nos lleva a proponer que el receptor CB1 puede funcionar como un regulador maestro que orquesta la plasticidad sináptica entre la corteza entorrinal lateral o medial y el giro dentado en función del tipo de información cortical entrante. Por ejemplo, la transferencia de información somatosensorial desde la vía perforante lateral al giro dentado es facilitada por la LTP dependiente del receptor CB1, al mismo tiempo que la activación de este receptor en la MPP induce depresión sináptica. En principio, esto debería maximizar el procesamiento y transferencia de la información somatosensorial al giro dentado mientras que la información espacial proveniente de la MPP debería ser atenuada y en consecuencia transferida de manera menos eficiente al giro dentado. Un estudio electrofisiológico que evalúe simultáneamente la activación de los receptores CB1 en la MPP y en la LPP sin duda ayudaría a entender cómo se integran las respuestas sinápticas de la MPP y la LPP en el giro dentado como consecuencia de las modificaciones plásticas en estas vías. Adicionalmente, dada la función crítica del receptor CB1 en diferentes formas de plasticidad, se abre la posibilidad de que la modulación del receptor CB1 sea un blanco terapéutico para los déficits cognitivos en una fase prodrómica de la esquizofrenia.

7.9. Consideraciones y limitaciones del estudio

Nuestro trabajo presenta algunas limitaciones que merecen ser discutidas brevemente. La primera limitante es que nuestro estudio se enfocó únicamente en animales macho. Reconocemos que uno de los desafíos en el estudio de la esquizofrenia es determinar las diferencias sexuales en el comienzo y severidad en las alteraciones neurofisiológicas y conductuales que son distintivas de la enfermedad. Por ejemplo, uno de los pocos estudios basados en la hipofunción de los receptores NMDA (Milenkovic *et al.*, 2014) que ha investigado la trayectoria en la expresión de los déficits conductuales, muestra que las ratonas hembras presentan deterioro en la memoria social y de trabajo únicamente en la etapa adulta (12 semanas de edad), pero no en la etapa juvenil (6 semanas de edad), como sí ocurrió en ratones macho. Estos resultados sugieren que la manifestación temporal del deterioro cognitivo al menos en la memoria de trabajo y social difieren entre machos y hembras. Para estudiar cómo el bloqueo postnatal temprano de los receptores NMDA afecta la discriminación espacial de experiencias similares y la memoria espacial en ratas hembra, se requiere de un análisis conductual que evalúa el rendimiento de ratas hembra de distintas edades (por ejemplo, 4, 6, 9 y 12 semanas) para identificar el momento de la emergencia del deterioro en la discriminación espacial dependiente del GD y en la memoria espacial. En este sentido, también es importante determinar si las ratas hembra tratadas postnatalmente con MK-801, presentan la misma desregulación sináptica (por ejemplo: plasticidad sináptica, señalización del 2-AG) que las ratas macho en la etapa juvenil.

Finalmente, una consideración especial en este estudio es que aunque el bloqueo postnatal de los receptores NMDA en ratas es un modelo que cumple con los criterios de validez mecánica y de apariencia (Belzung & Lemoine, 2011) para el estudio de la fisiopatología de la esquizofrenia, nuestro enfoque experimental se limita a una intervención experimental en una ventana temporal específica del desarrollo cerebral temprano (primer insulto). Aunque esta manipulación experimental es suficiente para reproducir características fenotípicas y neurofisiológicas relevantes de la esquizofrenia en roedores (Jeevakumar *et al.*, 2015; Kjaerby *et al.*, 2017; Seshadri *et al.*, 2018; Griego *et al.*, 2022), no considera la incidencia de otros factores adversos (segundos insultos) como el estrés, consumo de sustancias de abuso o los desafíos inmunológicos en la adolescencia (Guerrin *et al.*, 2021) que podrían magnificar

el fenotipo similar a la esquizofrenia. El progreso en el conocimiento sobre cómo segundos insultos afecta al cerebro adolescente con alto riesgo para desarrollar esquizofrenia, sin duda mejorarán nuestro entendimiento de la neurobiología de la esquizofrenia y mejoran las bases teóricas para desarrollar modelos tipo esquizofrenia con validez predictiva.

8. CONCLUSIÓN GENERAL

El bloqueo postnatal temprano de los receptores NMDA altera la transferencia sináptica de información desde la corteza entorrinal hacia el GD desde la etapa juvenil. Estos cambios impactan a la sinapsis LPP-GD y MPP-GD desregulando la liberación presináptica de neurotransmisores, la inducción de la LTD y de la LTP. Consistente con estos cambios sinápticos, la memoria y la discriminación espacial están deterioradas desde la etapa juvenil de los animales que fueron tratados postnatalmente con MK-801. Finalmente, dado nuestros hallazgos conductuales y neurofisiológicos, la modulación de la transmisión GABAérgica (vía inhibición de GAT1) o la modulación del sistema endocannabinoide (vía activación del receptor CB1 o inhibición de MAGL) podrían restaurar las funciones sinápticas y las habilidades cognitivas alteradas de individuos con alto riesgo de desarrollar esquizofrenia.

9. PERSPECTIVAS

Identificar los componentes celulares y moleculares responsables de la reducción en la inhibición GABAérgica, tales como subtipo de interneuronas, subtipo de receptores GABA_A y GABA_B, canales iónicos dependientes de voltaje (ej. canales de K⁺).

Determinar la expresión funcional del transportador GAT1 en el giro dentado de animales juveniles con tratamiento postnatal MK-801.

Determinar cómo el tratamiento postnatal con MK-801 modifica la integración sináptica de las entradas de la vía perforante lateral y medial sobre las células granulares del GD y si la activación de los receptores CB1 mejora la fidelidad en la integración sináptica y el filtraje sináptico dependiente de frecuencia de la vía perforante lateral.

Evaluar la discriminación no espacial en animales tratados postnatalmente con MK-801.

Determinar si la activación de los receptores CB1 mejora la discriminación y la memoria espacial en animales tratados postnatalmente con MK-801.

Evaluar si el incremento de la inhibición tónica mediante la activación de receptores extrasinápticos GABA_Aα5 mejora el funcionamiento cognitivo en animales tratados postnatalmente con MK-801.

