

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Carrera de Ciencias Biológicas.

Instituto de Fisiología Biología Molecular y Neurociencias,
Laboratorio de Neurobiología de la Memoria.

Tesis de Licenciatura

**Memoria en limbo: identificación y
caracterización de un novedoso proceso
de memoria dependiente de la evocación.**

Autor: Santiago Abel Merlo

Director: Dr. Emiliano Merlo

Codirectora: Dra. María Eugenia Pedreira

Buenos Aires, Febrero de 2019

Memoria en limbo: identificación y caracterización de un novedoso proceso de memoria dependiente de la evocación.

Santiago Abel Merlo
Director: Dr. Emiliano Merlo
Codirectora: Dra. María Eugenia Pedreira

Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN:

En el condicionamiento contextual Pavloviano de tipo aversivo, en el cangrejo *Neohelice granulata*, la presentación contingente de un contexto neutro (estímulo condicionado, EC) y un estímulo aversivo (estímulo incondicionado, EI) resulta en la formación de una memoria asociativa de miedo EC-EI. De esta forma, en individuos condicionados, la presentación del EC sólo gatilla la respuesta condicionada (RC) previamente bajo control exclusivo del EI. Una vez consolidada esta memoria, generándose así una memoria de largo término, su persistencia puede ser diferencialmente afectada por la re-exposición al EC en ausencia del EI. Breves re-exposiciones al EC gatillan la reconsolidación de la memoria y la persistencia de la RC, mientras que repetidas re-exposiciones al EC producen una memoria de extinción y la inhibición de la RC. Tanto la reconsolidación como la extinción fueron caracterizadas a nivel molecular, presentando mecanismos específicos para cada proceso en vertebrados e invertebrados. En observaciones recientes, se ha demostrado que estos procesos son mutuamente excluyentes, y que además, una cantidad intermedia de exposición al EC no dispararía ni reconsolidación ni extinción. Este novedoso estado transitorio o limbo ha sido reportado en roedores y humanos, pero aún no existe evidencia del mismo en modelos invertebrados. Es por eso que en esta Tesis, se puso a prueba la hipótesis de que una re-exposición a un número intermedio de ECs fallaría en gatillar tanto la reconsolidación como la extinción de la memoria en el cangrejo. Mis resultados revelan que 1 o 40 presentaciones del EC gatillan el proceso de reconsolidación y dejan la memoria sensible al agente amnésico cicloheximida. Por otro lado, una re-exposición a 80 o 160 ECs deja la memoria original en un estado insensible o limbo, caracterizado por la ausencia de efecto amnésico de la cicloheximida, y es insuficiente para desencadenar el proceso de extinción. Finalmente, 320 presentaciones del EC producen la adquisición de una memoria de extinción. Además, las condiciones para desencadenar reconsolidación, limbo o extinción de la memoria son dependientes de la fuerza de la traza mnésica. Mientras que en una memoria adquirida por un entrenamiento estándar una re-exposición de 80 ECs lleva a un estado limbo de la memoria, en una memoria más fuerte la misma re-exposición produce reconsolidación. Considerando que el limbo también ha sido reportado en roedores y humanos, mis resultados sugieren que se trataría de un mecanismo evolutivamente conservado cuya condición fundamental es el arresto de la labilización de la memoria original iniciado por los primeros ECs.

A la memoria de mi viejo

Agradecimientos

A mi director, Dr. Emiliano Merlo, eternamente agradecido por los consejos y las correcciones de esta Tesis. Por haber confiado en mí para sumarme a su grupo de trabajo. Por haberme guiado durante todo el proceso de esta Tesis. Por contagiar su motivación por la ciencia.

A mi codirectora, Dra. María Eugenia Pedreira, por abrirme las puertas de este laboratorio, por su confianza plena desde el comienzo. Por haber guiado y seguido de cerca mis primeros pasos en la ciencia. Por el apoyo en cada una de mis propuestas y decisiones. Por la lectura y las correcciones de esta Tesis.

A Jimena, por haberme ayudado en el laboratorio desde el día 1, por su colaboración en los experimentos de esta Tesis. Por los mates compartidos y su predisposición para darme siempre una mano.

A Ángel, no solo por el apoyo técnico sin el cual la Tesis hubiera quedado a medio camino, sino por interesarse en el avance de este trabajo. Gracias también por las palabras de aliento.

Al resto del grupo: Rodrigo, Laura, Luz, Soledad y Julieta. Por haberme hecho sentir parte del grupo desde el primer día. Por las horas compartidas, por la calidez y la buena onda. Por el apoyo y los consejos.

A todo el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria. Por haberme recibido desde el primer día. Por ser una gran familia que fomenta el espíritu solidario y la estructura horizontal de trabajo. Me siento afortunado de formar parte de este grupo.

A mi familia, por el apoyo y el amor incondicional. Por los valores inculcados. Por haberme guiado y también por dejarme ser. A mi hermana, por acompañarme desde la infancia y ser mi ejemplo a seguir. A mis viejos, por haberme dado la vida y ser mi sostén desde siempre.

A mis amigos y compañeros que me dio la Facultad, algunos de los cuales conozco desde el CBC. Agradezco a la vida por haberlos puesto en mi camino. Por haber compartido largas horas de cursada, los mates, las charlas y las risas. Por los viajes, los días de quinta, las salidas y los lindos momentos compartidos. Especial agradecimiento a Nati por ayudarme con las cuestiones burocráticas de la Tesis.

A mis hermanos de la vida, mis amigos del barrio. Por estar siempre cuando se los necesita. Por las risas, los asados, las salidas, los viajes y los momentos compartidos. Por los consejos y el apoyo en todo momento.

Finalmente, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por abrirme las puertas y permitirme estudiar esta carrera. A los docentes y no docentes que la conforman, por su calidad humana y por su pasión para hacer que esto funcione. Porque son ellos los que mantienen el prestigio de esta casa de estudios.

INDICE

1 – Introducción.....	1
1.1 – Aprendizaje y memoria.....	1
1.2 – Niveles de análisis de la memoria y soporte biológico.....	1
1.3 – Aprendizaje asociativo: condicionamiento clásico.....	2
1.4 – Fases de la memoria.....	3
1.5 – Procesos de memoria.....	4
1.5.1 – Reconsolidación de la memoria.....	5
1.5.2 – Extinción de la memoria.....	6
1.5.3 – Relación entre la reconsolidación y la extinción de la memoria.....	7
1.6 – Sujeto experimental.....	8
1.7 – Objetivos e hipótesis.....	11
1.7.1 – Objetivo general.....	11
1.7.2 – Hipótesis general.....	11
2 – Materiales y métodos.....	13
2.1 – Animales.....	13
2.2 – Dispositivo experimental.....	14
2.3 – Procedimiento general.....	16
2.4 – Paradigma de condicionamiento contextual Pavloviano (CCP).....	16
2.4.1 – Sesión de entrenamiento.....	16
2.4.2 – Sesión de re-exposición.....	16
2.4.3 – Sesión de evaluación.....	17
2.5 – Drogas y su administración.....	17
2.6 – Análisis de videos y obtención de la variable respuesta.....	18
2.7 – Análisis estadístico.....	18
3 – Resultados.....	20
3.1 – Reconsolidación de la memoria ante una o pocas re-exposiciones al contexto... 20	
3.1.1 – Experimento 1: efecto de la inyección de cicloheximida sistémica en la reconsolidación de la memoria del CCP inducida por una re-exposición a 1 EC.....	20
3.1.2 – Experimento 2: efecto de la inyección de cicloheximida sistémica durante la re-exposición a 40 ECs en la memoria del CCP.....	22
3.2 – Estado transitorio o limbo de la memoria un número intermedio de re- exposiciones al EC.	24
3.2.1 – Experimento 3: efecto de la inyección de cicloheximida sistémica durante la re-exposición a 80 ECs en la memoria del CCP.....	24
3.2.2 – Experimento 4: estudio de la reconsolidación y el estado limbo de la memoria del CCP con una re-exposición a 1 EC y 80 ECs.....	26
3.2.3 – Experimento 5: efecto de la inyección de cicloheximida sistémica durante la re-exposición a 160 ECs en la memoria del CCP.....	28
3.3 – Extinción de la memoria ante 320 presentaciones del EC.....	30
3.3.1 – Experimento 6: efecto de la inyección de cicloheximida sistémica en la extinción de la memoria del CCP inducida por una re-exposición a 320 ECs.....	30
3.4 – Condiciones limitantes a la inducción de limbo: fuerza de la memoria.....	32
3.4.1 – Experimento 7: efecto de la fuerza de la memoria en las condiciones paramétricas que inducen la fase limbo.....	32

4 – Discusión.....	34
4.1 - Antecedentes de aprendizaje y memoria en el cangrejo.....	34
4.2 - Condiciones paramétricas de la fase limbo del CCP.....	36
4.3 - Condiciones limitantes de la fase limbo del CCP.....	38
4.4 - Teoría bayesiana del aprendizaje.....	39
4.5 - Modelo de transición entre reconsolidación y extinción.....	40
4.6 - Perspectivas a futuro.....	43
4.7 - Entendiendo los mecanismos de persistencia de memorias aversivas para su aplicación clínica.....	44
5 – Bibliografía.....	46

Introducción

1.1 – Aprendizaje y memoria

El comportamiento de un animal suele cambiar a lo largo de su vida, ya sea como producto de un patrón genético de desarrollo como también de su interacción con el medio ambiente. El peso de cada uno de estos componentes en la determinación de la expresión comportamental puede variar notablemente entre especies (Tomsic y col., 1993; Alcock, 2005). Sin embargo, el límite entre los aspectos comportamentales derivados de uno y otro no es claro, ya que las posibilidades de un animal de modificar sus acciones en base a una experiencia son parte de sus habilidades cognitivas, determinadas tanto genéticamente como por experiencias previas que establecen un abanico de posibilidades de análisis y procesamiento de la información. Es por esto, que las habilidades cognitivas de un animal están directamente asociadas a las presiones ecológicas que llevaron a la plasticidad del comportamiento (Shettleworth, 1993; Healy et al., 2009).

En la naturaleza, los estímulos que resultan biológicamente relevantes para el animal suelen presentarse con cierta repetitividad y predictibilidad en un dado ambiente. Las teorías actuales consideran que el aprendizaje de la estructura del medio ambiente le permite al animal realizar predicciones específicas. Mediante estas, los animales aprenden a predecir el éxito o fracaso de sus actos así como el significado o consecuencia de una configuración de estímulos en particular. Estas predicciones resultan adaptativas siempre y cuando le permitan al animal modificar su comportamiento para recibir un estímulo positivo o evitar un estímulo negativo (Dickinson, 1980; Mackintosh, 1975; Pearce y Hall, 1980; Rescorla y Wagner, 1972).

Podemos definir por lo tanto al **aprendizaje** como al proceso mediante el cual los animales adquieren nueva información referente a los estímulos ambientales. Esta información resultante del aprendizaje genera una representación interna del mundo exterior que se encuentra codificada en circuitos neuronales en forma de patrones espacio-temporales de actividad adquiridos mediante cambios en las propiedades reactivas de las neuronas como producto del mismo aprendizaje (Dudai, 2002). Definiremos entonces a la **memoria** como la capacidad de retener dicha información en el tiempo (Thorpe, 1963) lo cual le otorga al animal la capacidad de acceder a la información en el momento que resulte necesario y así poder realizar predicciones y/o anticipaciones a eventos naturales biológicamente relevantes.

1.2 – Niveles de análisis de la memoria y soporte biológico

Uno de los principales problemas de la neurobiología es la incapacidad de poder acceder al sustrato físico de la memoria de forma directa. Sin embargo, podemos evaluar la memoria a partir de su efecto sobre el repertorio comportamental, el cual es producto de la actividad del sistema nervioso. De esta manera, los patrones de conducta presentes en los estudios comportamentales deben de reflejar la organización subyacente del sistema nervioso, dicho de una manera, los estados comportamentales corresponden a estados cerebrales (Dudai, 1989).

De esta última definición, se desprende que el aprendizaje y la memoria pueden ser analizados en diferentes niveles de organización biológica. El primer nivel de análisis es el estudio del comportamiento del animal, en donde las propiedades

del aprendizaje son inferidas a través de los cambios en la respuesta comportamental como consecuencia de los estímulos presentados. Luego, se encuentra el nivel del órgano, el sistema nervioso o circuito neuronal, en donde se analiza el rol específico de una zona cerebral o de un circuito neuronal asociado al aprendizaje. Finalmente, se encuentra el nivel celular y molecular que analiza la actividad de una neurona en particular o de procesos bioquímicos asociados al aprendizaje y la memoria.

Haciendo uso de distintas aproximaciones metodológicas, uno puede generar una interpretación más acabada de los mecanismos y sucesos involucrados en los procesos de aprendizaje y memoria. Ejemplos de estas aproximaciones se encuentran en las manipulaciones comportamentales, las lesiones discretas en determinadas regiones del sistema nervioso, estimulaciones y registros electrofisiológicos en neuronas o poblaciones de neuronas particulares o la administración de fármacos que afectan algún proceso celular, funciones enzimáticas, transmisión sináptica, vías de señalización o biosíntesis de macromoléculas.

Para el estudio de la memoria y sus mecanismos biológicos, se utiliza una gran variedad de animales, desde la abeja *Apis mellifera* (Hammer y Menzel, 1995), la mosca *Drosophila melanogaster* (De Zazzo y Tully, 1995), el cangrejo *Neohelice granulata* (Maldonado y col., 1997), el molusco *Aplysia* (Carew y col., 1972; Byrne, 1987), mamíferos roedores como ratas (McGaugh, 1966) y ratones (Roberts y Flexner, 1969), hasta primates (Harlow y Bromer, 1938).

El estudio del aprendizaje y la memoria suele contrastar el comportamiento de dos (o más) individuos en dos tiempos distintos. En principio, en un tiempo t_1 , los individuos compartirían la misma experiencia previa, por lo que no deberían mostrar diferencias en el comportamiento. Luego, a un individuo se lo expone a una experiencia de interés para el investigador, mientras que al otro no. Por lo tanto, a un tiempo t_2 posterior, el aprendizaje es evaluado y se hace evidente al medir las diferencias comportamentales de los individuos que pasaron por la experiencia con los que no la tuvieron (Rescorla y Holland 1976). Dependiendo del intervalo entre t_1 y t_2 es posible estudiar memorias de corto, mediano o largo plazo.

1.3 – Aprendizaje asociativo: condicionamiento clásico

Como los animales aprenden la estructura del mundo de distintas maneras, las cuales podrían generar, o modificar, representaciones internas de distinta complejidad (Dudai, 1989), el aprendizaje también puede clasificarse de acuerdo al número, contingencia y relevancia de los estímulos.

En particular, el aprendizaje asociativo consiste en el establecimiento de relaciones, o asociaciones, de dos estímulos que previamente no tenían conexión alguna. Este es el principio básico del condicionamiento clásico, un fenómeno cognitivo descrito por primera vez en 1927 por Ivan Pavlov (Pavlov, 1927). En estos experimentos, el sujeto muestra una respuesta inicial ante la presentación de un estímulo en particular, denominado estímulo incondicionado (EI). Esta respuesta evocada por el EI se la denomina respuesta incondicionada (RI), debido a que se presenta incluso sin experiencia previa con el estímulo en cuestión y está asociada a la valencia del EI. Se consideran EI positivos a aquellos con valencia positiva para el animal (potencialmente beneficioso para su supervivencia), y EI negativos a aquellos con valencia negativa (potencialmente perjudiciales para su supervivencia). De manera contingente es presentado otro estímulo que resulta neutral para el animal,

llamado estímulo condicionado (EC), que no genera en principio una respuesta en el animal. El condicionamiento ocurre como consecuencia de la presentación contingente del EC y el EI de forma tal que el sujeto experimenta la asociación entre estos dos estímulos y aprende que la ocurrencia del EC predice la ocurrencia del EI. Si la asociación es establecida y adquirida, el animal mostrará una respuesta ante la sola presentación del EC, lo que se conoce como respuesta condicionada (RC). Por lo tanto, se dice que el sujeto ha aprendido la contingencia de los estímulos a la cuál fue expuesto. Este tipo de condicionamiento representa un ejemplo de cómo los animales son capaces de aprender de las relaciones existentes entre los estímulos que los rodean y generar una respuesta comportamental adaptativa.

1.4 – Fases de la memoria

Las memorias pueden durar desde segundos a días o una vida entera, dependiendo de la relevancia de la información que codifican y de la fuerza de la experiencia que les dio origen. Así, una experiencia que será recordada por un tiempo largo, desencadena una secuencia de fases transitorias y estables de memoria que cubren desde el momento inmediato de la adquisición y etapas intermedias, hasta finalmente memorias estables o de largo término (Menzel, 1999).

Existen tres fases de la memoria, diferenciadas sobre la base del análisis mecanístico, farmacológico, y de los requerimientos de inducción y de expresión génica, que resultan de interés desde el punto de vista neurobiológico. Estas tres fases (Figura 1.1), definidas en base a su duración relativa, son la memoria de corto término (MCT), que se refiere a los sistemas que retienen la información desde el momento de la experiencia y temporalmente mientras la información es transferida a formas más estables de almacenamiento, como la memoria intermedia (MI), o a una forma más duradera como la memoria de largo término (MLT) (Squire, 1987; Sedman y col., 1991). A pesar de poder definir estas tres fases según características propias de cada una, es de utilidad e importancia, para poder estudiar la memoria, recordar que estas son parte de un proceso gradual, no discreto de adquisición y almacenamiento de información, y que su denominación no depende de la duración temporal absoluta de cada una de ellas, sino de los requerimientos de tipo celulares y moleculares de las mismas.

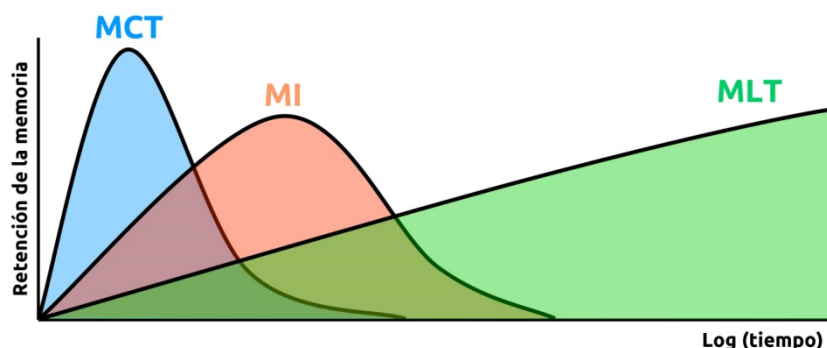


Figura 1.1. **Fases de la memoria.** Adaptado de McGaugh, 2000. MCT, memoria de corto término; MI, memoria intermedia; MLT, memoria de largo término.

La secuencialidad de estas tres fases de memoria, sugiere un procesamiento de tipo serial, en el cual cada una de ellas es dependiente de la anterior. Sin embargo,

se ha demostrado que las fases también pueden ser inducidas y procesadas en paralelo desde el momento del aprendizaje, dependiendo de la especie, del paradigma y de las fases de memoria en cuestión. Uno de los modelos más estudiados, el molusco *Aplysia*, muestra en detalle el fenómeno de sensibilización de una respuesta defensiva, un aprendizaje no asociativo, y los mecanismos celulares que subyacen a la retención de este aprendizaje a corto, mediano y largo término. Se ha comprobado con respecto al procesamiento de estas tres fases de memoria que la MLT es dependiente de la existencia de una MI. Sin embargo, el procesamiento de éstas es independiente o paralelo a la memoria de corto término (Sutton y col., 2001). En pollos que aprenden a asociar un estímulo a un refuerzo negativo se ha determinado un procesamiento serial de la memoria de corto y de largo término (Gibbs y Ng, 1977), mientras que en ratas la existencia de las distintas fases de memoria es independiente y son paralelamente inducidas por el aprendizaje (Frieder y Allewis, 1978; Izquierdo y col., 1998).

1.5 – Procesos de memoria

Como fue definido anteriormente, la experiencia comportamental puede ser codificada y guardada por el organismo en una memoria de largo término. La formación de esta MLT requiere de una serie de procesos con una determinada dinámica temporal. El aprendizaje constituye el primer paso del proceso, llamado fase de **adquisición**, donde se produce la codificación de los estímulos sensoriales (Fig. 1.2; Día 1). Luego, el segundo paso denominado **consolidación** (Fig. 1.2; Consolidación), constituye un periodo de estabilización que permite a la memoria subsistir en el tiempo (Dudai, 2004). Una vez consolidada la memoria, se puede recuperar la información almacenada, lo cual ocurre durante la fase de **evocación** (Sara y Hars 2006). Sin embargo, se ha demostrado que las memorias almacenadas no son inmutables, sino que pueden ser modificadas ante la presentación de una versión actualizada de la información original. En memorias consolidadas, la presentación de un recordatorio (presentación del EC sin el EI) puede guiar a la memoria a través de dos procesos distintos. Por un lado, si el recordatorio es breve (en tiempo o número de eventos) se desencadena un proceso llamado de **reconsolidación** (Przybylski y Sara, 1997; Nader et al., 2000; Pedreira y Maldonado, 2003) (Fig. 1.2A; Reconsolidación), por medio del cual la memoria original se vuelve lábil y sensible a tratamientos amnésicos, y necesita de un proceso de re-estabilización para volver al estado estable. Este mecanismo de reconsolidación permitiría integrar nueva información o incrementar la duración y/o precisión de la memoria EC-EI (De Oliveira Alvares et al., 2012; 2013; Fernández et al., 2016; Forcato et al., 2011; 2013; 2014; 2016; Inda et al., 2011). Por el otro, si la exposición al EC desapareado es prolongada o consiste en un número elevado de eventos, se puede inducir el fenómeno de **extinción** (Fig. 1.2B; Adquisición Extinción), el cual implicaría la formación de una nueva memoria asociativa EC-noEI (Bouton, 2004; Rescorla, 2004) que inhibe la expresión de la memoria EC-EI original. A continuación detallaremos las características de estos fenómenos y su relación.

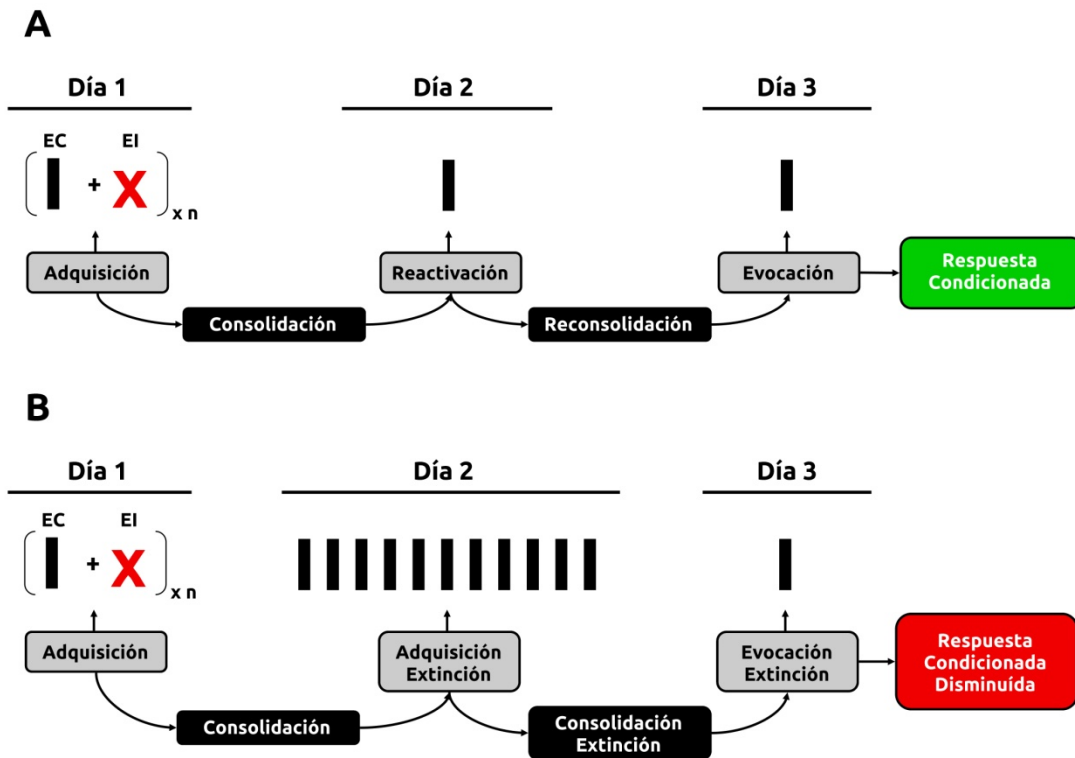


Figura 1.2. **Procesos de memoria.** **A.** Día 1: se produce la adquisición de la memoria mediante la asociación EC-EI. Día 2: una vez consolidada la memoria, una presentación breve del EC (en tiempo o número de eventos) puede producir la evocación y reactivación de la memoria EC-EI, lo que desencadena el proceso de reconsolidación. Día 3: la presentación del EC produce la evocación de la memoria. **B.** Día 1: se produce la adquisición de la memoria mediante la asociación EC-EI. Día 2: una vez consolidada la memoria, la presentación prolongada del EC (en tiempo o número de eventos) produce la adquisición de una memoria de extinción, lo que desencadena el proceso de consolidación de la memoria de extinción. Día 3: la presentación del EC produce la evocación de la memoria de extinción. EC: estímulo condicionado. EI: estímulo incondicionado. N: cantidad n de repeticiones. (Adaptado de Makkar et al., 2010 y Auchter et al. 2017).

1.5.1 – Reconsolidación de la memoria

Si se le presenta a un sujeto experimental un recordatorio del aprendizaje original, la memoria previamente consolidada puede retornar a un nuevo estado de labilidad. Esta reactivación abre una ventana de susceptibilidad a agentes amnésicos (como por ejemplo los inhibidores de síntesis proteica) y a agentes hipermnésicos, similar al de la consolidación inicial (Lewis y Maher 1965; Misanin et al. 1968; Nader et al. 2000; Pedreira y Maldonado, 2003). Basándose en estos resultados Lewis y Maher (1965), propusieron que las memorias consolidadas podrían estar en un estado inactivo y en otro activo, y que pasan de un estado al otro por la presentación del recordatorio, generalmente el estímulo condicionado.

Con la presentación del recordatorio la memoria pasa de un estado inactivo a un estado activo (reactivación), seguido por un proceso de re-estabilización de la información. A este último se lo denominó reconsolidación. Desde su inicio el término reconsolidación se tomó como una segunda instancia de consolidación (Przybylski y Sara, 1997; Przybylski et al., 1999; Nader et al., 2000a). Actualmente es entendida como un fenómeno que si bien recapitula dicho proceso, presenta diferencias en algunos mecanismos y cinéticas (Lee et al., 2004; Lee et al., 2012;

Merlo et al., 2015). Estas diferencias pueden deberse a que en la consolidación se estabiliza una nueva traza y en la reconsolidación se reestabiliza una traza mnésica previamente formada (Dudai, 2004; Alberini, 2005; Forcato et al., 2011). Así, una traza consolidada puede volverse activa permitiendo su actualización de contenido o fuerza mediante el proceso de reconsolidación (Alberini, 2011; Finnie y Nader, 2012; Forcato et al., 2014; Lee, 2009). Hoy en día se sabe que el motor de la actualización de memorias consolidadas es el error de predicción (EP) (Pedreira et al., 2004; Sevenster et al., 2012; 2013; 2014; Exton-McGuinness et al., 2015; Fernández et al., 2016), el cual consiste en una incongruencia entre la predicción realizada por el animal y el evento ocurrido. Se entiende al EP como una condición necesaria para desencadenar la reconsolidación de la memoria pero no suficiente, ya que el destino de dicha memoria va a depender de sus características (como la fuerza y edad) y del tipo de recordatorio (Suzuki et al., 2004)

En el año 2000, un trabajo demostró la fase de reconsolidación en una memoria de miedo en ratas, utilizando como agente disruptor la administración de anisomisina (antibiótico que bloquea la síntesis proteica) de manera localizada en la amígdala basolateral (Nader et al., 2000b). Este trabajo produjo un quiebre en el estudio de los mecanismos de la formación de las memorias, a partir del cual la fase de reconsolidación de la memoria se convirtió en un área de intensa investigación en las neurociencias (Dudai, 2012). A partir de esto, se ha demostrado que la sola presentación del recordatorio no es suficiente para iniciar el proceso de reconsolidación. Existen ciertas condiciones limitantes, como la edad de la memoria (Inda et al., 2011; Forcato et al., 2013, 2014) o la fuerza de la memoria (Forcato et al., 2013; Reichelt and Lee, 2013).

1.5.2 – Extinción de la memoria

El fenómeno de la extinción de la memoria consiste en la disminución de la RC ante la presentación repetida del EC (en tiempo o número de presentaciones) en ausencia del refuerzo (EI). Si durante el condicionamiento inicial se genera una asociación positiva entre el EC y el EI, la ruptura de esa asociación se define como la extinción de esa respuesta (Rescorla, 2004).

En busca de explicar el fenómeno de extinción, algunos modelos han propuesto que la extinción se debe a un proceso de borrado de la asociación original EC-EI, ya que se produce una violación de la contingencia establecida durante el condicionamiento inicial (Rescorla y Wagner, 1972, Wagner y Rescorla, 1972). Se dice que la asociación EC-EI que media la ocurrencia de la RC se debilita, y finalmente queda sin efecto durante el entrenamiento de extinción, ya que el EC pierde su habilidad de producir la RC (Myers y Davis, 2002). Sin embargo, existen resultados comportamentales que van en contra de la hipótesis de borrado, ya que, bajo ciertas manipulaciones experimentales, se encuentra que la memoria original puede volver a surgir. Estos resultados son considerados como características diagnósticas inherentes a la extinción (Bouton, 2002, Myers y Davis, 2002), como la recuperación espontánea y la reinstalación (Merlo y Romano, 2008; Hepp et al., 2010; Fustiñana et al., 2013).

Por otro lado, si se impide selectivamente la consolidación de la memoria de extinción, sin afectar su adquisición, mediante la administración de agentes amnésicos como la inhibición de síntesis proteica, al evaluar la memoria se observa

una retención de la memoria original (Falls et al., 1992, Pedreira y Maldonado, 2003, Perez-Cuesta y Maldonado, 2009). Este hecho provee evidencias de que, a pesar de la adquisición de la memoria de extinción y consecuente caída de la RC, la memoria original permanece intacta.

Otro de los procesos propuestos propone que la extinción se basa en una nueva memoria que compite con la original sobre el control de la RC (Konorski, 1948; Pavlov, 1927). Estos modelos suponen que la extinción genera una segunda asociación de tipo EC-noEI, que actúa en paralelo con la asociación excitatoria inicial, y que compite con esta última por el control de la activación de la representación del EI. Esta hipótesis ha dominado por sobre el resto de las hipótesis sobre la naturaleza de la memoria de extinción.

La formación de la memoria de extinción y su consolidación son fenómenos menos estudiados que los de la adquisición y consolidación de la memoria original (Davis y Myers 2002). Sin embargo, se han encontrado ciertas coincidencias en los eventos celulares y moleculares que subyacen a la consolidación de estos dos procesos (Lu et al., 2001; Santini et al., 2001), lo que es coherente con el concepto de que la extinción es un nuevo aprendizaje asociativo (Pavlov, 1927; Myers y Davis, 2002). Por otra parte, la consolidación y la extinción presentan diferencias a nivel molecular. Se ha demostrado que calcineurina (CaN), una proteína fosfatasa dependiente de calcio y estimulada por calmodulina, puede afectar a la consolidación de la memoria original y la memoria de extinción de maneras opuestas. Mientras que la inhibición de CaN durante el entrenamiento facilita la consolidación de la memoria original (Ikegami y Inokuchi, 2000; Baumgärtel et al., 2008), la inhibición durante la sesión de extinción inhibe la consolidación de la memoria de extinción (Merlo et al., 2014). Esta evidencia sugiere que la extinción involucra mecanismos de depotenciación de la memoria EC-EI complementarios a la formación de la nueva memoria EC-noEI.

1.5.3 – Relación entre la reconsolidación y la extinción de la memoria

La reconsolidación y la extinción comparten dos características fundamentales. Los dos procesos son inducidos por la presentación del recordatorio sin el refuerzo, y los dos fenómenos modulan la expresión de la memoria original. En este sentido, se puede decir que la reconsolidación y la extinción de la memoria son dos procesos que guardan una estrecha relación funcional, que sin embargo, estarían basados en mecanismos distintos.