10. REFERENCIAS

- Antonakou, E.I. & Triarhou, L.C. (2020) Through neuronal avalanches to consciousness: Conjectures and elaborations. *J. Chem. Neuroanat.*, **104**, 101741.
- Balu, D.T. & Coyle, J.T. (2015) The NMDA receptor ‘glycine modulatory site’ in schizophrenia: d-serine, glycine, and beyond. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **20**, 109–115.
- Belzung, C. & Lemoine, M. (2011) Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol. Mood Anxiety Disord.*, **1**, 1–14.
- Ben-Shaul, Y. (2017) OptiMouse: A comprehensive open source program for reliable detection and analysis of mouse body and nose positions. *BMC Biol.*, **15**, 1–22.
- Blaise, J.H. & Bronzino, J.D. (2003) Effects of stimulus frequency and age on bidirectional synaptic plasticity in the dentate gyrus of freely moving rats. *Exp. Neurol.*, **182**, 497–506.
- Bora, E. & Murray, R.M. (2014) Meta-analysis of Cognitive Deficits in Ultra-high Risk to Psychosis and First-Episode Psychosis: Do the Cognitive Deficits Progress Over, or After, the Onset of Psychosis? *Schizophr. Bull.*, **40**, 744–755.
- Brown, A.S. (2012) Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Dev. Neurobiol.*, **72**, 1272–1276.
- Brown, A.S. & Derkits, E.J. (2010) Prenatal infection and schizophrenia: A review of epidemiologic and translational studies. *Am. J. Psychiatry*, **167**, 261–280.
- Cayco-Gajic, N.A. & Silver, R.A. (2019) Re-evaluating Circuit Mechanisms Underlying Pattern Separation. *Neuron*, **101**, 584–602.
- Claiborne, B.J., Xiang, Z., & Brown, T.H. (1993) Hippocampal circuitry complicates analysis of long-term potentiation in mossy fiber synapses. *Hippocampus*, **3**, 115–121.
- Clancy, B., Darlington, R.B., & Finlay, B.L. (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*, **105**, 7–17.
- Cogné, M., Taillade, M., N’Kaoua, B., Tarruella, A., Klinger, E., Larrue, F., Sauzéron, H., Joseph, P.A., & Sorita, E. (2017) The contribution of virtual reality to the diagnosis of spatial navigation disorders and to the study of the role of navigational aids: A systematic literature review. *Ann. Phys. Rehabil. Med.*, **60**, 164–176.
- Colino, A. & Malenka, R.C. (1993) Mechanisms underlying induction of long-term potentiation in rat medial and lateral perforant paths in vitro. *J. Neurophysiol.*, **69**, 1150–1159.
- Cronenwett, W.J. (2016) Schizophrenia Pharmacology: Past, Present, and Future Targets for Intervention. *Focus*, **14**, 308–314.
- Davis, C.D., Jones, F.L., & Derrick, B.E. (2004) Novel Environments Enhance the Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in the Dentate Gyrus. *J.*

Neurosci., **24**, 6497–6506.

- Debanne, D., Inglebert, Y., & Russier, M. (2019) Plasticity of intrinsic neuronal excitability. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **54**, 73–82.
- Deng, W., Aimone, J.B., & Gage, F.H. (2010) New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**, 339–350.
- Deng, W., Mayford, M., & Gage, F.H. (2013) Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice. *Elife*, **2013**, e00312.
- Deshmukh, S.S., Yoganarasimha, D., Voicu, H., & Knierim, J.J. (2010) Theta Modulation in the Medial and the Lateral Entorhinal Cortices. *J. Neurophysiol.*, **104**, 994–1006.
- Du, H., Kwon, I.K., & Kim, J. (2013) Neuregulin-1 Impairs the Long-term Depression of Hippocampal Inhibitory Synapses by Facilitating the Degradation of Endocannabinoid 2-AG. *J. Neurosci.*, **33**, 15022–15031.
- Egaña-Huguet, J., Saumell-Esnaola, M., Achicallende, S., Soria-Gomez, E., Bonilla-Del Río, I., García del Caño, G., Barrondo, S., Sallés, J., Gerrikagoitia, I., Puente, N., Elezgarai, I., & Grandes, P. (2021) Lack of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Shifts Cannabinoid-Dependent Excitatory Synaptic Plasticity in the Dentate Gyrus of the Mouse Brain Hippocampus. *Front. Neuroanat.*, **15**, 701573.
- Egbujo, C.N., Sinclair, D., & Hahn, C.G. (2016) Dysregulations of Synaptic Vesicle Trafficking in Schizophrenia. *Curr. Psychiatry Rep.*, **18**, 1–10.
- Eichenbaum, H. (2017) The role of the hippocampus in navigation is memory. *J. Neurophysiol.*, **117**, 1785–1796.
- Elgueta, C. & Bartos, M. (2019) Dendritic inhibition differentially regulates excitability of dentate gyrus parvalbumin-expressing interneurons and granule cells. *Nat. Commun.* **2019 101**, **10**, 1–15.
- Engin, E., Zarnowska, E.D., Benke, D., Tsvetkov, E., Sigal, M., Keist, R., Bolshakov, V.Y., Pearce, R.A., & Rudolph, U. (2015) Tonic Inhibitory Control of Dentate Gyrus Granule Cells by $\alpha 5$ -Containing GABAA Receptors Reduces Memory Interference. *J. Neurosci.*, **35**, 13698–13712.
- Erhardt, S., Schwieler, L., Imbeault, S., & Engberg, G. (2017) The kynurenine pathway in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology*, **112**, 297–306.
- Estes, M.L. & McAllister, A.K. (2016) Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science (80-.)*, **353**, 772–777.
- Ewell, L.A. & Jones, M. V. (2010) Frequency-Tuned Distribution of Inhibition in the Dentate Gyrus. *J. Neurosci.*, **30**, 12597–12607.
- Faghihi, F. & Moustafa, A.A. (2015) A computational model of pattern separation efficiency in the dentate gyrus with implications in schizophrenia. *Front. Syst. Neurosci.*, **9**, 132405.