Yendo a una descripción más detallada, la reconsolidación y la extinción se basan en el hecho de que ambos procesos son inducidos por el mismo estímulo, el EC. Mientras que una re-exposición breve al EC desencadena el proceso de reconsolidación, una re-exposición prolongada al EC induce la extinción de la memoria. Por lo tanto, ambos procesos requieren para su inducción la presentación de un estímulo relacionado con la experiencia anterior. Otra característica compartida entre estos dos procesos es que se basan en la modulación de la expresión de una memoria previamente adquirida, como por ejemplo la memoria asociativa original. Mientras que la reconsolidación involucra una desestabilización (labilización) y una re-estabilización posterior de la memoria original (Nader et al., 2000a), la extinción involucra la formación de una nueva memoria que compite e inhibe la expresión de la memoria original (Myers y Davis 2002). Incluso, existe

evidencia de que existen procesos múltiples que contribuyen a la adquisición de la extinción. En conjunto, la formación de una nueva memoria inhibitoria y la pérdida de la fuerza asociativa o borrado parcial de la memoria original por reclutamiento de mecanismos propios de la labilización de esta memoria (Lee et al., 2008; Lai et al., 2012; Khalaf et al., 2018), podrían explicar la extinción. Sin embargo, la reconsolidación y extinción comparten el hecho funcional de que ambos procesos representan una nueva oportunidad para el individuo de modificar la información previamente almacenada, una afectando la representación de la memoria original, mientras que la otra, afectando principalmente su expresión. Estos mecanismos, serían de gran valor adaptativo, ya que el animal puede actualizar la información de la configuración de su ambiente a medida que esta cambia.

Podemos decir entonces que un mismo estímulo, el EC, posee la capacidad tanto de desencadenar un proceso desestabilizador de la memoria original (reconsolidación), y otro en el cual la expresión de la memoria original es inhibida (nueva memoria de extinción).

En observaciones recientes en roedores se ha demostrado que los procesos de reconsolidación y extinción son mutuamente excluyentes, y que además, una cantidad intermedia de exposición al EC no dispararía ni reconsolidación ni extinción (Merlo et al., 2014). Este novedoso estado transitorio o limbo se ha reportado también para humanos y se caracteriza por la insensibilidad a agentes amnésicos luego de presentaciones intermedias del EC (Flavell y Lee, 2013; Merlo et al., 2014; Sevenster et al., 2014; Merlo et al., 2018). Podemos decir entonces que la exposición al EC genera al menos tres procesos de memoria diferentes. La existencia de una fase insensible o limbo separando las condiciones para desencadenar reconsolidación o extinción agrega una nueva dimensión al estudio de las propiedades moleculares de la persistencia de la memoria sugiriendo la existencia de mecanismos moleculares específicos y segregados encargados del arresto de la reconsolidación y el inicio de la extinción de manera independiente.

1.6 – Sujeto experimental

En esta Tesis se utilizó al cangrejo *Neohelice granulata* como sujeto experimental. El paradigma utilizado es el de condicionamiento contextual Pavloviano (CCP). Este se basa en el aprendizaje asociativo de miedo al contexto, en el cual los animales relacionan un estímulo visual de peligro (EVP) con un contexto determinado en el que este les es presentado (Maldonado, 2002; Fustiñana et al., 2013). Los animales presentan una robusta repuesta inicial de escape ante el pasaje del EVP, una figura opaca que se desplaza por encima del individuo (Pereyra et al., 1999). El contexto, a su vez, puede ser iluminado de dos formas alternativas generando dos escenarios distintos que el cangrejo interpreta como contextos diferentes (Hepp et al., 2010). La presentación repetida del EVP, asociada con una de estas iluminaciones, típicamente en un entrenamiento de 15 ensayos con un intervalo entre ensayos (IEE) de 3 min, produce una disminución de la respuesta de escape al pasaje del EVP (Fig. 1.3A, Entrenamiento). A través de los sucesivos ensayos, se produce un cambio de estrategia defensiva, donde la respuesta de escape primera, considerada energéticamente costosa, es reemplazada por una respuesta de inmovilidad, más económica, que persiste a través del tiempo (Pereyra et al., 1999, Pereyra et al., 2000). Este decremento en la respuesta de escape persiste al menos

una semana. De esta forma, durante la fase de evaluación la comparación estadística de la respuesta de animales entrenados (EN; sometidos al pasaje repetido del EVP), con la de animales controles no entrenados (CT), revela diferencias significativas en el nivel de respuesta (Fig 1.3A, Evaluación). De esta comparación surge la definición operativa de la retención de la memoria. Basados en experimentos comportamentales de contexto-especificidad (Pereyra et al., 2000; Fustiñana et al., 2013), se demostró que esta memoria es contexto específica, ya que solo se observa retención si la evaluación se lleva a cabo en el mismo contexto espacial del entrenamiento.

Una vez consolidada la memoria, si se re-expone brevemente el animal al contexto del entrenamiento sin refuerzo, como podría ser una sola presentación del EC (Fustiñana et al., 2013), se desencadena el proceso de labilización de la memoria y se abre una ventana de reconsolidación que se estima tiene una duración de 6 hs (Pedreira et al., 2002) durante la cual la memoria se encuentra sensible a distintos agentes amnésicos. Luego de esta re-exposición breve, al evaluar la memoria al día siguiente, los animales EN mostrarán retención de la memoria mientras que los animales CT no (Fig. 1.3B).

Por otro lado, la extinción de esta memoria puede ser lograda por una re-exposición al contexto del entrenamiento sin refuerzo, ya sea de forma continua o en varias presentaciones discretas, pero que sumen al menos 2 h de duración (Pedreira y Maldonado, 2003; Hepp et al., 2010; Fustiñana et al., 2013), y esta extinción cumple con distintas características diagnósticas del fenómeno, como recuperación espontánea y reinstalación por presentación de un refuerzo no asociado al contexto (Merlo y Romano, 2008; Hepp et al., 2010; Fustiñana et al., 2013). Luego de esta re-exposición prolongada, al evaluar la memoria al día siguiente, ni los animales EN ni los animales CT mostrarán retención de la memoria (Fig. 1.3C).

Si bien la reconsolidación y la extinción son procesos mutuamente excluyentes (Pedreira y Maldonado, 2003; Suzuki et al., 2004), esto no se debe a que uno de estos procesos resulta restrictivo para el otro, sino a la consecuencia de un mecanismo mnésico que dirige la memoria hacia uno u otro destino. En el cangrejo se ha demostrado que bajo ciertas condiciones de reactivación, como sucesivas sesiones de re-exposición al EC (por ejemplo: una sesión de reactivación seguida de un entrenamiento de extinción), estos dos procesos pueden co-existir y desarrollarse en paralelo (Pérez-Cuesta y Maldonado, 2009). Llevando este concepto a un protocolo comportamental, como una sesión de extinción de varios ensayos de presentación del EC, implicaría que el primer EC (o primeros) desencadenaría la reconsolidación. A medida que uno continúa presentando el EC, y llegado el momento donde se alcanzan las condiciones necesarias, se desencadena la extinción a pesar de que la reconsolidación sigue en curso.

Los distintos procesos de memoria, como la consolidación, reconsolidación y extinción han sido evidenciados en el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria en el modelo invertebrado de *Neohelice granulata* a lo largo de las últimas dos décadas (Fustiñana et al., 2013; Maldonado, 2002; Pedreira y Maldonado, 2003). Sin embargo, no existe evidencia en este modelo de la existencia de una fase transitoria o limbo, reportada hasta el momento sólo en roedores y humanos por algunos trabajos (Flavell y Lee, 2013; Merlo et al., 2014; Sevenster et al., 2014; Merlo et al., 2018). A partir de esto se desprende el interés en determinar si dicho proceso se encuentra evolutivamente conservado, si está presente en animales invertebrados como el

cangrejo *Neohelice granulata* y eventualmente establecer las condiciones paramétricas y limitantes para que esto ocurra, en donde van a jugar un rol importante la fuerza de la memoria y la cantidad de ECs presentados durante la reexposición.

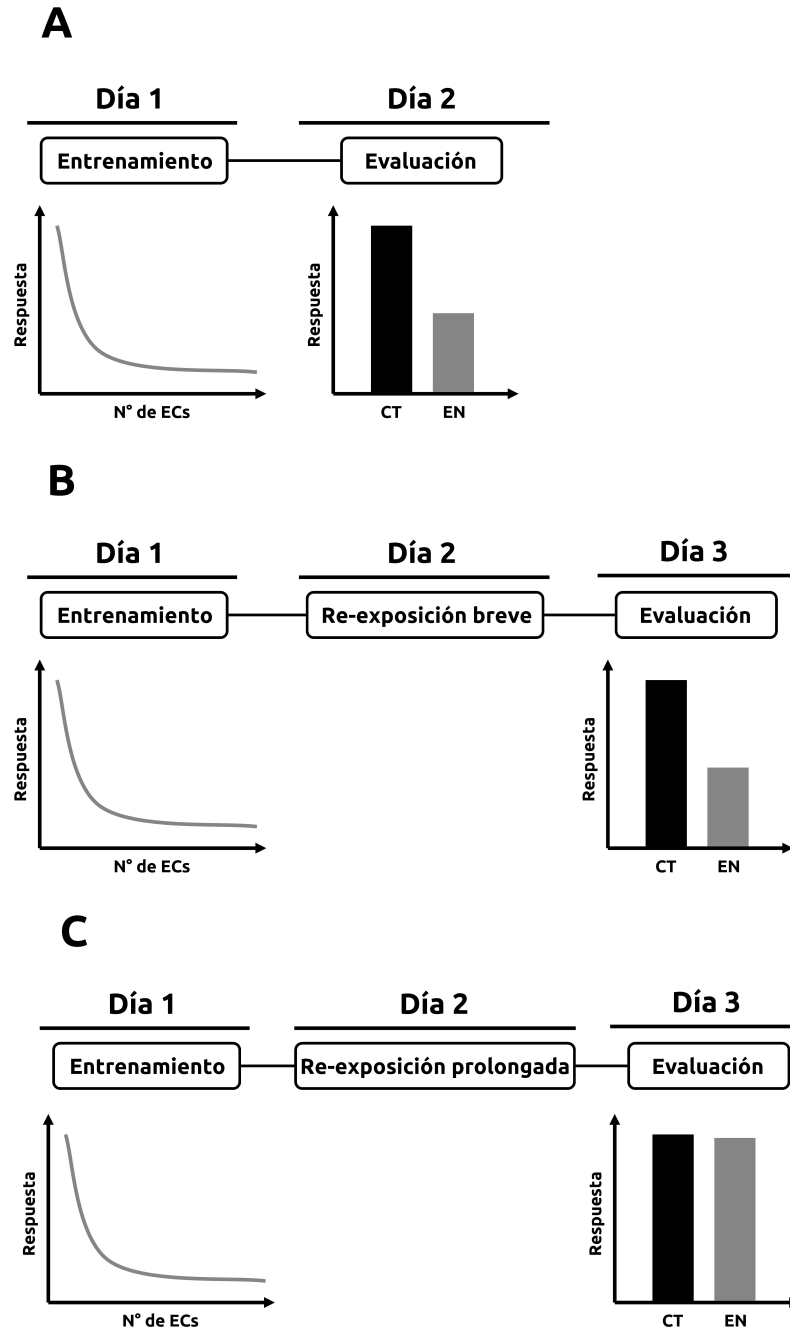


Figura 1.3. **Esquemas propios de un paradigma del CCP.** **A.** Día 1: entrenamiento de 15 ensayos que produce una disminución en la respuesta de escape del animal. Día 2: sesión de evaluación. **B.** Día 1: entrenamiento de 15 ensayos que produce una disminución en la respuesta de escape del animal. Día 2: una vez consolidada la memoria, la re-exposición breve al EC (en tiempo o número de eventos) produce la labilización y reconsolidación de la memoria. Día 3: sesión de evaluación. **C.** Día 1: entrenamiento de 15 ensayos que produce una disminución en la respuesta de escape del animal. Día 2: una vez consolidada la memoria, la re-exposición prolongada al EC (en tiempo o número de eventos) produce la adquisición de una memoria de extinción. Día 3: sesión de evaluación. CT: grupo no entrenado o control. EN: grupo entrenado. (Adaptado de Makkar et al., 2010).

1.7 – Objetivos e hipótesis

1.7.1 – Objetivo general

En base a la evidencia en roedores y humanos sobre la existencia de una fase transitoria o limbo que segrega los procesos de reconsolidación y extinción, y basados en el marco teórico expuesto, el objetivo general de este trabajo es estudiar la conservación evolutiva del limbo en un animal invertebrado como el cangrejo *Neohelice granulata*.

1.7.2 – Hipótesis general

En este marco teórico nuestra hipótesis es que al igual que en mamíferos, los procesos de reconsolidación y extinción de una memoria asociativa en invertebrados son mutuamente excluyentes y están segregados por una fase de limbo, inducida por exposiciones intermedias al EC. En base a esta hipótesis central planteamos los siguientes objetivos e hipótesis particulares:

Objetivo 1: Estudiar las condiciones paramétricas necesarias para desencadenar una fase transitoria de la memoria o limbo en el cangrejo *Neohelice granulata*. En particular resulta de interés indagar sobre la cantidad de presentaciones del EC necesarias para disparar dicho proceso. Para ello se estudió la sensibilidad de la memoria original a un agente amnésico robusto como la cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, luego de una re-exposición a un número intermedio de ECs.

Hipótesis 1: En el paradigma de condicionamiento contextual Pavloviano en el cangrejo *Neohelice granulata*, la exposición a un número intermedio de ECs en animales con memoria consolidada es incapaz de disparar tanto el proceso de reconsolidación como el de extinción, dejando a la memoria en un estado transitorio.

Predicción 1: Esta fase transitoria o limbo de la memoria, gatillada por una reexposición a un número intermedio de ECs, se caracteriza por la falta de labilización de la memoria original y la no formación de una nueva memoria de extinción. Por lo tanto, la inyección sistémica de cicloheximida como agente amnésico, que resulta deletérea para la memoria original en exposiciones breves al EC o impide la extinción en exposiciones al EC prolongadas, no afectará la respuesta condicionada cuando es administrada en conjunto a una exposición a un número intermedio de ECs.

Objetivo 2: Estudiar las condiciones limitantes para que se desencadene esta fase transitoria. En particular resulta de interés estudiar cual es el efecto que tiene la fuerza de la traza mnésica sobre el destino que tomará la memoria luego de la sesión de re-exposición. Para ello se estudió la sensibilidad de una memoria más fuerte a un agente amnésico robusto como la cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, luego de una re-exposición que desencadena limbo en una memoria adquirida por un entrenamiento estándar.

Hipótesis 2: En el paradigma de condicionamiento contextual Pavloviano en el cangrejo *Neohelice granulata*, cuando la traza mnésica consolidada es fuerte, la exposición a un número intermedio de ECs produce la reconsolidación de la memoria.

Predicción 2: Aumentando la fuerza del entrenamiento, la memoria resulta más difícil de desestabilizar y por lo tanto habría un “corrimiento hacia la derecha” en la cantidad de ECs necesarios para lograr gatillar limbo. Se espera que un protocolo de re-exposición que gatilla limbo en una memoria estándar no será suficiente para gatillar el mismo proceso cuando la memoria es fuerte, y esta memoria entrará en reconsolidación.

Materiales y Métodos

2.1 – Animales

Se utilizaron cangrejos machos adultos, de la especie *Neohelice granulata* (antes denominado como *Chasmagnathus granulatus*; Dana 1851; Superclase: Crustacea; Clase: Malacostraca; Orden: Decapoda; Infraorden: Brachyura, Superfamilia: Grapsoidea; Familia: Varunidae) (Fig. 2.1A), con un ancho de caparazón de entre 2,6 y 2,9 cm y un peso de 17 gr aproximadamente. Estos cangrejos habitan en las zonas de transición de agua dulce y salada, en general en terreno llano (Fig. 2.1B). Se distribuyen desde el Golfo San Matías (Argentina) hasta la costa sur de Brasil (Bond-Buckup et al., 1991). Su principal predador es la gaviota cangrejera (Beron 2003) (Fig. 2.1C), lo cual constituye un dato fundamental, dado que los estímulos que pasan por encima del horizonte visual son interpretados por el animal como potencialmente peligrosos (Zeil y Zanker, 1997).

Los cangrejos fueron capturados desde la costa, en las rías de San Clemente del Tuyu, Provincia de Buenos Aires, a profundidades de menos de 1 metro. En el laboratorio los animales fueron alojados de a 20 individuos en cubas rectangulares de plástico (35 x 48 x 27 cm), con 1 - 2 cm de agua salobre (salinidad 12 ‰ p/v, pH= 7,4; Marinemix, Cristal Sea, USA), a una temperatura de 22 - 24 °C y sujetos a un periodo de luz oscuridad de 12-12 hrs (luz de 7 a 19 hrs). Esta agua no solo se utiliza para el mantenimiento de los cangrejos, sino también en cada experimento. El agua se utiliza en los contenedores de los equipos experimentales y en los contenedores guardados en cajoneras utilizadas en los intervalos entre las sesiones de los experimentos. Tras la llegada al laboratorio, todos los animales fueron marcados en su caparazón con un punto de goma eva blanca y luego pasaron por un periodo de reposo de al menos 48 hrs antes de iniciar la etapa experimental correspondiente y todos los experimentos fueron realizados dentro de los 10 días siguientes, entre las 8 y las 19 hrs. Cada cangrejo fue utilizado en un solo experimento y cada experimento fue realizado con animales provenientes de una misma captura.