- Farrant, M. & Nusser, Z. (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABAA receptors. *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 215–229.
- Fatemi, S.H. & Folsom, T.D. (2009) The neurodevelopmental hypothesis of Schizophrenia, revisited. *Schizophr. Bull.*,.
- Fernández-Ruiz, A., Oliva, A., Soula, M., Rocha-Almeida, F., Nagy, G.A., Martín-Vazquez, G., & Buzsáki, G. (2021) Gamma rhythm communication between entorhinal cortex and dentate gyrus neuronal assemblies. *Science (80-.)*, **372**.
- Fioravante, D. & Regehr, W.G. (2011) Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **21**, 269–274.
- Folley, B.S., Astur, R., Jagannathan, K., Calhoun, V.D., & Pearlson, G.D. (2010) Anomalous neural circuit function in schizophrenia during a virtual Morris water task. *Neuroimage*, **49**, 3373–3384.
- Fontaine, C.J., Gräfe, E.L., Pinar, C., Bonilla-Del Río, I., Grandes, P., & Christie, B.R. (2020) Endocannabinoid receptors contribute significantly to multiple forms of long-term depression in the rat dentate gyrus. *Learn. Mem.*, **27**, 380–389.
- Forsyth, J.K. & Lewis, D.A. (2017) Mapping the Consequences of Impaired Synaptic Plasticity in Schizophrenia through Development: An Integrative Model for Diverse Clinical Features. *Trends Cogn. Sci.*,.
- Frankle, W.G., Cho, R.Y., Prasad, K.M., Mason, N.S., Paris, J., Himes, M.L., Walker, C., Lewis, D.A., & Narendran, R. (2015) In Vivo Measurement of GABA Transmission in Healthy Subjects and Schizophrenia Patients. *Am. J. Psychiatry*, **172**, 1148–1159.
- Furuie, H., Yamada, K., & Ishitani, Y. (2019) Differential effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade during the second and third postnatal weeks on spatial working and reference memory in adult rats - ScienceDirect. *Brain Res.*, **1721**, 146339.
- Gawel, K., Gibula, E., Marszalek-Grabska, M., Filarowska, J., & Kotlinska, J.H. (2019) Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, **392**, 1–18.
- Geoffroy, C., Paoletti, P., & Mony, L. (2022) Positive allosteric modulation of NMDA receptors: mechanisms, physiological impact and therapeutic potential. *J. Physiol.*, **600**, 233–259.
- Gloveli, T., Schmitz, D., Empson, R.M., & Heinemann, U. (1997) Frequency-dependent information flow from the entorhinal cortex to the hippocampus. *J. Neurophysiol.*, **78**, 3444–3449.
- Gonzalez, J., Morales, I.S., Villarreal, D.M., & Derrick, B.E. (2014) Low-frequency stimulation induces long-term depression and slow onset long-term potentiation at perforant path-dentate gyrus synapses in vivo. *J. Neurophysiol.*, **111**, 1259–1273.
- Griego, E., Hernández-Frausto, M., Márquez, L.A., Lara-Valderrabano, L., López Rubalcava, C., & Galván, E.J. (2022) Activation of D1/D5 receptors ameliorates decreased intrinsic excitability of hippocampal neurons induced by neonatal blockade

- of N-methyl-d-aspartate receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **179**, 1695–1715.
- Guerrin, C.G.J., Doorduyn, J., Sommer, I.E., & de Vries, E.F.J. (2021) The dual hit hypothesis of schizophrenia: Evidence from animal models. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **131**, 1150–1168.
- Guzman, S.J., Schlögl, A., Espinoza, C., Zhang, X., Suter, B.A., & Jonas, P. (2021) How connectivity rules and synaptic properties shape the efficacy of pattern separation in the entorhinal cortex–dentate gyrus–CA3 network. *Nat. Comput. Sci.*, **1**, 830–842.
- Hainmueller, T. & Bartos, M. (2020) Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nat. Rev. Neurosci.*, **21**, 153–168.
- Hanse, E. & Gustafsson, B. (1992) Long-term Potentiation and Field EPSPs in the Lateral and Medial Perforant Paths in the Dentate Gyrus In Vitro: a Comparison. *Eur. J. Neurosci.*, **4**, 1191–1201.
- Harris, E.W. & Cotman, C.W. (1986) Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl d-aspartate antagonists. *Neurosci. Lett.*, **70**, 132–137.
- Hashem, J., Hu, M., Zhang, J., Gao, F., & Chen, C. (2021) Inhibition of 2-Arachidonoylglycerol Metabolism Alleviates Neuropathology and Improves Cognitive Function in a Tau Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Mol. Neurobiol.*, **58**, 4122–4133.
- Hernández-Frausto, M., López-Rubalcava, C., & Galván, E.J. (2019) Progressive Alterations in Synaptic Transmission and Plasticity of Area CA1 Precede the Cognitive Impairment Associated with Neonatal Administration of MK-801. *Neuroscience*, **404**, 205–217.
- Hollmann, M., O’Shea-Greenfield, A., Rogers, S.W., & Heinemann, S. (1989) Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature*, **342**, 643–648.
- Houser, C.R. (2007) Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. In Scharfman, H.E. (ed), *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 217–811.
- Huang, H., Liu, C.M., Sun, J., Hao, T., Xu, C.M., Wang, D., & Wu, Y.Q. (2016) Ketamine Affects the Neurogenesis of the Hippocampal Dentate Gyrus in 7-Day-Old Rats. *Neurotox. Res.*, **30**, 185–198.
- Hunsaker, M.R., Mooy, G.G., Swift, J.S., & Kesner, R.P. (2007) Dissociations of the Medial and Lateral Perforant Path Projections Into Dorsal DG, CA3, and CA1 for Spatial and Nonspatial (Visual Object) Information Processing. *Behav. Neurosci.*, **121**, 742–750.
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovskaja, V., Turski, L., & Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science (80-)*, **283**, 70–74.

- İmamoğlu, A., Wahlheim, C.N., Belger, A., & S. Giovanello, K. (2023) Impaired mnemonic discrimination in children and adolescents at risk for schizophrenia. *Schizophrenia*, **9**, 1–8.
- Insel, T.R. (2010) Rethinking schizophrenia. *Nature*,.
- Ismail, V., Zachariassen, L.G., Godwin, A., Sahakian, M., Ellard, S., Stals, K.L., Baple, E., Brown, K.T., Foulds, N., Wheway, G., Parker, M.O., Lyngby, S.M., Pedersen, M.G., Desir, J., Bayat, A., Musgaard, M., Guille, M., Kristensen, A.S., & Baralle, D. (2022) Identification and functional evaluation of GRIA1 missense and truncation variants in individuals with ID: An emerging neurodevelopmental syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, **109**, 1217–1241.
- Jedlicka, P., Muellerleile, J., & Schwarzacher, S.W. (2018) Synaptic Plasticity and Excitation-Inhibition Balance in the Dentate Gyrus: Insights from in Vivo Recordings in Neuroligin-1, Neuroligin-2, and Collybistin Knockouts. *Neural Plast.*, **2018**.
- Jeevakumar, V., Driskill, C., Paine, A., Sobhanian, M., Vakil, H., Morris, B., Ramos, J., & Kroener, S. (2015) Ketamine administration during the second postnatal week induces enduring schizophrenia-like behavioral symptoms and reduces parvalbumin expression in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Behav. Brain Res.*, **282**, 165–175.
- Josselyn, S.A., Köhler, S., & Frankland, P.W. (2015) Finding the engram. *Nat. Rev. Neurosci.*, **16**, 521–534.
- Kaminitz, A., Barzilay, R., Segal, H., Taler, M., Offen, D., Gil-Ad, I., Mechoulam, R., & Weizman, A. (2014) Dominant negative DISC1 mutant mice display specific social behaviour deficits and aberration in BDNF and cannabinoid receptor expression. *World J. Biol. Psychiatry*, **15**, 76–82.
- Kaya, M.C., Bulut, M., Kaplan, İ., & Gunes, M. (2019) Levels of endocannabinoid metabolizing enzymes are not related with BDNF levels in patients with schizophrenia: a case-controlled study. *Psychiatry Clin. Psychopharmacol.*, **29**, 441–445.
- Kemp, A. & Manahan-Vaughan, D. (2008) The Hippocampal CA1 Region and Dentate Gyrus Differentiate between Environmental and Spatial Feature Encoding through Long-Term Depression. *Cereb. Cortex*, **18**, 968–977.
- Kim, W. Bin & Cho, J.H. (2017) Encoding of Discriminative Fear Memory by Input-Specific LTP in the Amygdala. *Neuron*, **95**, 1129-1146.e5.
- Kjaerby, C., Broberg, B. V., Kristiansen, U., & Dalby, N.O. (2014) Impaired GABAergic Inhibition in the Prefrontal Cortex of Early Postnatal Phencyclidine (PCP)-Treated Rats. *Cereb. Cortex*, **24**, 2522–2532.
- Kjaerby, C., Hovelsø, N., Dalby, N.O., & Sotty, F. (2017) Phencyclidine administration during neurodevelopment alters network activity in prefrontal cortex and hippocampus in adult rats. *J. Neurophysiol.*, **118**, 1002–1011.
- Konradi, C., Yang, C.K., Zimmerman, E.I., Lohmann, K.M., Gresch, P., Pantazopoulos, H.,

- Berretta, S., & Heckers, S. (2011) Hippocampal interneurons are abnormal in schizophrenia. *Schizophr. Res.*, **131**, 165–173.
- Kraguljac, N.V., Carle, M., Frölich, M.A., Tran, S., Yassa, M.A., White, D.M., Reddy, A., & Lahti, A.C. (2021) Mnemonic Discrimination Deficits in First-Episode Psychosis and a Ketamine Model Suggest Dentate Gyrus Pathology Linked to NMDA Receptor Hypofunction. *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging*, **6**, 1185–1192.
- Krueppel, R., Remy, S., & Beck, H. (2011) Dendritic Integration in Hippocampal Dentate Granule Cells. *Neuron*, **71**, 512–528.
- Larson, J. & Munkácsy, E. (2015) Theta-burst LTP. *Brain Res.*, **1621**, 38–50.
- Lee, C.T., Kao, M.H., Hou, W.H., Wei, Y.T., Chen, C.L., & Lien, C.C. (2016) Causal Evidence for the Role of Specific GABAergic Interneuron Types in Entorhinal Recruitment of Dentate Granule Cells. *Sci. Rep.*, **6**, 1–13.
- Lee, G. & Zhou, Y. (2019) NMDAR Hypofunction Animal Models of Schizophrenia. *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, 185.
- Leutgeb, J.K., Leutgeb, S., Moser, M.B., & Moser, E.I. (2007) Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science (80-)*, **315**, 961–966.
- Lewis, D.A. & Sweet, R.A. (2009) Schizophrenia from a neural circuitry perspective: advancing toward rational pharmacological therapies. *J. Clin. Invest.*, **119**, 716.
- Li, J.T., Zhao, Y.Y., Wang, H.L., Wang, X.D., Su, Y.A., & Si, T.M. (2015) Long-term effects of neonatal exposure to MK-801 on recognition memory and excitatory-inhibitory balance in rat hippocampus. *Neuroscience*, **308**, 134–143.
- Lopez-Rojas, J., Heine, M., & Kreutz, M.R. (2016) Plasticity of intrinsic excitability in mature granule cells of the dentate gyrus. *Sci. Rep.*, **6**, 21615.
- Macek, T.A., Winder, D.G., Gereau IV, R.W., Ladd, C.O., & Conn, P.J. (1996) Differential involvement of group II and group III mGluRs as autoreceptors at lateral and medial perforant path synapses. *J. Neurophysiol.*, **76**, 3798–3806.
- Madar, A.D., Ewell, L.A., & Jones, M. V. (2019) Temporal pattern separation in hippocampal neurons through multiplexed neural codes. *PLOS Comput. Biol.*, **15**, e1006932.
- Maher, B.J. & LoTurco, J.J. (2012) Disrupted-in-Schizophrenia (DISC1) Functions Presynaptically at Glutamatergic Synapses. *PLoS One*, **7**, e34053.
- Maia, T. V. & Frank, M.J. (2017) An Integrative Perspective on the Role of Dopamine in Schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, **81**, 52–66.
- Manahan-Vaughan, D. & Braunewell, K.H. (1999) Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 8739–8744.
- Márquez, L.A., Griego, E., López Rubalcava, C., & Galván, E.J. (2023) NMDA receptor activity during postnatal development determines intrinsic excitability and mossy fiber