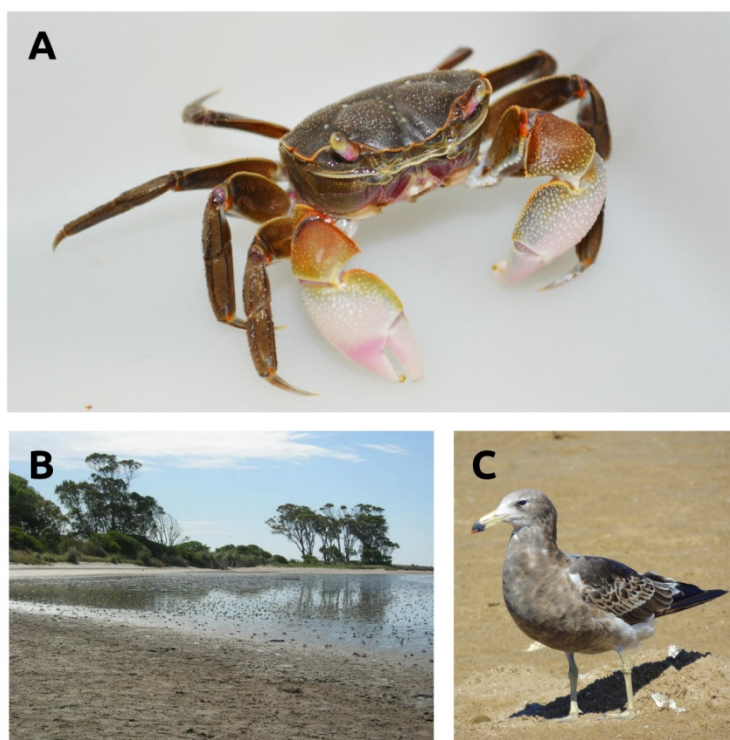


Figura 2.1. **A.** *Neohelice granulata*. **B.** Hábitat de *Neohelice granulata* en San Clemente del Tuyú, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Zona de captura de ejemplares. **C.** Gaviota cangrejera. Principal predador frente al cual los cangrejos despliegan una respuesta defensiva.

2.2 - Dispositivo experimental

El dispositivo experimental, también conocido como actómetro, consiste de un contenedor de plástico opaco anaranjado, con paredes cóncavas de 12 cm de altura, con un diámetro de base de 9 cm y 23 cm de diámetro superior. El mismo contiene agua salobre en su interior, a una altura de 0,5 cm (~50 ml). Cada actómetro aloja a un solo sujeto experimental al mismo tiempo. Asimismo, el dispositivo cuenta con una pantalla opaca negra rectangular (28 x 7,5 cm) ubicada horizontalmente de forma tangencial, 12 cm por encima del contenedor. Esta pantalla constituye el estímulo visual de peligro (EVP). La pantalla, operada mediante un motor controlado por una computadora, se mueve horizontalmente a velocidad angular constante ($\omega=72^\circ/\text{seg}$) describiendo un ángulo de 90° que barre el espacio por encima del actómetro. Cada ensayo de la sesión de entrenamiento o de evaluación consiste de dos ciclos de movimiento de ida y vuelta de la pantalla, cada ciclo seguido de un intervalo de 2 seg sin estimulación, con una duración total de 9 seg (Fig. 2.2A).

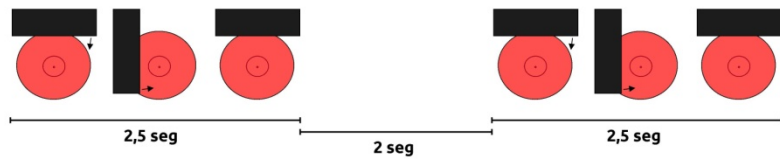
Por encima de los actómetros se encuentran una serie de cámaras que permiten filmar de a 4 actómetros por cámara la actividad de los animales durante el experimento. Estos videos son analizados mediante un software de seguimiento que detecta la posición del punto de goma eva, que se corresponde con la posición del animal, y por ende permite analizar la distancia recorrida por los mismos.

El actómetro puede ser iluminado de dos modos distintos (Fig. 2.2B). La iluminación estándar está dada por 3 lámparas LED que proveen una luz indirecta

desde arriba. La modalidad de iluminación alternativa es iluminado desde debajo del contenedor, por una lámpara incandescente de 5 W. Esta luz se trasluce a través del contenedor y deja en penumbras al espacio que se encuentra por encima de este. Esta iluminación provee un entorno completamente diferente al anterior (Fustiñana et al., 2013). Estas modalidades de iluminación pueden utilizarse alternativamente. El software utilizado para controlar el dispositivo experimental permite configurar el tipo y tiempo de iluminación, presentación del EVP, su número y momento en el que es presentado con respecto al tipo de iluminación. Esto otorga una gran flexibilidad para generar distintos esquemas de entrenamiento, re-exposición y evaluación.

La habitación experimental se encuentra a una temperatura de 22 °C - 24 °C, y cuenta con 20 actómetros separados por tabiques de madera, donde 20 cangrejos pueden ser entrenados, tratados o evaluados simultáneamente. Asimismo, la habitación cuenta con cajoneras donde los animales son alojados entre sesiones en contenedores individuales con agua salobre. Cabe aclarar que un mismo cangrejo siempre es entrenado, tratado y evaluado en un mismo actómetro para descartar así las posibles diferencias de estimulación que puedan presentar los distintos actómetros. Además, el animal siempre vuelve a su mismo contenedor individual.

A



B

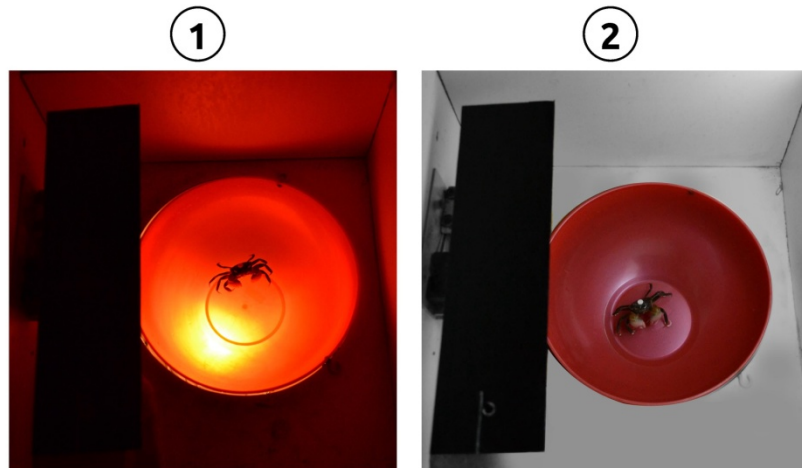


Figura 2.2. **Equipo experimental.** **A.** Esquema del desplazamiento del EVP durante un ciclo de movimiento. Cada ensayo consta de dos ciclos de movimiento (2,5 seg), separados por un intervalo de tiempo de 2 seg. **B.** Esquema del dispositivo experimental iluminado de las dos formas posibles. 1- Inferior, 2- Superior.

2.3 - Procedimiento general

Como procedimiento general, en cada experimento se formaron dos grupos de cangrejos (n= 40 animales por grupo) por cada tratamiento experimental: un grupo que recibirá el entrenamiento (EN) y un grupo no entrenado utilizado como control (CT). Invariablemente, en el Día 1 los animales recibieron la sesión de entrenamiento. En función del número de ensayos, los entrenamientos fueron considerados como estándar (15 ensayos) o fuerte (30 ensayos) (Pedreira et al., 1998). En los distintos experimentos, en el Día 2 los animales fueron re-expuestos al contexto de entrenamiento sin la presentación del EVP. Luego, los animales fueron evaluados en el Día 3. Dependiendo del caso, las distintas sesiones de re-exposición podían estar seguidas de una inyección de solución vehículo (VHC) o solución de cicloheximida (CHX).

2.4 - Paradigma de Condicionamiento Contextual Pavloviano (CCP)

2.4.1 - Sesión de entrenamiento

En el Día 1 los cangrejos fueron colocados en los actómetros iluminados desde abajo y tras 10 min de tiempo de adaptación, recibieron un primer ensayo de pre-entrenamiento seguido de 15 o 30 ensayos de entrenamiento. Cada ensayo estaba compuesto por un cambio de iluminación del contexto desde inferior a superior, quedando la última encendida durante 27 seg (EC). En los últimos 9 seg de esta, se producía el pasaje del EVP (EI), co-terminando estos dos estímulos. Luego, se producía un nuevo cambio hacia la iluminación inferior hasta el siguiente ensayo. El intervalo entre los EIs fue de 171 seg, y entre los cambios de iluminación desde inferior a superior fue de 153 seg (Fig. 2.3A). Simultáneamente, los cangrejos que actuaron como controles no entrenados fueron expuestos a los mismos cambios de iluminación pero sin recibir el EVP en los ensayos de entrenamiento.

2.4.2 - Sesión de re-exposición

En el Día 2, 24hs luego del entrenamiento, los cangrejos recibieron distinto número de re-exposiciones al EC (luz superior durante 27 segundos separada por intervalos de luz inferior de 27 seg) (Fig. 2.3B). En algunos grupos experimentales los animales no fueron re-expuestos al EC, mientras que en otros las re-exposiciones fueron de 1, 40, 80, 160 o 320 ECs.

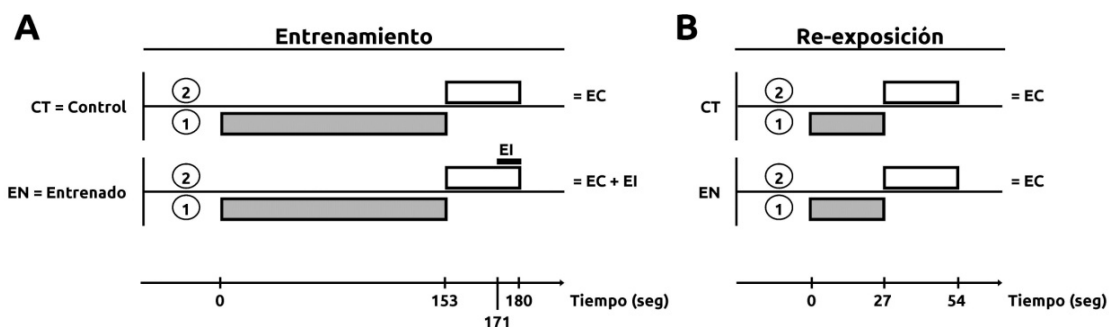


Figura 2.3. **Esquema de un ensayo.** **A.** Entrenamiento: el dispositivo es iluminado desde la fuente lumínica inferior (1) antes del comienzo de cada experimento y durante los intervalos entre presentaciones del EC. La iluminación superior (2) conforma el EC. El mismo tiene una duración de 27 seg. En los grupos entrenados, el EI, tiene una duración de 9 seg, y es presentado durante los últimos 9 segundos el EC. De esta manera el EC co-termina con el EI. **B.** Re-exposición: presenta el mismo patrón de iluminación que el entrenamiento con la diferencia de que la iluminación inferior tiene una duración de 27 seg. A estos intervalos entre presentaciones del EC se los conoce como IEE. Tampoco hay presentación del EC durante la re-exposición.

2.4.3 - Sesión de evaluación

La evaluación de la retención de la memoria tuvo lugar en el Día 3, 24hs luego de la(s) re-exposición(es). En todos los casos la evaluación consistió de la cuantificación de la distancia recorrida como respuesta comportamental de los cangrejos durante los 9 seg de duración de la presentación del EVP. La evaluación consistió de la presentación de un único ensayo.

2.5 - Drogas y su administración

Se utilizó solución fisiológica de crustáceos como solución vehículo (Hoeger y Florey, 1989) (concentraciones molares: NaCl 0,45, CaCl₂ 0.015, MgCl₂ 0,021, KCl 0,01). La CHX fue comprada a Sigma Co. La misma fue aplicada en dosis de 40 µg por animal diluida en un volumen de 50 µl. Todas las inyecciones fueron dadas del lado derecho del animal a través de la membrana cefalotorácica-abdominal dorsal, controlando la profundidad de penetración a 4 mm mediante una camisa colocada en la aguja de la jeringa, de modo de asegurar la liberación de la solución inyectada en el saco pericárdico (Fig. 2.4). Debido a que los cangrejos carecen de una barrera hematoencefálica endotelial (Abbott, 1970), y sumado al hecho de que la sangre es distribuida mediante un sistema capilar del sistema nervioso central, es posible aplicar inyecciones sistémicas que alcancen los ganglios cerebrales.

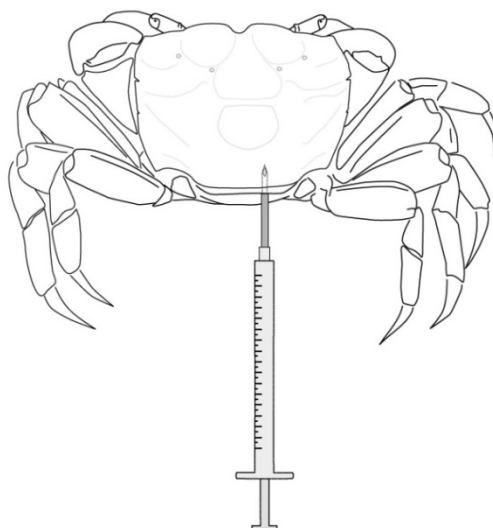


Figura 2.4. **Administración de droga.** Esquema de vista dorsal de *Neohelice*. Se indica la forma y el lugar de administración de las drogas. (Extraído de Carbó Tano, 2013; Tesis doctoral).

2.6 - Análisis de videos y obtención de la variable respuesta

Como se indicó con anterioridad, el comportamiento de los animales fue registrado en video por medio de cámaras situadas por encima de los actómetros, abarcando 4 actómetros por cámara. Estos videos, con una resolución temporal de 10 cuadros por segundo, fueron analizados mediante un software de seguimiento que detecta la posición del punto de goma eva, que se corresponde con la posición del animal. El software devuelve las coordenadas del animal en cada cuadro y esto nos permite calcular la distancia recorrida por el animal en el total del ensayo, de 9 seg de duración. A partir de la distancia recorrida en cada cuadro, se calculó también la velocidad total acumulada, como la sumatoria de las velocidades en cada cuadro (distancia recorrida desde el cuadro previo al cuadro en cuestión, dividido por 0,1 seg que es el tiempo entre cuadros). Para el cálculo de ambas variables se tomó el total del ensayo de 9 seg, incluyendo los intervalos entre ciclos de pasaje de la pantalla, ya que integrando todo este bloque se redujo la dispersión de datos. Finalmente, luego de analizar estas dos variables se optó por la distancia total recorrida como variable respuesta de todos los experimentos de esta Tesis ya que constituye la medida confiable del nivel de reactividad del animal ante el EVP y la variable respuesta con menor dispersión de datos.

2.7 - Análisis estadístico

Como primera medida, se evaluaron los datos de la sesión de pre-entrenamiento mediante un ANOVA de un factor y solo se continuó con el análisis en aquellos experimentos donde no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre grupos. De esta forma se pudo confirmar que no existían diferencias en la respuesta de los grupos previas a la aplicación de las distintas condiciones experimentales.

El número de animales por grupo experimental fue entre 25 y 40. La variabilidad en cuanto al tamaño muestral se debe a los animales muertos durante el transcurso del experimento, y a la aplicación de un criterio de eliminación de animales teniendo en cuenta la respuesta ante el primer pasaje del EVP (sesión de pre-entrenamiento). Se excluyeron del análisis a aquellos animales que tuvieron una baja reactividad ante el estímulo. Por otro lado, también se eliminaron aquellos animales con valores atípicos (mediante el análisis de los residuos) tanto en la sesión de pre-entrenamiento como en la evaluación.

A partir del extenso trabajo de nuestro laboratorio con el paradigma de condicionamiento contextual Pavloviano, la retención de la memoria de largo término queda definida operacionalmente como la diferencia significativa (prueba 't', $p < 0.05$) entre los grupos CT y EN en el nivel de respuesta media durante la sesión de evaluación, de modo tal que $EN < CT$. La misma diferencia significativa se mantiene cuando los cangrejos son inyectados con VHC. Por lo tanto, y en base a estas predicciones, el nivel de respuesta durante la sesión de evaluación (día 3) se analiza mediante un ANOVA de un factor seguido de comparaciones planeadas *a priori* (Rosenthal y Rosnow, 1985; Howell, 2009). Se asume una falta de memoria o amnesia cuando se encuentra una falta de diferencia significativa entre los grupos CT y EN. En el caso en el que se aplicara un entrenamiento de extinción, la falta de diferencia significativa entre los grupos CT y EN, se considera como retención de la memoria de extinción. En cada experimento las comparaciones planeadas se planificaron de la siguiente manera: en la sesión de evaluación se contrastó (a) la respuesta de grupos de animales no entrenados versus entrenados de un mismo tratamiento experimental, para evaluar retención o no de la memoria, y (b) las respuestas entre grupos de animales no entrenados pero sometidos a tratamientos diferentes, en un mismo experimento, para evaluar efectos inespecíficos del tratamiento sobre los niveles de respuesta de los animales (droga o manipulación comportamental). Este último contraste no mostró diferencias significativas en ningún experimento de este trabajo.