- long-term potentiation of CA3 pyramidal cells. *Hippocampus*, **33**, 906–921.
- McCutcheon, R.A., Keefe, R.S.E., & McGuire, P.K. (2023) Cognitive impairment in schizophrenia: aetiology, pathophysiology, and treatment. *Mol. Psychiatry*, **28**, 1902–1918.
- McCutcheon, R.A., Krystal, J.H., & Howes, O.D. (2020) Dopamine and glutamate in schizophrenia: biology, symptoms and treatment. *World Psychiatry*, **19**, 15–33.
- Milenkovic, M., Mielnik, C.A., & Ramsey, A.J. (2014) NMDA receptor-deficient mice display sexual dimorphism in the onset and severity of behavioural abnormalities. *Genes, Brain Behav.*, **13**, 850–862.
- Miller, B.J., Buckley, P., Seabolt, W., Mellor, A., & Kirkpatrick, B. (2011) Meta-Analysis of Cytokine Alterations in Schizophrenia: Clinical Status and Antipsychotic Effects. *Biol. Psychiatry*, **70**, 663–671.
- Morales, C., Morici, J.F., Espinosa, N., Sacson, A., Lara-Vasquez, A., Garcíá-Pérez, M.A., Bekinschtein, P., Weisstaub, N. V., & Fuentealba, P. (2021) Dentate Gyrus Somatostatin Cells are Required for Contextual Discrimination During Episodic Memory Encoding. *Cereb. Cortex*, **31**, 1046–1059.
- Murray, R.M., Bhavsar, V., Tripoli, G., & Howes, O. (2017) 30 Years on: How the Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia Morphed Into the Developmental Risk Factor Model of Psychosis. *Schizophr. Bull.*, **43**, 1190–1196.
- Murueta-Goyena, A., Ortuzar, N., Gargiulo, P.Á., Lafuente, J.V., & Bengoetxea, H. (2018) Short-term exposure to enriched environment in adult rats restores MK-801-induced cognitive deficits and gabaergic interneuron immunoreactivity loss. *Mol. Neurobiol.*, **55**, 26–41.
- Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C.D., Lin, J.Y., Tsien, R.Y., & Malinow, R. (2014) Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*, **511**, 348–352.
- Nakahara, S., Turner, J.A., Calhoun, V.D., Lim, K.O., Mueller, B., Bustillo, J.R., O’Leary, D.S., McEwen, S., Voyvodic, J., Belger, A., Mathalon, D.H., Ford, J.M., Macciardi, F., Matsumoto, M., Potkin, S.G., & Van Erp, T.G.M. (2020) Dentate gyrus volume deficit in schizophrenia. *Psychol. Med.*, **50**, 1267–1277.
- Nakao, K., Jeevakumar, V., Jiang, S.Z., Fujita, Y., Diaz, N.B., Annan, C.A.P., Jaunaraajs, K.L.E., Hashimoto, K., Belforte, J.E., & Nakazawa, K. (2019) Schizophrenia-Like Dopamine Release Abnormalities in a Mouse Model of NMDA Receptor Hypofunction. *Schizophr. Bull.*, **45**, 138–147.
- Nakazawa, K. & Sapkota, K. (2020) The origin of NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Pharmacol. Ther.*, **205**, 107426.
- Nielsen, R.E., Levander, S., Kjaersdam Telléus, G., Jensen, S.O.W., Østergaard Christensen, T., & Leucht, S. (2015) Second-generation antipsychotic effect on cognition in patients with schizophrenia—a meta-analysis of randomized clinical trials. *Acta Psychiatr. Scand.*, **131**, 185–196.

- Nozari, M., Shabani, M., Hadadi, M., & Atapour, N. (2014) Enriched environment prevents cognitive and motor deficits associated with postnatal MK-801 treatment. *Psychopharmacology (Berl.)*, **231**, 4361–4370.
- O’Connell, A.W., Fox, G.B., Kjoller, C., Gallagher, H.C., Murphy, K.J., Kelly, J., & Regan, C.M. (2001) Anti-ischemic and cognition-enhancing properties of NNC-711, a γ -aminobutyric acid reuptake inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.*, **424**, 37–44.
- O’Connor, M., Harris, J.M., McIntosh, A.M., Owens, D.G.C., Lawrie, S.M., & Johnstone, E.C. (2009) Specific cognitive deficits in a group at genetic high risk of schizophrenia. *Psychol. Med.*, **39**, 1649–1655.
- Osborne, A.L., Solowij, N., Babic, I., Lum, J.S., Newell, K.A., Huang, X.F., & Weston-Green, K. (2019) Effect of cannabidiol on endocannabinoid, glutamatergic and GABAergic signalling markers in male offspring of a maternal immune activation (poly I:C) model relevant to schizophrenia. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, **95**, 109666.
- Oulé, M., Atucha, E., Wells, T.M., Macharadze, T., Sauvage, M.M., Kreutz, M.R., & Lopez-Rojas, J. (2021) Dendritic Kv4.2 potassium channels selectively mediate spatial pattern separation in the dentate gyrus. *iScience*, **24**, 102876.
- Owen, M.J., Sawa, A., & Mortensen, P.B. (2016) Schizophrenia. *Lancet*.
- Pagano, J., Giona, F., Beretta, S., Verpelli, C., & Sala, C. (2021) N-methyl-d-aspartate receptor function in neuronal and synaptic development and signaling. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **56**, 93–101.
- Peñasco, S., Rico-Barrio, I., Puente, N., Fontaine, C.J., Ramos, A., Reguero, L., Gerrikagoitia, I., de Fonseca, F.R., Suarez, J., Barrondo, S., Aretxabala, X., García Del Caño, G., Sallés, J., Elezgarai, I., Nahirney, P.C., Christie, B.R., & Grandes, P. (2020) Intermittent ethanol exposure during adolescence impairs cannabinoid type 1 receptor-dependent long-term depression and recognition memory in adult mice. *Neuropsychopharmacology*, **45**, 309–318.
- Peñasco, S., Rico-Barrio, I., Puente, N., Gómez-Urquijo, S.M., Fontaine, C.J., Egaña-Huguet, J., Achicallende, S., Ramos, A., Reguero, L., Elezgarai, I., Nahirney, P.C., Christie, B.R., & Grandes, P. (2019) Endocannabinoid long-term depression revealed at medial perforant path excitatory synapses in the dentate gyrus. *Neuropharmacology*, **153**, 32–40.
- Petersen, R.P., Moradpour, F., Eadie, B.D., Shin, J.D., Kannangara, T.S., Delaney, K.R., & Christie, B.R. (2013) Electrophysiological identification of medial and lateral perforant path inputs to the dentate gyrus. *Neuroscience*, **252**, 154–168.
- Pinzón-Parra, C.A., Coatl-Cuaya, H., Díaz, A., Guevara, J., Rodríguez-Moreno, A., & Flores, G. (2022) Long-term effect of neonatal antagonism of ionotropic glutamate receptors on dendritic spines and cognitive function in rats. *J. Chem. Neuroanat.*, **119**, 102054.
- Rideau Batista Novais, A., Crouzin, N., Cavalier, M., Boubal, M., Guiramand, J., Cohen-