Cabe destacar, que en algunos experimentos de esta Tesis, se esperaba que solo un grupo entrenado fuera diferente en su nivel de respuesta del resto de grupos incluidos en el experimento, es decir, de los 4 grupos utilizados, se esperaba que solo uno de ellos difiriera del resto. Esto generó que en algunos casos no se obtuviera diferencias significativas en el análisis de varianza general (ANOVA) de un factor ($\alpha < 0.05$). Sin embargo, al ser las comparaciones planeadas *a priori*, esto nos habilita a continuar con el análisis estadístico y realizar las comparaciones ya mencionadas.

Todos los valores de las respuestas se muestran como media \pm la media del error estándar, normalizados a los valores de la media de la respuesta del grupo control no entrenado. Los datos se analizaron usando el paquete estadístico [R] (R Core Team, versión 3.5.1), Rstudio (Rstudio, Inc., versión 1.1.463) y SPSS (IBM Corp., versión 25).

Resultados

3.1 – Reconsolidación de la memoria ante una o pocas re-exposiciones al estímulo condicionado.

3.1.1 – Experimento 1: efecto de la inyección de cicloheximida sistémica en la reconsolidación de la memoria del CCP inducida por una re-exposición a 1 EC.

Con el fin de evaluar si una única re-exposición breve al EC sin refuerzo labiliza la memoria y produce su reconsolidación, en el experimento 1 se diseñó un protocolo que consistió en cuatro grupos experimentales (Fig. 3.1 A y B). En el día 1, los animales fueron colocados en los actómetros y luego de 10 minutos de aclimatación al equipo todos recibieron un primer ensayo de pre-entrenamiento. Para los grupos entrenados (EN) este ensayo fue seguido de un entrenamiento estándar de 15 ensayos. Los grupos control (CT) luego del pre-entrenamiento permanecieron en los actómetros con el mismo patrón de iluminación que los grupos EN pero sin presentarles el refuerzo (EI). Una vez finalizado el entrenamiento, los animales fueron retirados de los actómetros y colocados en sus contenedores individuales. En el día 2, 24 horas luego del entrenamiento, todos los animales fueron colocados en los actómetros y una vez cumplidos 10 minutos de aclimatación recibieron 1 sólo ensayo de re-exposición al EC sin refuerzo. Los animales volvieron a sus contenedores individuales, y 1 hora más tarde recibieron una inyección sistémica de solución de cicloheximida (grupos CHX) o solución vehículo (grupos VHC). En el día 3, 24 horas luego de la re-exposición y luego de 10 minutos de aclimatación al actómetro, todos los animales fueron evaluados con 1 sólo ensayo reforzado.

Al analizar el nivel de respuesta de los animales frente al EVP en la sesión de pre-entrenamiento del día 1 (Fig. 3.1 C), no se observaron diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(3,105)}=0.315$; $p=0.814$], indicando que previo al tratamiento estos parten de un nivel de respuesta similar, descartando efectos inespecíficos de grupo en los resultados posteriores.

Luego, al analizar la sesión de evaluación del día 3 (Fig. 3.1 D), el ANOVA arrojó diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(3,105)}=2.898$; $p=0.039$]. En las comparaciones planeadas, el par VHC mostró diferencias significativas [CT-VHC vs. EN-VHC: $p=0.007$], mientras que no se encontraron diferencias significativas en el par CHX [CT-CHX vs. EN-CHX: $p=0.633$]. También se contrastaron ambos grupos CT, no arrojando diferencias significativas [CT-VHC vs. CT-CHX: $p=0.712$], lo que descartaría un efecto inespecífico de la droga.

Estos resultados, la retención de la memoria en el par VHC y el efecto amnésico de la droga en el par CHX, indican que una sesión de re-exposición a 1 EC es suficiente para labilizar la memoria del CCP y producir su reconsolidación. Como este proceso depende de la síntesis *de novo* de proteínas, una droga como la cicloheximida, que es inhibidora de esta síntesis, interfiere en la reconsolidación y produce amnesia en el día de la evaluación. Estos resultados se condicen con los antecedentes reportados en este paradigma de memoria CCP (Fustiñana et al., 2013).

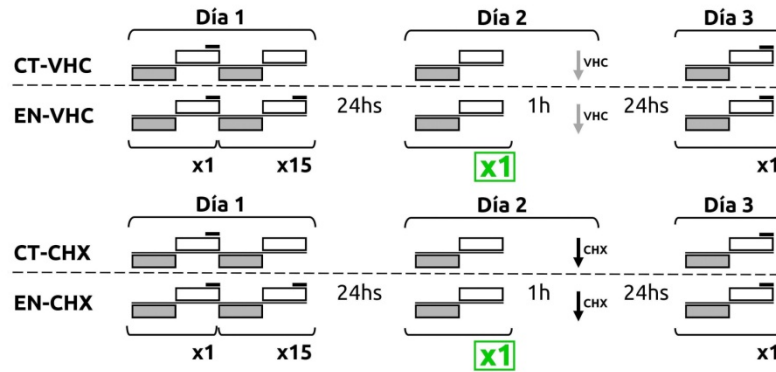
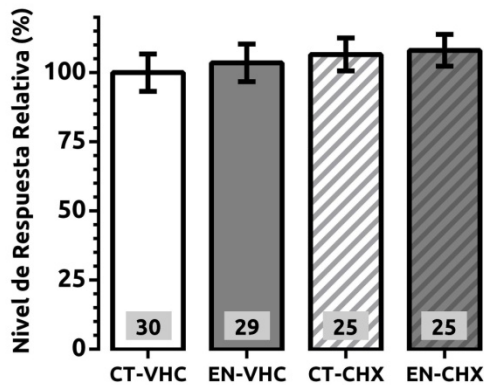
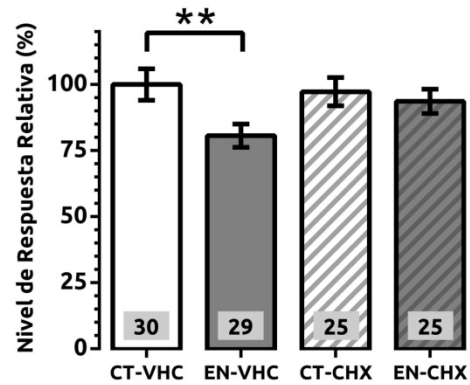
A**B****Día 1****C****Día 3**

Figura 3.1. Efecto de la inyección de cicloheximida sistémica en la reconsolidación de la memoria del CCP inducida por una re-exposición a 1 EC. **A.** Diseños experimentales. Día 1: entrenamiento estándar de 15 ensayos. Día 2: sesión de re-exposición a 1EC y posterior inyección sistémica. Día 3: sesión de evaluación. El protocolo para la condición vehículo (VHC) se encuentra en el panel superior. El protocolo para la condición cicloheximida (CHX) se encuentra en el panel inferior. Las flechas indican el momento de inyección. Los rectángulos indican el estado de iluminación del actómetro, siendo la caja blanca el EC. El guión negro al final de cada caja representa el EI. **B.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de pre-entrenamiento (Día 1), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo CT-VHC. [$F_{(3,105)}=0.315$; $p=0.814$]. **C.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de evaluación (Día 3), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo CT-VHC. [$F_{(3,105)}=2.898$; $p=0.039$; CT-VHC vs. EN-VHC: $p=0.007$; CT-VHC vs. CT-CHX: $p=0.712$; CT-CHX vs. EN-CHX: $p=0.633$]. CT: grupo control no entrenado. EN: grupo entrenado. VHC: grupo inyectado con solución vehículo. CHX: grupo inyectado con solución de cicloheximida. El número dentro de cada barra representa el tamaño muestral del grupo correspondiente. $**p<0.01$.

3.1.2 – Experimento 2: efecto de la inyección de cicloheximida sistémica durante la re-exposición a 40 ECs en la memoria del CCP.

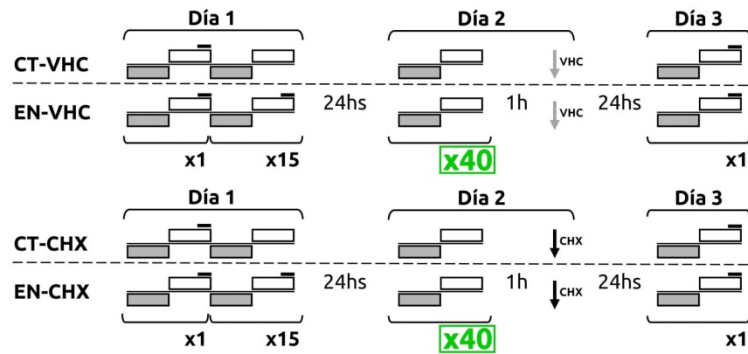
En el siguiente experimento, se puso a prueba la hipótesis 1 de trabajo que indicaba que un número intermedio de re-exposiciones al contexto producirían el arresto de la labilización generado por la presentación de los primeros ECs, evidenciado por la falta de efecto amnésico de la droga, y que además estas re-exposiciones serían insuficientes para generar una memoria de extinción. Con el fin de explorar el objetivo 1 e indagar en la cantidad de ECs necesarios para producir esta fase transitoria o limbo de la memoria, se diseñó un protocolo que consistió en 4 grupos experimentales (Fig. 3.2 A y B). El protocolo fue el mismo que el utilizado en el experimento 1, con la salvedad que en este caso se realizó en el día 2 una re-exposición a 40 ECs.

Al analizar el nivel de respuesta de los animales frente al EVP en la sesión de pre-entrenamiento del día 1 (Fig. 3.2 C), el ANOVA no arrojó diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(3,148)}=0.442$; $p=0.724$], lo cual indica que previo al tratamiento estos parten de un nivel de respuesta similar y descarta efectos inespecíficos de grupo en los resultados posteriores.

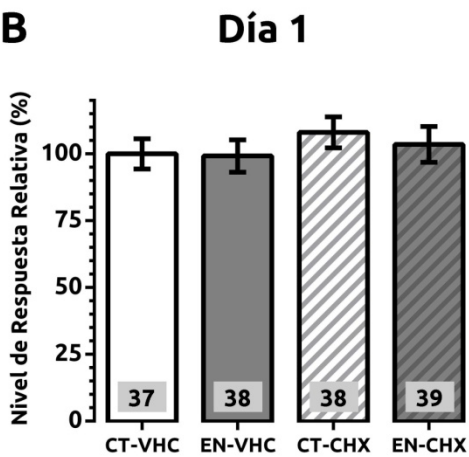
Luego, al analizar la sesión de evaluación del día 3 (Fig. 3.2 D), el ANOVA no arrojó diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(3,148)}=1.674$; $p=0.175$]. Sin embargo, al ser las comparaciones planeadas *a priori*, esto nos habilita a continuar con el análisis estadístico y realizar las comparaciones ya mencionadas. En las comparaciones planeadas, el par VHC mostró diferencias significativas [CT-VHC vs. EN-VHC: $p=0.027$], mientras que no se encontraron diferencias significativas en el par [CHX CT-CHX vs. EN-CHX: $p=0.871$]. También se contrastaron ambos grupos CT, no arrojando diferencias significativas [CT-VHC vs. CT-CHX: $p=0.234$], lo que descarta un efecto inespecífico de la droga.

Estos resultados, la retención de la memoria en el par VHC y el efecto amnésico de la droga en el par CHX, estarían indicando que una sesión de re-exposición a 40 ECs labilizarían la memoria y producirían su reconsolidación, al igual que lo ocurrido en el experimento 1. Se rechaza por lo tanto la hipótesis de que 40 presentaciones del EC sin refuerzo sean capaces de producir un estado transitorio o limbo de la memoria.

A



B



C

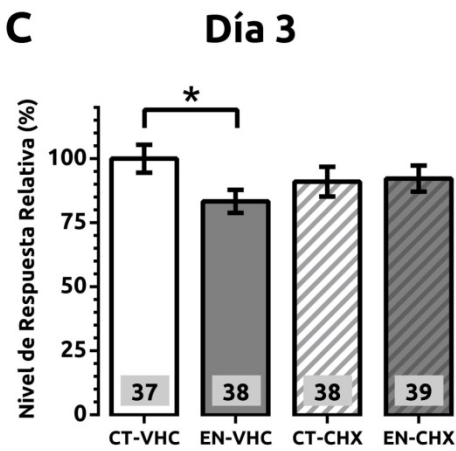


Figura 3.2. **Efecto de la inyección de cicloheximida sistémica durante la re-exposición a 40 ECs en la memoria de CCP.** **A.** Diseños experimentales. Día 1: entrenamiento estándar de 15 ensayos. Día 2: sesión de re-exposición a 40EC y posterior inyección sistémica. Día 3: sesión de evaluación. El protocolo para la condición vehículo (VHC) se encuentra en el panel superior. El protocolo para la condición cicloheximida (CHX) se encuentra en el panel inferior. Las flechas indican el momento de inyección. Los rectángulos indican el estado de iluminación del actómetro, siendo la caja blanca el EC. El guión negro al final de cada caja representa el EI. **B.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de pre-entrenamiento (Día 1), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo CT-VHC. [$F_{(3,148)}=0.442$; $p=0.724$]. **C.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de evaluación (Día 3), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo UT-VHC. [$F_{(3,148)}=1.674$; $p=0.175$; CT-VHC vs. EN-VHC: $p=0.027$; CT-VHC vs. CT-CHX: $p=0.234$; CT-CHX vs. EN-CHX: $p=0.871$]. CT: grupo control no entrenado. EN: grupo entrenado. VHC: grupo inyectado con solución vehículo. CHX: grupo inyectado con solución de cicloheximida. El número dentro de cada barra representa el tamaño muestral del grupo correspondiente. * $p<0.05$.

3.2 – Estado transitorio o limbo de la memoria ante un número intermedio de re-exposiciones al EC.

3.2.1 – Experimento 3: efecto de la inyección de cicloheximida sistémica durante la re-exposición a 80 ECs en la memoria del CCP.

Habiendo demostrado que una re-exposición de 1 o 40 ECs presentaciones del EC producen labilización y reconsolidación de la memoria del CCP, nos propusimos entonces aumentar la sesión de re-exposición a 80 ECs con el fin de poner a prueba la hipótesis 1 de trabajo. En este caso se aplicó un protocolo que consistió en 4 grupos experimentales (Fig. 3.3 A y B), el cuál fue el mismo que el utilizado en el experimento 1, pero con una re-exposición de 80 ECs en el día 2.

Al analizar el nivel de respuesta de los animales frente al EVP en la sesión de pre-entrenamiento del día 1 (Fig. 3.3 C), el ANOVA no arrojó diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(3,139)}=0.818$; $p=0.486$], lo cual indica que previo al tratamiento estos parten de un nivel de respuesta similar y descarta efectos inespecíficos de grupo en los resultados posteriores.

Luego, al analizar la sesión de evaluación del día 3 (Fig. 3.3 D), el ANOVA arrojó diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(3,139)}=4.607$; $p=0.004$]. En las comparaciones planeadas, ambos pares VHX y CHX mostraron diferencias significativas [CT-VHC vs. EN-VHC: $p=0.009$; CT-CHX vs. EN-CHX: $p=0.012$]. También se contrastaron ambos grupos CT, no arrojando diferencias significativas [CT-VHC vs. CT-CHX: $p=0.791$], lo que descartaría un posible efecto inespecífico de la droga.

Estos resultados, la retención de la memoria en el par VHC y en el par CHX, estarían indicando que una sesión de re-exposición a 80 ECs no estarían labilizando la memoria, ya que no se ve un efecto amnésico en el par CHX. Más aún, este número de re-exposiciones al contexto son insuficientes para generar una memoria de extinción ya que se observa retención de la memoria en el par VHC. Los resultados estarían sugiriendo la presencia de una fase transitoria de la memoria, en la cual la memoria original no entra en una fase de labilización/reconsolidación ni tampoco es inhibida por la generación de una nueva memoria de extinción.

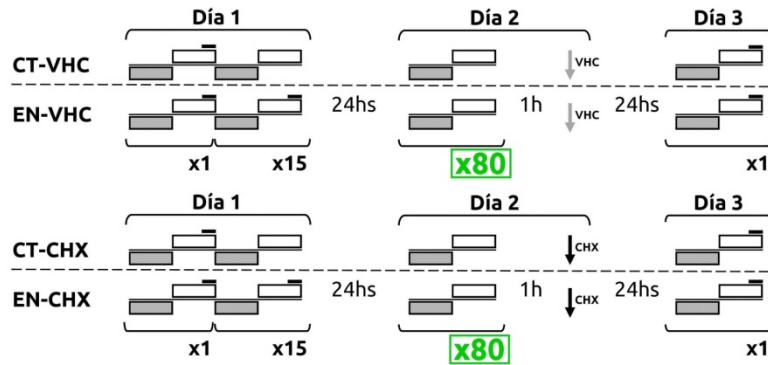
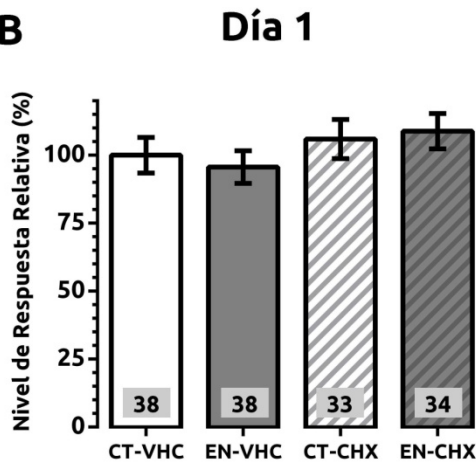
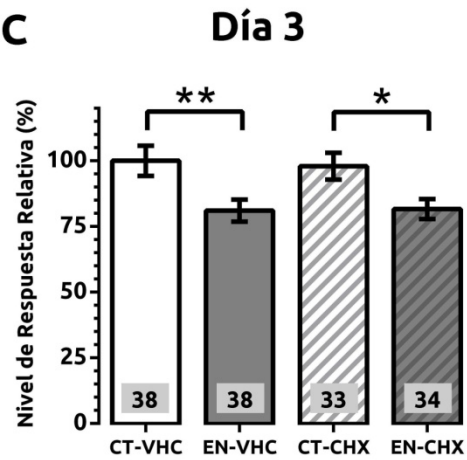
A**B****C**

Figura 3.3. **Efecto de la inyección de cicloheximida sistémica durante la re-exposición a 80 ECs en la memoria de CCP.** **A.** Diseños experimentales. Día 1: entrenamiento estándar de 15 ensayos. Día 2: sesión de re-exposición a 80EC y posterior inyección sistémica. Día 3: sesión de evaluación. El protocolo para la condición vehículo (VHC) se encuentra en el panel superior. El protocolo para la condición cicloheximida (CHX) se encuentra en el panel inferior. Las flechas indican el momento de inyección. Los rectángulos indican el estado de iluminación del actómetro, siendo la caja blanca el EC. El guión negro al final de cada caja representa el EI. **B.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de pre-entrenamiento (Día 1), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo CT-VHC. [$F_{(3,139)}=0.818$; $p=0.486$]. **C.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de evaluación (Día 3), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo CT-VHC. [$F_{(3,139)}=4.607$; $p=0.004$; CT-VHC vs. EN-VHC: $p=0.009$; CT-VHC vs. CT-CHX: $p=0.791$; CT-CHX vs. EN-CHX: $p=0.012$]. CT: grupo control no entrenado. EN: grupo entrenado. VHC: grupo inyectado con solución vehículo. CHX: grupo inyectado con solución de cicloheximida. El número dentro de cada barra representa el tamaño muestral del grupo correspondiente. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

3.2.2 – Experimento 4: estudio de la reconsolidación y el estado limbo de la memoria del CCP con una re-exposición a 1 EC y 80 ECs.

Habiéndose cumplido el objetivo 1 de trabajo y una vez demostrado que una re-exposición de 80 ECs producen una fase transitoria o limbo de la memoria, nos propusimos entonces replicar estos resultados en un experimento donde se pueda ver el efecto o no efecto amnésico de la droga de acuerdo al destino que toma la memoria (reconsolidación o limbo) por la cantidad de ECs presentados en la re-exposición. En este experimento se utilizó un protocolo que consistió en 6 grupos experimentales (Fig. 3.4 A y B). Al igual que en el experimento 1 se formaron pares de grupos EN/CT. En este caso, en el día 2, el primer par no fue re-expuesto al EC, el segundo par fue re-expuesto a 1 EC y el tercer par a 80 ECs. Luego, 1 hora después de la re-exposición, todos los grupos fueron inyectados con CHX. Finalmente en el día 3, al igual que en el experimento 1, la memoria fue evaluada.

Al analizar el nivel de respuesta de los animales frente al EVP en la sesión de pre-entrenamiento del día 1 (Fig. 3.4 C), el ANOVA no arrojó diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(5,207)}=0.398$; $p=0.850$], lo cual indica que previo al tratamiento estos parten de un nivel de respuesta similar y descartan efectos inespecíficos de grupo en los resultados posteriores.

Luego, al analizar la sesión de evaluación del día 3 (Fig. 3.4 D), el ANOVA arrojó diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(5,207)}=3.281$; $p=0.007$]. En las comparaciones planeadas, ambos pares NR y 80 EC mostraron diferencias significativas [CT-NR vs. EN-NR: $p=0.016$; CT-80EC vs. EN-80EC: $p=0.013$], mientras que el par 1 EC no [CT-1EC vs. EN-1EC: $p=0.472$].

Estos resultados, la retención de la memoria en los pares NR y 80 EC, y la no retención de la memoria en el par 1 EC indican: 1) que es condición necesaria que la memoria sea reactivada con una sesión de re-exposición para que la misma entre en labilización/reconsolidación, ya que la droga no tuvo efecto en el par NR; 2) que una sesión de re-exposición de 1 EC es suficiente para labilizar la memoria ya que se observa un efecto amnésico de la droga en el par 1 EC; y 3) que una sesión de re-exposición a 80 ECs no labiliza la memoria, lo cual se condice con los resultados obtenidos en el experimento 3, ya que no se ve un efecto amnésico en el par 80 EC. Estos resultados no solo confirman lo observado en los experimentos anteriores, si no que descartan que la falta de amnesia en el experimento 3 se deba a una solución de CHX defectuosa. Asimismo, estas observaciones refuerzan la hipótesis de la existencia de una fase transitoria o limbo de la memoria con una re-exposición a 80 ECs.

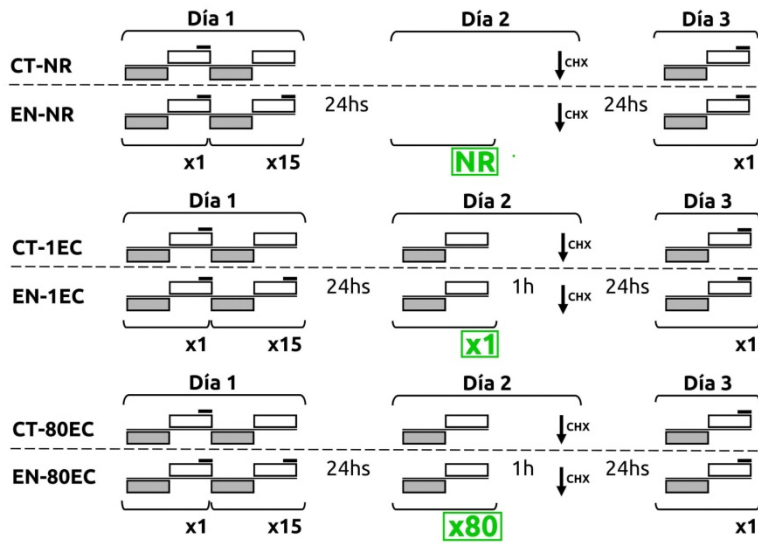
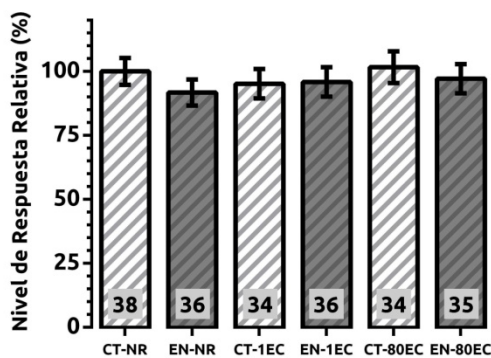
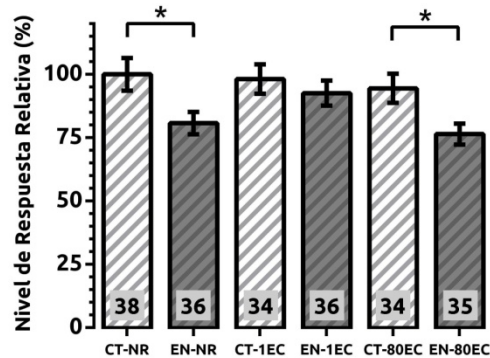
A**B****Día 1****C****Día 3**

Figura 3.4. **Estudio de la reconsolidación y el estado limbo de la memoria del CCP con una re-exposición a 1 EC y 80 ECs.** **A.** Diseños experimentales. Día 1: entrenamiento estándar de 15 ensayos. Día 2: sesión de re-exposición a 1EC o 80EC y posterior inyección sistémica. NR: no re-expuesto. Día 3: sesión de evaluación. Las flechas indican el momento de inyección. Los rectángulos indican el estado de iluminación del actómetro, siendo la caja blanca el EC. El guión negro al final de cada caja representa el EI. **B.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de pre-entrenamiento (Día 1), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo CT-NR. [$F_{(5,207)}=0.398$; $p=0.850$]. **C.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de evaluación (Día 3), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo CT-NR. [$F_{(5,207)}=3.281$; $p=0.007$; CT-NR vs. EN-NR: $p=0.016$; CT-1EC vs. EN-1EC: $p=0.472$; CT-80EC vs. EN-80EC: $p=0.013$]. CT: grupo control no entrenado. EN: grupo entrenado. NR: grupo no re-expuesto. 1EC: grupo re-expuesto a 1EC. 80EC: grupo re-expuesto a 80EC. CHX: grupo inyectado con solución de cicloheximida. El número dentro de cada barra representa el tamaño muestral del grupo correspondiente. * $p<0.05$.

3.2.3 – Experimento 5: efecto de la inyección de cicloheximida sistémica durante la re-exposición a 160 ECs en la memoria del CCP.

Habiendo demostrado que una re-exposición al contexto de 80 ECs producen una fase transitoria o limbo de la memoria, nos propusimos entonces aumentar la sesión de re-exposición a 160 ECs con el fin de hallar el número de ensayos suficientes para generar una memoria de extinción que inhiba la expresión de la memoria aversiva original. Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la memoria de extinción puede ser generada con una o varias re-exposiciones al contexto de entrenamiento sin refuerzo, siempre y cuando el tiempo de re-exposición tenga una duración que supere las 2 horas (Pedreira y Maldonado, 2003; Hepp et al., 2010; Fustiñana et al., 2013). Sin embargo, en el caso memorias del CCP, ningún trabajo respetó, en la sesión de re-exposición, los mismos tiempos de exposición al EC que los del entrenamiento. En estos casos, donde se presenta el EC de forma discreta, el error de predicción se da con la finalización de cada presentación del EC, por lo que en un protocolo de extinción la cantidad de presentaciones también juega un rol importante junto con el tiempo total de exposición. A partir de esto surge la hipótesis de que respetando estos tiempos, una re-exposición a 160 ECs sería suficiente para generar una memoria de extinción, aunque estos 160 ensayos sólo sumen 72 minutos de re-exposición al EC. En este caso se aplicó un protocolo que consistió en 4 grupos experimentales (Fig. 3.5 A y B), el cuál fue el mismo que el utilizado en el experimento 1, con una re-exposición a 160 ECs en el día 2.

Al analizar el nivel de respuesta de los animales frente al EVP en la sesión de pre-entrenamiento del día 1 (Fig. 3.5 C), el ANOVA no arrojó diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(3,122)}=0.445$; $p=0.721$], lo cual indica que previo al tratamiento estos parten de un nivel de respuesta similar y descarta efectos inespecíficos de grupo en los resultados posteriores.

Luego, al analizar la sesión de evaluación del día 3 (Fig. 3.5 D), el ANOVA arrojó diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(3,122)}=6.072$; $p=0.001$]. En las comparaciones planeadas, ambos pares VHX y CHX mostraron diferencias significativas [CT-VHC vs. EN-VHC: $p=0.009$; CT-CHX vs. EN-CHX: $p=0.014$]. También se contrastaron ambos grupos CT, no arrojando diferencias significativas [CT-VHC vs. CT-CHX: $p=0.093$], lo que descarta un efecto inespecífico de la droga.

Estos resultados, la retención de la memoria en el par VHC y en el par CHX, estarían indicando que una sesión de re-exposición a 160 ECs no disparan la reconsolidación ni extinción de la memoria del CCP, rechazando la hipótesis planteada. La diferencia en el nivel de respuesta del par VHC indica que 160 ECs no son suficientes para extinguir la memoria CCP. La ausencia de un efecto amnésico en el par CHX indica la ausencia de labilización de la memoria original. Estos resultados sugieren la presencia de una fase transitoria o limbo de la memoria con una re-exposición a 160 ECs, al igual que lo obtenido con 80 ECs.

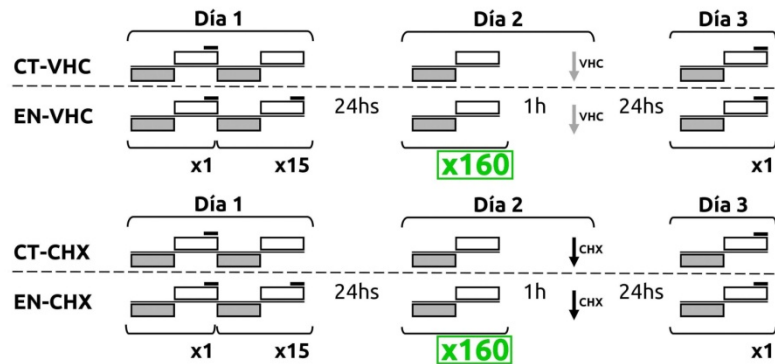
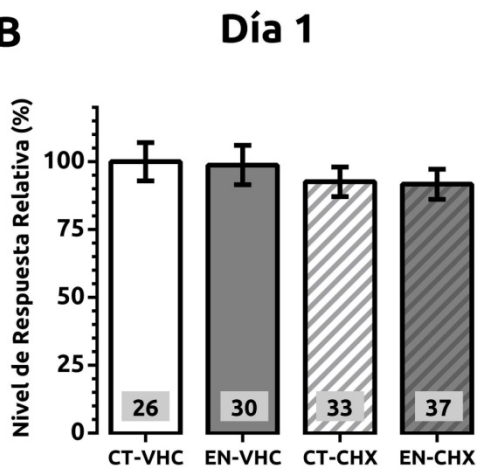
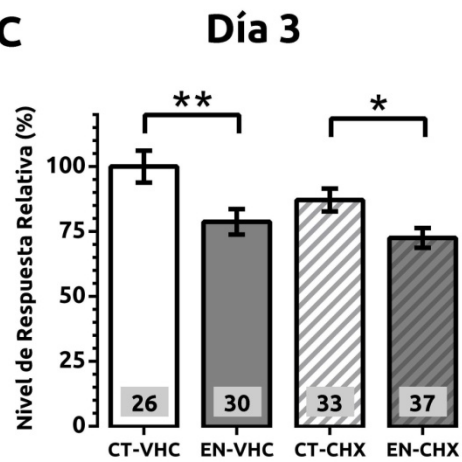
A**B****C**

Figura 3.5. **Efecto de la inyección de cicloheximida sistémica durante la re-exposición a 160 ECs en la memoria de CCP.** **A.** Diseños experimentales. Día 1: entrenamiento estándar de 15 ensayos. Día 2: sesión de re-exposición a 160EC y posterior inyección sistémica. Día 3: sesión de evaluación. El protocolo para la condición vehículo (VHC) se encuentra en el panel superior. El protocolo para la condición cicloheximida (CHX) se encuentra en el panel inferior. Las flechas indican el momento de inyección. Los rectángulos indican el estado de iluminación del actómetro, siendo la caja blanca el EC. El guión negro al final de cada caja representa el EI. **B.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de pre-entrenamiento (Día 1), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo CT-VHC. [$F_{(3,122)}=0.445$; $p=0.721$]. **C.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de evaluación (Día 3), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo CT-VHC. [$F_{(3,122)}=6.072$; $p=0.001$; CT-VHC vs. EN-VHC: $p=0.009$; CT-VHC vs. CT-CHX: $p=0.093$; CT-CHX vs. EN-CHX: $p=0.014$]. CT: grupo control no entrenado. EN: grupo entrenado. VHC: grupo inyectado con solución vehículo. CHX: grupo inyectado con solución de cicloheximida. El número dentro de cada barra representa el tamaño muestral del grupo correspondiente. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

3.3 – Extinción de la memoria CCP ante 320 presentaciones del EC.