Solal, C., de Jesus Ferreira, M.-C., Cambonie, G., Vignes, M., & Barbanel, G. (2014) Tiagabine Improves Hippocampal Long-Term Depression in Rat Pups Subjected to Prenatal Inflammation. *PLoS One*, **9**, e106302.

Ripke, S., Neale, B.M., Corvin, A., Walters, J.T.R., Farh, K.H., Holmans, P.A., Lee, P., Bulik-Sullivan, B., Collier, D.A., Huang, H., Pers, T.H., Agartz, I., Agerbo, E., Albus, M., Alexander, M., Amin, F., Bacanu, S.A., Begemann, M., Belliveau, R.A., Bene, J., Bergen, S.E., Bevilacqua, E., Bigdeli, T.B., Black, D.W., Bruggeman, R., Buccola, N.G., Buckner, R.L., Byerley, W., Cahn, W., Cai, G., Champion, D., Cantor, R.M., Carr, V.J., Carrera, N., Catts, S. V., Chambert, K.D., Chan, R.C.K., Chen, R.Y.L., Chen, E.Y.H., Cheng, W., Cheung, E.F.C., Chong, S.A., Cloninger, C.R., Cohen, D., Cohen, N., Cormican, P., Craddock, N., Crowley, J.J., Curtis, D., Davidson, M., Davis, K.L., Degenhardt, F., Del Favero, J., Demontis, D., Dikeos, D., Dinan, T., Djurovic, S., Donohoe, G., Drapeau, E., Duan, J., Dudbridge, F., Durmishi, N., Eichhammer, P., Eriksson, J., Escott-Price, V., Essioux, L., Fanous, A.H., Farrell, M.S., Frank, J., Franke, L., Freedman, R., Freimer, N.B., Friedl, M., Friedman, J.I., Fromer, M., Genovese, G., Georgieva, L., Giegling, I., Giusti-Rodríguez, P., Godard, S., Goldstein, J.I., Golimbet, V., Gopal, S., Gratten, J., De Haan, L., Hammer, C., Hamshere, M.L., Hansen, M., Hansen, T., Haroutunian, V., Hartmann, A.M., Henskens, F.A., Herms, S., Hirschhorn, J.N., Hoffmann, P., Hofman, A., Hollegaard, M. V., Hougaard, D.M., Ikeda, M., Joa, I., Julià, A., Kahn, R.S., Kalaydjieva, L., Karachanak-Yankova, S., Karjalainen, J., Kavanagh, D., Keller, M.C., Kennedy, J.L., Khrunin, A., Kim, Y., Klovins, J., Knowles, J.A., Konte, B., Kucinskas, V., Kucinskiene, Z.A., Kuzelova-Ptackova, H., Kähler, A.K., Laurent, C., Keong, J.L.C., Lee, S.H., Legge, S.E., Lerer, B., Li, M., Li, T., Liang, K.Y., Lieberman, J., Limborska, S., Loughland, C.M., Lubinski, J., Lönnqvist, J., Macek, M., Magnusson, P.K.E., Maher, B.S., Maier, W., Mallet, J., Marsal, S., Mattheisen, M., Mattingsdal, M., McCarley, R.W., McDonald, C., McIntosh, A.M., Meier, S., Meijer, C.J., Melegh, B., Melle, I., Meshulam-Gately, R.I., Metspalu, A., Michie, P.T., Milani, L., Milanova, V., Mokrab, Y., Morris, D.W., Mors, O., Murphy, K.C., Murray, R.M., Myin-Germeys, I., Müller-Myhsok, B., Nelis, M., Nenadic, I., Nertney, D.A., Nestadt, G., Nicodemus, K.K., Nikitina-Zake, L., Nisenbaum, L., Nordin, A., O’Callaghan, E., O’Dushlaine, C., O’Neill, F.A., Oh, S.Y., Olincy, A., Olsen, L., Van Os, J., Pantelis, C., Papadimitriou, G.N., Papiol, S., Parkhomenko, E., Pato, M.T., Paunio, T., Pejovic-Milovancevic, M., Perkins, D.O., Pietiläinen, O., Pimm, J., Pocklington, A.J., Powell, J., Price, A., Pulver, A.E., Purcell, S.M., Queded, D., Rasmussen, H.B., Reichenberg, A., Reimers, M.A., Richards, A.L., Roffman, J.L., Roussos, P., Ruderfer, D.M., Salomaa, V., Sanders, A.R., Schall, U., Schubert, C.R., Schulze, T.G., Schwab, S.G., Scolnick, E.M., Scott, R.J., Seidman, L.J., Shi, J., Sigurdsson, E., Silagadze, T., Silverman, J.M., Sim, K., Slominsky, P., Smoller, J.W., So, H.C., Spencer, C.C.A., Stahl, E.A., Stefansson, H., Steinberg, S., Stogmann, E., Straub, R.E., Strengman, E., Strohmaier, J., Stroup, T.S., Subramaniam, M., Suvisaari, J., Svrakic, D.M., Szatkiewicz, J.P., Söderman, E., Thirumalai, S., Toncheva, D., Tosato, S., Veijola, J., Waddington, J., Walsh, D., Wang, D., Wang, Q., Webb, B.T., Weiser, M., Wildenauer, D.B., Williams, N.M., Williams, S., Witt, S.H., Wolen, A.R., Wong, E.H.M., Wormley, B.K., Xi, H.S., Zai, C.C., Zheng, X., Zimprich, F., Wray, N.R., Stefansson, K., Visscher, P.M., Adolfsson, R., Andreassen, O.A., Blackwood, D.H.R.,