3.3.1 – Experimento 6: efecto de la inyección de cicloheximida sistémica en la extinción de la memoria del CCP inducida por una re-exposición a 320 ECs.

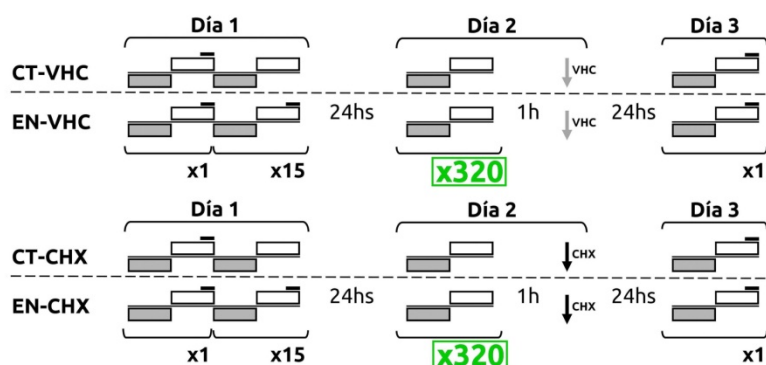
Habiendo demostrado que la fase transitoria o limbo es producida ante una re-exposición al contexto de 80 y 160 ECs, nos propusimos entonces aumentar la sesión de re-exposición a 320 ECs con el fin de hallar el número de ensayos suficientes para generar una memoria de extinción. En este caso, 320 ensayos computan las 2 horas de re-exposición que son condición necesaria para generar una memoria de extinción, según reportan trabajos previos (Pedreira y Maldonado, 2003; Hepp et al., 2010; Fustiñana et al., 2013). Se utilizó un protocolo que consistió en 4 grupos experimentales (Fig. 3.6 A y B), el cuál fue el mismo que el utilizado en el experimento 1, con la salvedad que en este caso se realizó en el día 2 una re-exposición a 320 ECs.

Al analizar el nivel de respuesta de los animales frente al EVP en la sesión de pre-entrenamiento del día 1 (Fig. 3.6 C), el ANOVA no arrojó diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(3,152)}=1.124$; $p=0.341$], lo cual indica que previo al tratamiento estos parten de un nivel de respuesta similar y descarta posibles efectos inespecíficos de grupo en los resultados posteriores.

Luego, al analizar la sesión de evaluación del día 3 (Fig. 3.6 D), el ANOVA arrojó diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(3,152)}=3.317$; $p=0.022$]. En las comparaciones planeadas, el par CHX mostró diferencias significativas [CT-CHX vs. EN-CHX: $p=0.013$], mientras que no se encontraron diferencias significativas en el par VHC [CT-VHC vs. EN-VHC: $p=0.857$]. También se contrastaron ambos grupos CT, no arrojando diferencias significativas [CT-VHC vs. CT-CHX: $p=0.858$], lo que descarta un efecto inespecífico de la droga.

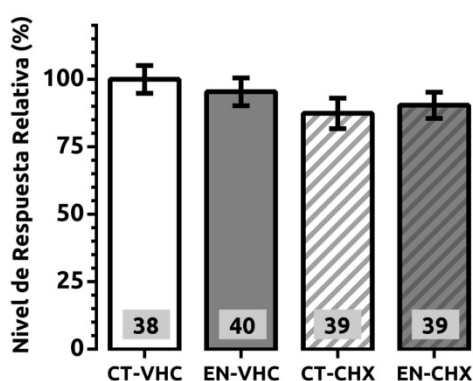
Estos resultados, la retención de la memoria en el par CHX y el efecto amnésico del par VHC, indican que una sesión de re-exposición a 320 ECs genera una nueva memoria de extinción, ya que existe un efecto amnésico en el par VHC generado por la memoria de extinción que inhibe la RC. Además, la retención de la memoria en el par CHX se interpreta por expresión de la memoria aversiva original debido a la interferencia de la droga en la consolidación de la memoria de extinción. Estos resultados indican que la presentación de 320 ECs en animales con memoria de CCP consolidada induce la extinción de dicha memoria e inhibición de la respuesta condicionada.

A



B

Día 1



C

Día 3

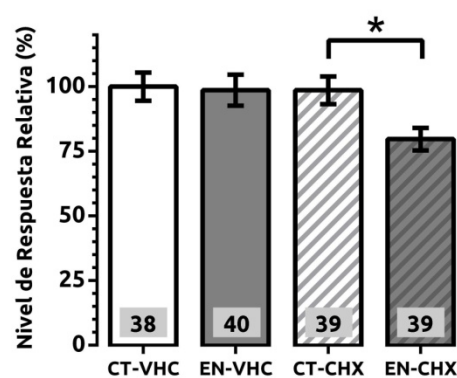


Figura 3.6. **Efecto de la inyección de cicloheximida sistémica en la extinción de la memoria del CCP inducida por una re-exposición a 320 ECs.** **A.** Diseños experimentales. Día 1: entrenamiento estándar de 15 ensayos. Día 2: sesión de re-exposición a 320EC y posterior inyección sistémica. Día 3: sesión de evaluación. El protocolo para la condición vehículo (VHC) se encuentra en el panel superior. El protocolo para la condición cicloheximida (CHX) se encuentra en el panel inferior. Las flechas indican el momento de inyección. Los rectángulos indican el estado de iluminación del actómetro, siendo la caja blanca el EC. El guión negro al final de cada caja representa el EI. **B.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de pre-entrenamiento (Día 1), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo CT-VHC. [$F_{(3,152)}=1.124$; $p=0.341$]. **C.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de evaluación (Día 3), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo CT-VHC. [$F_{(3,152)}=3.317$; $p=0.022$; CT-VHC vs. EN-VHC: $p=0.857$; CT-VHC vs. CT-CHX: $p=0.858$; CT-CHX vs. EN-CHX: $p=0.013$]. CT: grupo control no entrenado. EN: grupo entrenado. VHC: grupo inyectado con solución vehículo. CHX: grupo inyectado con solución de cicloheximida. El número dentro de cada barra representa el tamaño muestral del grupo correspondiente. * $p<0.05$.

3.4 – Condiciones limitantes a la inducción de limbo: fuerza de la memoria.

3.4.1 – Experimento 7: efecto de la fuerza de la memoria en las condiciones paramétricas que inducen la fase limbo.

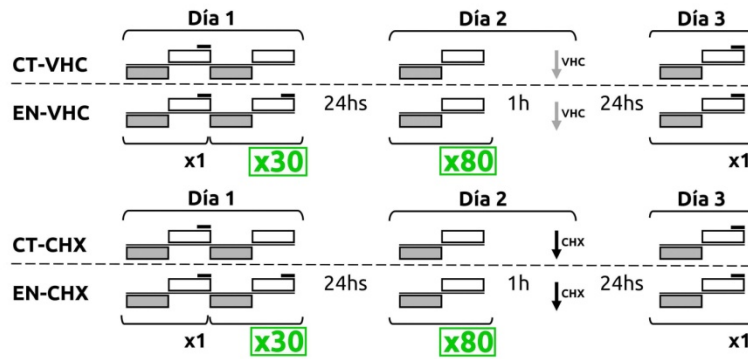
En este último experimento se puso a prueba la hipótesis 2 de trabajo que sostiene que las condiciones paramétricas para inducir el estado limbo dependen, entre otras variables, de la fuerza de la memoria en cuestión. Esta hipótesis se basa en observaciones anteriores que indican que una memoria más fuerte necesita una exposición más extendida al EC ser labilizada y reconsolidada (Suzuki et al., 2004). Se espera, por lo tanto, que en una memoria fuerte de 30 ensayos una re-exposición a 80 ECs sea insuficiente para evitar el arresto de la labilización/reconsolidación de la memoria y entrar así en la fase transitoria o limbo. En este último experimento 7, se aplicó un protocolo que consistió en 4 grupos experimentales (Fig. 3.7 A y B), el cuál fue el mismo que el utilizado en el experimento 3, con la salvedad que en este caso se realizó en el día 1 un entrenamiento fuerte de 30 ensayos.

Al analizar el nivel de respuesta de los animales frente al EVP en la sesión de pre-entrenamiento del día 1 (Fig. 3.7 C), el ANOVA no arrojó diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(3,145)}=0.947$; $p=0.420$], lo cual indica que previo al tratamiento estos parten de un nivel de respuesta similar y descarta efectos inespecíficos de grupo en los resultados posteriores.

Luego, al analizar la sesión de evaluación del día 3 (Fig. 3.7 D), el ANOVA arrojó diferencias significativas entre grupos [ANOVA: $F_{(3,145)}=4.698$; $p=0.004$]. En las comparaciones planeadas, el par VHC mostró diferencias significativas [CT-VHC vs. EN-VHC: $p=0.004$], mientras que no se encontraron diferencias significativas en el par CHX [CT-CHX vs. EN-CHX: $p=0.576$]. También se contrastaron ambos grupos CT, no arrojando diferencias significativas [CT-VHC vs. CT-CHX: $p=0.457$], lo que descartaría un posible efecto inespecífico de la droga.

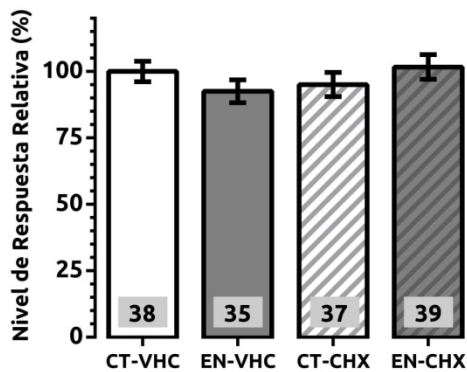
Estos resultados, la retención de la memoria en el par VHC y el efecto amnésico de la droga en el par CHX, indican que una sesión de re-exposición a 80 ECs labilizarían la memoria del CCP cuando esta traza es más fuerte y producirían su reconsolidación, al igual que lo ocurrido en el experimento 1 y 2, y en contraposición a lo obtenido en el experimento 3 con la misma re-exposición. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la fuerza de la traza mnésica juega un rol importante en el destino que toma esta memoria con la reactivación, y se suman a la vasta evidencia que existe acerca de la fuerza de la traza mnésica como condición limitante para desencadenar el proceso de labilización/reconsolidación (Dudai and Eisenberg, 2004; Suzuki et al., 2004; Forcato et al., 2013).

A



B

Día 1



C

Día 3

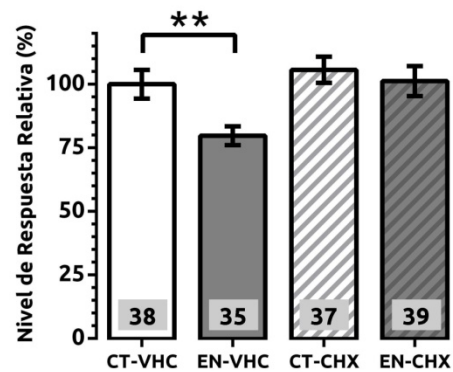


Figura 3.7. **Efecto de la fuerza de la memoria en las condiciones paramétricas que inducen la fase limbo.** **A.** Diseños experimentales. Día 1: entrenamiento fuerte de 30 ensayos. Día 2: sesión de re-exposición a 80EC y posterior inyección sistémica. Día 3: sesión de evaluación. El protocolo para la condición vehículo (VHC) se encuentra en el panel superior. El protocolo para la condición cicloheximida (CHX) se encuentra en el panel inferior. Las flechas indican el momento de inyección. Los rectángulos indican el estado de iluminación del actómetro, siendo la caja blanca el EC. El guión negro al final de cada caja representa el EI. **B.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de pre-entrenamiento (Día 1), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo CT-VHC. [$F_{(3,145)}=0.947$; $p=0.420$]. **C.** Respuesta media \pm SEM para la sesión de evaluación (Día 3), normalizada con respecto a la respuesta media del grupo CT-VHC. [$F_{(3,145)}=4.698$; $p=0.004$; CT-VHC vs. EN-VHC: $p=0.004$; CT-VHC vs. CT-CHX: $p=0.457$; CT-CHX vs. EN-CHX: $p=0.576$]. CT: grupo control no entrenado. EN: grupo entrenado. VHC: grupo inyectado con solución vehículo. CHX: grupo inyectado con solución de cicloheximida. El número dentro de cada barra representa el tamaño muestral del grupo correspondiente. ** $p<0.01$.

Discusión

A continuación repasaremos los objetivos y resultados obtenidos en esta Tesis, para luego analizar cada uno de ellos con mayor profundidad:

Como objetivo general de esta Tesis nos propusimos estudiar la conservación evolutiva del limbo en un animal invertebrado como lo es el cangrejo *Neohelice granulata*, para lo cual planteamos dos objetivos de trabajo.

1. Como primer objetivo nos propusimos estudiar las condiciones paramétricas necesarias para desencadenar limbo. En particular indagamos acerca de la cantidad de exposiciones al EC necesarias para disparar dicho proceso haciendo uso de una herramienta farmacológica como la cicloheximida para poder disecar el limbo. Los resultados revelaron que 1 o 40 presentaciones del EC desencadenan el proceso de reconsolidación y dejan la memoria sensible al agente amnésico cicloheximida. Por otro lado, una re-exposición a 80 o 160 ECs deja la memoria original en un estado insensible o limbo, caracterizado por la ausencia de efecto amnésico de la cicloheximida, y dicha re-exposición es insuficiente para desencadenar el proceso de extinción. Finalmente, 320 presentaciones del EC producen la adquisición de una memoria de extinción. Los resultados, consistentes con la hipótesis 1, indican que existe un estado insensible o limbo de la memoria del CCP en el cangrejo, desencadenado por una re-exposición a un número intermedio de ECs. Esto sugiere, junto con los antecedentes en roedores y humanos, que el limbo se trataría de un proceso evolutivamente conservado.
2. Como segundo objetivo nos propusimos estudiar las condiciones limitantes para que se desencadene el limbo. En particular nos preguntamos cuál es el efecto que tiene la fuerza de la traza mnésica sobre el destino de la memoria luego de la re-exposición. Para responder a esta pregunta aumentamos la fuerza del entrenamiento y re-expusimos a un número intermedio de ECs. Los resultados indicaron que mientras que en una memoria adquirida por un entrenamiento estándar de 15 ensayos, una re-exposición a 80 ECs lleva a un estado limbo de la memoria, caracterizado por la ausencia del efecto amnésico de la cicloheximida, en una memoria adquirida por un entrenamiento fuerte de 30 ensayos la misma re-exposición produce reconsolidación, dejando la memoria sensible a la cicloheximida. Los resultados, consistentes con la hipótesis 2, indican que la fuerza de la traza mnésica es una condición limitante para desencadenar limbo y sugieren que con el aumento de la fuerza de la traza mnésica existe un corrimiento “hacia la derecha” del número de ECs necesarios para desencadenar limbo.

4.1 - Antecedentes de aprendizaje y memoria en el cangrejo.

Durante los últimos 30 años aproximadamente nuestro laboratorio se ha dedicado al estudio del aprendizaje y la memoria en el cangrejo *Neohelice granulata*. Estos trabajos fueron obtenidos gracias al desarrollo de dos paradigmas de aprendizaje asociativo en el cangrejo.

El primero, denominado memoria contexto-señal (CSM), se trata de una memoria adquirida a partir de la asociación entre las características del ambiente de

entrenamiento (contexto) y el estímulo visual de peligro (EVP, señal) (Tomsic et al., 1998). Este tipo de memoria genera una fuerte respuesta de inmovilidad cuantificable (Pereyra, Saraco y Maldonado, 1999) la cual se mantiene por al menos 5 días (Lozada, Romano y Maldonado, 1990), siempre y cuando sea adquirida mediante un entrenamiento en el cuál se presente la señal de forma espaciada y en una repetición de al menos 15 veces (Freudenthal et al., 1998; Locatelli et al., 2002). Esta memoria es sensible a la cicloheximida en su fase de consolidación cuando la droga es administrada en una ventana temporal entre 1h a 6hs luego del entrenamiento (Pedreira et al., 1995). Para una CSM consolidada, la presentación del contexto de entrenamiento durante 5 min continuos y sin EVP son suficientes para labilizar la memoria y desencadenar el proceso de reconsolidación (Pedreira y Maldonado, 2002), lo cual abre una ventana temporal de sensibilidad a la cicloheximida de hasta 6hs de duración post re-exposición. Luego, la memoria de extinción bajo este paradigma se adquiere con no menos de 1h de re-exposición al contexto sin refuerzo (Pedreira y Maldonado, 2003; Hepp et al., 2010) presentando características diagnósticas como la recuperación espontánea (Merlo y Romano, 2008; Pérez-Cuesta et al., 2009; Hepp et al., 2010). Cabe aclarar, que en la CSM el contexto es presentado de forma continua tanto en la sesión de entrenamiento como en las sesiones de re-exposición y evaluación, por lo que el tiempo de exposición al contexto es el tiempo de permanencia del animal en el dispositivo.