- Bramon, E., Buxbaum, J.D., Børglum, A.D., Cichon, S., Darvasi, A., Domenici, E., Ehrenreich, H., Esko, T., Gejman, P. V., Gill, M., Gurling, H., Hultman, C.M., Iwata, N., Jablensky, A. V., Jönsson, E.G., Kendler, K.S., Kirov, G., Knight, J., Lencz, T., Levinson, D.F., Li, Q.S., Liu, J., Malhotra, A.K., McCarroll, S.A., McQuillin, A., Moran, J.L., Mortensen, P.B., Mowry, B.J., Nöthen, M.M., Ophoff, R.A., Owen, M.J., Palotie, A., Pato, C.N., Petryshen, T.L., Posthuma, D., Rietschel, M., Riley, B.P., Rujescu, D., Sham, P.C., Sklar, P., St Clair, D., Weinberger, D.R., Wendland, J.R., Werge, T., Daly, M.J., Sullivan, P.F., & O'Donovan, M.C. (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, **511**, 421–427.
- Saab, B.J., Georgiou, J., Nath, A., Lee, F.J.S., Wang, M., Michalon, A., Liu, F., Mansuy, I.M., & Roder, J.C. (2009) NCS-1 in the Dentate Gyrus Promotes Exploration, Synaptic Plasticity, and Rapid Acquisition of Spatial Memory. *Neuron*, **63**, 643–656.
- Saggu, S., Cannon, T.D., Jentsch, J.D., & Lavin, A. (2013) Potential molecular mechanisms for decreased synaptic glutamate release in dysbindin-1 mutant mice. *Schizophr. Res.*, **146**, 254–263.
- Sahakyan, L., Wahlheim, C.N., & Kwapil, T.R. (2023) Mnemonic discrimination deficits in multidimensional schizotypy. *Hippocampus*, **33**, 1139–1153.
- Sałat, K., Podkowa, A., Mogilski, S., Zaręba, P., Kulig, K., Sałat, R., Malikowska, N., & Filipek, B. (2015) The effect of GABA transporter 1 (GAT1) inhibitor, tiagabine, on scopolamine-induced memory impairments in mice. *Pharmacol. Reports*, **67**, 1155–1162.
- Santoro, A. (2013) Reassessing pattern separation in the dentate gyrus. *Front. Behav. Neurosci.*, **7**, 59930.
- Schmidt-Hieber, C., Jones, P., & Bischofberger, J. (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nat. 2004 4296988*, **429**, 184–187.
- Schmidt, M.J. & Mirnics, K. (2014) Neurodevelopment , GABA System Dysfunction , and Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 1–17.
- Schmitt, U. & Hiemke, C. (2002) Tiagabine, a γ -amino-butyric acid transporter inhibitor impairs spatial learning of rats in the Morris water-maze. *Behav. Brain Res.*, **133**, 391–394.
- Schreurs, A., Sabanov, V., & Balschun, D. (2017) Distinct Properties of Long-Term Potentiation in the Dentate Gyrus along the Dorsoventral Axis: Influence of Age and Inhibition. *Sci. Reports 2017 71*, **7**, 1–10.
- Schwieler, L., Larsson, M.K., Skogh, E., Kegel, M.E., Orhan, F., Abdelmoaty, S., Finn, A., Bhat, M., Samuelsson, M., Lundberg, K., Dahl, M.L., Sellgren, C., Schuppe-Koistinen, I., Svensson, C.I., Erhardt, S., & Engberg, G. (2015) Increased levels of IL-6 in the cerebrospinal fluid of patients with chronic schizophrenia — significance for activation of the kynurenine pathway. *J. Psychiatry Neurosci.*, **40**, 126–133.
- Segev, A., Yanagi, M., Scott, D., Southcott, S.A., Lister, J.M., Tan, C., Li, W., Birnbaum,

- S.G., Kourrich, S., & Tamminga, C.A. (2020) Reduced GluN1 in mouse dentate gyrus is associated with CA3 hyperactivity and psychosis-like behaviors. *Mol. Psychiatry*, **25**, 2832–2843.
- Seshadri, S., Klaus, A., Winkowski, D.E., Kanold, P.O., & Plenz, D. (2018) Altered avalanche dynamics in a developmental NMDAR hypofunction model of cognitive impairment. *Transl. Psychiatry* 2017 *81*, **8**, 1–12.
- Shaw, A.D., Knight, L., Freeman, T.C.A., Williams, G.M., Moran, R.J., Friston, K.J., Walters, J.T.R., & Singh, K.D. (2020) Oscillatory, Computational, and Behavioral Evidence for Impaired GABAergic Inhibition in Schizophrenia. *Schizophr. Bull.*, **46**, 345–353.
- Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P.J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S., & Mizuno, N. (1997) Differential Presynaptic Localization of Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes in the Rat Hippocampus. *J. Neurosci.*, **17**, 7503–7522.
- Siafis, S., Wu, H., Wang, D., Burschinski, A., Nomura, N., Takeuchi, H., Schneider-Thoma, J., Davis, J.M., & Leucht, S. (2023) Antipsychotic dose, dopamine D2 receptor occupancy and extrapyramidal side-effects: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Mol. Psychiatry*, **28**, 3267–3277.
- Sim, K., DeWitt, I., Ditman, T., Zalesak, M., Greenhouse, I., Goff, D., Weiss, A.P., & Heckers, S. (2006) Hippocampal and Parahippocampal Volumes in Schizophrenia: A Structural MRI Study. *Schizophr. Bull.*, **32**, 332–340.
- Sloviter, R.S. (1991) Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability In Vivo. *Hippocampus*, **1**, 31–40.
- Snyder, M.A. & Gao, W.J. (2013) NMDA hypofunction as a convergence point for progression and symptoms of schizophrenia. *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 1–12.
- Snyder, M.A. & Gao, W.J. (2020) NMDA receptor hypofunction for schizophrenia revisited: Perspectives from epigenetic mechanisms. *Schizophr. Res.*, **217**, 60–70.
- Song, I., Volynski, K., Brenner, T., Ushkaryov, Y., Walker, M., & Semyanov, A. (2013) Different transporter systems regulate extracellular GABA from vesicular and non-vesicular sources. *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 23.
- Stacho, M. & Manahan-Vaughan, D. (2022) The Intriguing Contribution of Hippocampal Long-Term Depression to Spatial Learning and Long-Term Memory. *Front. Behav. Neurosci.*, **16**, 806356.
- Szűcs, E., Dvorácskó, S., Tömböly, C., Büki, A., Kékesi, G., Horváth, G., & Benyhe, S. (2016) Decreased CB receptor binding and cannabinoid signaling in three brain regions of a rat model of schizophrenia. *Neurosci. Lett.*, **633**, 87–93.
- Tamminga, C.A., Stan, A.D., & Wagner, A.D. (2010) The hippocampal formation in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, **167**, 1178–1193.

- 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. *Curr. Biol.*, **23**, 99–106.
- Titiz, A.S., Hill, M.R.H., Mankin, E.A., Aghajani, Z.M., Eliashiv, D., Tchemodanov, N., Maoz, U., Stern, J., Tran, M.E., Schuette, P., Behnke, E., Suthana, N.A., & Fried, I. (2017) Theta-burst microstimulation in the human entorhinal area improves memory specificity. *Elife*, **6**, e29515.
- Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D.S., & Ryan, T.J. (2015) Memory engram storage and retrieval. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **35**, 101–109.
- van Goethem, N.P., van Hagen, B.T.J., & Prickaerts, J. (2018) Assessing spatial pattern separation in rodents using the object pattern separation task. *Nat. Protoc.*, **13**, 1763–1792.
- Vinson, P.N. & Conn, P.J. (2012) Metabotropic glutamate receptors as therapeutic targets for schizophrenia. *Neuropharmacology*, **62**, 1461–1472.
- Vyleta, N.P. & Snyder, J.S. (2021) Prolonged development of long-term potentiation at lateral entorhinal cortex synapses onto adult-born neurons. *PLoS One*, **16**, e0253642.
- Wang, C., McInnis, J., Ross-Sanchez, M., Shinnick-Gallagher, P., Wiley, J.L., & Johnson, K.M. (2001) Long-term behavioral and neurodegenerative effects of perinatal phencyclidine administration: implications for schizophrenia. *Neuroscience*, **107**, 535–550.
- Wang, W., Cox, B.M., Jia, Y., Le, A.A., Cox, C.D., Jung, K.M., Hou, B., Piomelli, D., Gall, C.M., & Lynch, G. (2018) Treating a novel plasticity defect rescues episodic memory in Fragile X model mice. *Mol. Psychiatry*, **23**, 1798–1806.
- Wang, W., Jia, Y., Pham, D.T., Palmer, L.C., Jung, K.M., Cox, C.D., Rumbaugh, G., Piomelli, D., Gall, C.M., & Lynch, G. (2018) Atypical Endocannabinoid Signaling Initiates a New Form of Memory-Related Plasticity at a Cortical Input to Hippocampus. *Cereb. Cortex*, **28**, 2253–2266.
- Wang, W., Palmer, L.C., Jia, Y., Pham, D.T., Jung, K.M., Karsten, C.A., Merrill, C.B., Mackie, K., Gall, C.M., Piomelli, D., & Lynch, G. (2016) A primary cortical input to hippocampus expresses a pathway-specific and endocannabinoid-dependent form of long-term potentiation. *eNeuro*, **3**, 10049–10053.
- Wang, Y., Rowan, M.J., & Anwyl, R. (1997) Induction of LTD in the Dentate Gyrus In Vitro Is NMDA Receptor Independent, but Dependent on Ca²⁺ Influx via Low-Voltage-Activated Ca²⁺ Channels and Release of Ca²⁺ From Intracellular Stores. *J. Neurophysiol.*, **77**, 812–825.
- Wang, Z., Song, D., & Berger, T.W. (2002) Contribution of NMDA receptor channels to the expression of LTP in the hippocampal dentate gyrus. *Hippocampus*, **12**, 680–688.
- Weinberger, D.R. (2017) Future of Days Past: Neurodevelopment and Schizophrenia. *Schizophr. Bull.*, **43**, 1164–1168.

- Welsby, P.J., Rowan, M.J., & Anwyl, R. (2009) Intracellular mechanisms underlying the nicotinic enhancement of LTP in the rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.*, **29**, 65–75.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., & Bear, M.F. (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science (80-.)*, **313**, 1093–1097.
- Wigström, H. & Gustafsson, B. (1983) Large long-lasting potentiation in the dentate gyrus in vitro during blockade of inhibition. *Brain Res.*, **275**, 153–158.
- Wilkins, L.K., Girard, T.A., Konishi, K., King, M., Herdman, K.A., King, J., Christensen, B., & Bohbot, V.D. (2013) Selective deficit in spatial memory strategies contrast to intact response strategies in patients with schizophrenia spectrum disorders tested in a virtual navigation task. *Hippocampus*, **23**, 1015–1024.
- Wu, J., Rowan, M.J., & Anwyl, R. (2006) Long-term potentiation is mediated by multiple kinase cascades involving CaMKII or either PKA or p42/44 MAPK in the adult rat dentate gyrus in vitro. *J. Neurophysiol.*, **95**, 3519–3527.
- Xia, F., Richards, B.A., Tran, M.M., Josselyn, S.A., Takehara-Nishiuchi, K., & Frankland, P.W. (2017) Parvalbumin-positive interneurons mediate neocortical-hippocampal interactions that are necessary for memory consolidation. *Elife*, **6**, e27868.
- Yamasue, H., Iwanami, A., Hirayasu, Y., Yamada, H., Abe, O., Kuroki, N., Fukuda, R., Tsujii, K., Aoki, S., Ohtomo, K., Kato, N., & Kasai, K. (2004) Localized volume reduction in prefrontal, temporolimbic, and paralimbic regions in schizophrenia: An MRI parcellation study. *Psychiatry Res. - Neuroimaging*, **131**, 195–207.
- Yassa, M.A. & Stark, C.E.L. (2011) Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci.*, **34**, 515–525.
- Zalutsky, R. & Nicoll, R. (1990) Comparison of Two Forms of Long-Term Potentiation in Single Hippocampal Neurons. *Science (80-.)*, **248**, 1619–1624.