El segundo paradigma estudiado, y utilizado en esta Tesis, se denomina condicionamiento contextual Pavloviano (CCP). A diferencia del CSM, en el CCP el contexto (EC) y el estímulo visual de peligro (EI) son presentados de forma discreta. Aquí el animal aprende a asociar estos dos estímulos presentados: el EC y el EI. La memoria del CCP se adquiere mediante la presentación contingente del EC con el EI con una repetición de al menos 15 presentaciones espaciadas, y genera una memoria robusta de al menos 5 días de duración (Fustiñana et al., 2013). Esta memoria presenta sensibilidad a la cicloheximida tanto en su fase de consolidación como de reconsolidación. Para una memoria del CCP consolidada, la presentación discreta de 1 EC (de 27 seg de duración) sin EVP produce la labilización/reconsolidación de la memoria, mientras que la memoria de extinción se obtiene típicamente con 15 presentaciones de EC (de 8 min de duración cada una, lo cual computa un total de 2 hs de re-exposición al EC) (Fustiñana et al., 2013). A la hora de decidirse el destino que tomará la memoria parecería ser que no solo la cantidad de presentaciones del EC son importantes, sino también el tiempo total de exposición al estímulo. El animal es capaz no solo de discriminar estos tiempos de presentación del EC, sino también los intervalos entre ECs (López et al., 2016). Hasta ahora ningún trabajo exploró qué destino toma la memoria con un número intermedio de presentaciones del EC en conjunto con el uso de una herramienta farmacológica para discernir qué fase de la memoria se está llevando a cabo. A diferencia del protocolo clásico de extinción, en esta Tesis nuestro protocolo intentó respetar en la sesión de re-exposición los mismos tiempos de presentación del EC del entrenamiento para mantener esa variable constante y hacer énfasis en el número de presentaciones necesarios para desencadenar limbo. Para lograr esto fue necesario reducir los intervalos entre ECs en la re-exposición, con respecto a los intervalos del entrenamiento, para que la sesión de re-exposición sea viable en una jornada de trabajo. No descartamos los efectos que pueda llegar a tener esta manipulación. Nuestros resultados con una re-exposición a 1 EC se condicen con los antecedentes de reconsolidación del CCP en el

cangrejo. Además, es interesante destacar que obtuvimos una memoria de extinción con 320 presentaciones del EC (de 27 seg de duración cada una), lo cual computa un total de 144 min que superan a los 120 min reportados por los antecedentes en el cangrejo (Carbó-Tano, 2013; Fustiñana et al., 2013).

4.2 - Condiciones paramétricas de la fase limbo del CCP.

Los distintos procesos de memoria, como la consolidación, reconsolidación y extinción, han sido evidenciados en distintos animales vertebrados e invertebrados (Nader et al., 2000; Berman y Dudai, 2001; Pedreira et al., 2002; Troncoso y Maldonado, 2002; Pedreira y Maldonado, 2003). Encontrar los mismos procesos en animales tan alejados evolutivamente indica que se tratarían de mecanismos que aumentan significativamente las posibilidades de supervivencia de estos animales. Las memorias que subyacen a estos procesos forman representaciones internas del medio externo a partir de la experiencia, y esto les permite a los animales adaptarse al medio ambiente y/o predecir situaciones futuras y actuar en consecuencia, lo cual aumenta considerablemente su valor adaptativo. Trabajos recientes en roedores y humanos (Flavell y Lee, 2013; Merlo et al., 2014; Sevenster et al., 2014; Merlo et al., 2018) han demostrado la presencia de una fase transitoria o limbo segregando los procesos de reconsolidación y extinción, pero no existen evidencias de esta fase en animales invertebrados. De estos antecedentes se desprende el objetivo general de este trabajo, el cual buscaba indagar acerca de la conservación evolutiva del limbo en el cangrejo *Neohelice granulata*.

La primera serie de experimentos de esta tesis tuvo como objetivo el estudio de las condiciones paramétricas necesarias para desencadenar limbo en el cangrejo, donde se indagó acerca de la cantidad de presentaciones del EC necesarias para disparar dicho proceso. En esta sección se puso a prueba la hipótesis de que la exposición a un número intermedio de ECs en animales con memoria consolidada es incapaz de disparar tanto el proceso de reconsolidación como el de extinción, dejando a la memoria en un estado transitorio.

Los resultados obtenidos indican que 1 o 40 presentaciones del EC labilizan la memoria y desencadenan el proceso de reconsolidación, dejando la memoria sensible al agente amnésico cicloheximida. Por otro lado, una re-exposición a 80 o 160 ECs deja la memoria original en limbo, caracterizado por la ausencia de efecto amnésico de la cicloheximida, y es insuficiente para desencadenar el proceso de extinción, lo cual va a favor de la hipótesis planteada. Finalmente, 320 presentaciones del EC producen la adquisición de una memoria de extinción. Cabe aclarar, con respecto a este último experimento, que no se aplicó ninguno de los protocolos de reversión (Myers y Davis, 2002). De acuerdo a los antecedentes en cangrejos (Merlo et. al, 2008; Hepp et al., 2010; Carbó-Tano, 2013; Fustiñana et al., 2013), la recuperación espontánea hubiera sido el protocolo adecuado para corroborar que efectivamente se trate de una memoria de extinción. Este protocolo consiste en realizar una sesión de evaluación 72hs luego de la sesión de re-exposición para observar el retorno de la respuesta condicionada. Sin embargo, este experimento replica parte de los resultados observados en estos antecedentes de extinción del CCP, donde se observa que 24hs luego de la sesión de extinción el grupo vehículo no presenta retención de la memoria, consistente con la generación de una memoria de extinción inhibitoria de la RC; y el grupo tratado con el agente amnésico presenta retención de

la memoria debido a la interferencia en la consolidación de la memoria de extinción (Fustiñana et al., 2013). Basados en estos antecedentes podemos esperar que nuestros resultados obtenidos en el experimento 6 (Fig. 3.6) se deban efectivamente a la generación de una memoria de extinción.

A partir de la memoria asociativa entre el EC y el EI, el animal tiene la capacidad de predecir la ocurrencia del EI con la sola presentación del EC, por lo que genera una RC. Sin embargo, con cada presentación del EC sin refuerzo se genera un error en la predicción (EP) entre lo que el animal espera (EI) y lo que en realidad ocurre (no EI) (Pedreira et al., 2004). Este EP sería el motor no solo del proceso de adquisición de la memoria sino también condición necesaria para iniciar la labilización/reconsolidación (Exton-McGuinness et al., 2015; Sevenster et al., 2014). Además, la ausencia de refuerzo (EP negativo) no es la única forma de generar un EP. Se ha descrito en el cangrejo (López et al., 2016) que la memoria también puede ser desestabilizada mediante un EP temporal (que se trata de alteraciones en los tiempos de presentación del EI durante la re-exposición con respecto a los tiempos del entrenamiento), o también mediante la alteración de los intervalos entre estímulos. Por otro lado, se puede generar un error en la predicción denominado EP positivo cuando se entrena al cangrejo con un refuerzo del 50% y se lo re-expone a una sesión totalmente reforzada (López et al., 2016).

Si lo que ocurre no se aleja mucho de lo que el animal espera, pero aún así no se cumple la predicción en su totalidad ya que el evento ocurrido presenta pequeñas características distintivas, es coherente que la memoria asociativa no se pierda pero que aún así exista un mecanismo que permita incorporar nueva información a la traza original, caso contrario las asociaciones generadas por primera vez serían inmutables y no permitirían incorporar pequeñas variaciones. La reconsolidación sería el proceso mediante el cual una memoria puede actualizarse tanto en fuerza como en contenido (Lee et al., 2009). Así, pocas presentaciones del EC no reforzado significan un EP que desencadena el proceso de labilización y posterior reconsolidación de la memoria, que permite una actualización en contenido (Alberini, 2011; Finnie y Nader, 2012; Forcato et al., 2014; Lee, 2009). Por otro lado, cuando el animal pasa por una experiencia en donde lo ocurrido se aleja mucho de lo esperado, es coherente que exista algún proceso que pueda alterar la respuesta comportamental. Pero por otro lado aportaría un gran valor adaptativo que este proceso cumpla con su objetivo sin la necesidad de deshacer la traza original, ya que llegado el caso que esta nueva experiencia no se vuelva a repetir en un futuro, sería adecuado que la traza de la memoria EC-EI siga vigente (Pavlov, 1927; Bouton, 2004; Hepp et al., 2010). Así, muchas presentaciones del EC no reforzado significan sucesivos EP que desencadenan el proceso de consolidación de una memoria de extinción, una traza paralela e inhibitoria de la traza asociativa original. Ahora bien, en la naturaleza se generan situaciones intermedias en donde los eventos predichos por el animal no se encuentran ni muy cerca ni muy lejos de lo realmente ocurrido. Se espera que estos eventos no pongan en juego la memoria original, ya que de no volver a repetirse este evento, una actualización considerable de contenido en la traza original podría resultar perjudicial para la supervivencia del animal. Por otro lado, tampoco resultaría adaptativo la generación de una traza inhibitoria de la RC ya que durante el tiempo en el que domine esta traza la RC se verá reducida. Que un evento de tales características inhiba la RC también podría resultar perjudicial para el animal. Así, un número intermedio de presentaciones del EC gatillan una fase transitoria cuya

función probable podría ser la de proteger la traza original y la RC. Sin embargo, existe también evidencia en roedores de una reducción de la RC ante una re-exposición limbo que no puede ser interpretada como memoria de extinción (Merlo et al., 2014; Cassini et al., 2017; Merlo et al., 2018), lo cuál iría en contra de la hipótesis de que el limbo sería un mecanismo de protección de la traza original y la RC. La escasa evidencia al día de hoy, incluyendo la presentada en este trabajo, no permite discernir cuál sería la función biológica del limbo.

En resumen, la fase limbo se encuentra presente en el cangrejo *Neohelice granulata* en un paradigma de CCP y se hace evidente cuando se re-expone al animal a un número intermedio de ECs. Estos resultados, junto con los antecedentes obtenidos en roedores y humanos (Flavell y Lee, 2013; Merlo et al., 2014; Sevenster et al., 2014; Merlo et al., 2018), indican que se trata de un proceso evolutivamente conservado caracterizado por el arresto de la labilización de la memoria del CCP.

4.3 - Condiciones limitantes de la fase limbo del CCP.

Es sabido que los distintos procesos de memoria presentan condiciones que van a limitar su ocurrencia. Una de estas condiciones limitantes es la fuerza de la traza mnésica (Morris et al., 2006; Taylor et al., 2009; Lee, 2010; Federman et al., 2012). Se sabe que las memorias fuertes son más resistentes a la reconsolidación que las memorias débiles (Suzuki et al., 2014), por lo que requerirán una re-exposición mayor para iniciar el proceso de labilización/reconsolidación. De la misma forma, las memorias fuertes son más resistentes a ser inhibidas por una memoria de extinción (Federman et al., 2014).

El último experimento de esta tesis tuvo como objetivo el estudio de las condiciones limitantes, en términos de la fuerza de la traza mnésica, para que se desencadene la fase limbo luego de la re-exposición. En esta última sección se puso a prueba la hipótesis de que la exposición a un número intermedio de ECs, que resultan suficientes para desencadenar la fase limbo en una memoria de un entrenamiento estándar (Fig. 3.3 y 3.4), son insuficientes para gatillar el limbo cuando la traza mnésica consolidada es fuerte, desencadenando en su lugar la reconsolidación de la memoria. Los resultados indican que en una memoria del CCP fuerte, una re-exposición a 80 ECs produce la reconsolidación de la memoria, lo cual no descarta la hipótesis planteada.

Según el modelo asociativo de aprendizaje, el error de predicción es considerado un fenómeno necesario no solo para la adquisición inicial de la memoria asociativa sino también para las fases de reconsolidación y extinción, que modulan la memoria original (Le Pelley, 2004; Pearce and Mackintosh, 2010; Rescorla y Wagner, 1972). Esto significa que previo a la generación de la asociación EC-EI el animal realiza una predicción acerca del EC en base a alguna traza mnésica que precede al condicionamiento. Esta predicción se trata de la no ocurrencia del EI. Si se presenta el EI asociado con el EC, existe un error en la predicción ya que lo que espera el animal (no EI) se aleja de lo que en realidad ocurre (EI). De esta forma, es condición necesaria para el aprendizaje que codifique esta nueva asociación de estímulos (EC-EI) que durante la experiencia sensorial el error de predicción sea suficientemente elevado, o lo que es lo mismo, que se presentan estos dos estímulos pareados de forma repetida lo suficiente como para generar este condicionamiento. Es en este punto donde la consolidación de la asociación inicial y la consolidación de la memoria de

extinción presentan características compartidas, la codificación de una traza ante sucesivos EP. Ahora bien, la fuerza de una memoria asociativa EC-EI depende, entre otros parámetros, de la contingencia entre estos dos estímulos, de su saliencia, y de la experiencia previa del animal con ambos estímulos. Así, la traza de memoria será más fuerte cuantas más veces se presenten estos dos estímulos de forma pareada. Luego, las predicciones generadas por el animal dependerán de la fuerza de la traza mnésica. En una traza fuerte, donde las predicciones generadas por el animal también lo serán, la no ocurrencia del evento esperado genera un EP mayor que en una traza mnésica débil. Así, un número intermedio de presentaciones del EC que significarían un EP medio para una memoria estándar, resultarían en un EP grande para una memoria fuerte, lo cual llevaría a la memoria a extinción. Sin embargo esto no fue lo que se observó en los resultados y es en este punto donde el modelo de Rescorla-Wagner no resulta adecuado para lograr interpretaciones coherentes. La sección siguiente plantea una alternativa a este modelo que nos permite interpretar los resultados obtenidos.

A modo de resumen de esta sección, la fase transitoria o limbo presenta condiciones limitantes para su ocurrencia. Entre estas condiciones limitantes, la fuerza de la traza mnésica juega un rol importante y determina, en memorias de distinta fuerza, el destino que tomarán ante una presentación intermedia del EC.

4.4 - Teoría bayesiana del aprendizaje

En los últimos años, con el desarrollo de un modelo bayesiano de aprendizaje (Courville et al., 2006; Gershman y Niv, 2012), surgió un nuevo marco teórico que permitió re-interpretar gran parte de los experimentos realizados hasta ese entonces en el área de aprendizaje asociativo y predecir de forma efectiva aquello que no contemplaba el modelo asociativo de aprendizaje. Según esta teoría bayesiana de aprendizaje, los animales adquieren un modelo interno del medio ambiente a partir de la experiencia, combinando aquel conocimiento previo de cómo el mundo está estructurado junto con las observaciones recientes para poder inferir cuál es la conexión entre los estímulos y poder hacer predicciones a futuro (Gershman y Niv, 2012). Durante el aprendizaje, el animal no estaría aprendiendo a asociar estímulos sino que asigna una causa al conjunto de observaciones hechas. De esta forma, distintos eventos que posean características similares serán agrupados mediante la inferencia de una misma causa latente. Si llevamos esta teoría al condicionamiento contextual Pavloviano, el animal no estaría asociando el EC con el EI de forma directa, sino que infiere una misma causa latente a la ocurrencia de ambos estímulos. Para determinar el nivel de respuesta condicionada de cada ensayo, el animal primero determina cual es la causa latente que se encuentra activa dadas las observaciones, luego realiza una predicción acerca de la ocurrencia del EI basándose en la experiencia previa asociada a esta causa latente, y finalmente genera la respuesta apropiada.

En un animal condicionado, si se lo re-expone nuevamente al EC, este inferirá que la misma causa latente del condicionamiento se encuentra activa, por lo tanto su predicción será la ocurrencia del EI. Si este estímulo es presentado, se confirmará la predicción y solo el proceso de evocación de la memoria será iniciado. Sin embargo, si el EI no es presentado, se generará una incongruencia o EP que desencadenará el proceso de reconsolidación, llevando a la memoria a su actualización y ajustando las

predicciones futuras asociadas a esta causa latente. Finalmente, la extinción de la memoria puede pensarse como una serie de eventos incongruentes que provocan la inferencia de una nueva causa latente activa, lo cual lleva a la generación de una traza de memoria paralela que codifique esta asociación entre las observaciones y la nueva causa latente.

Este modelo nos permite interpretar los resultados de esta Tesis, tanto aquellos referidos a las condiciones paramétricas de la fase limbo como a sus condiciones limitantes. Cuando la re-exposición es de 1 EC o 40 ECs, se infiere que la misma causa latente de la sesión de entrenamiento esta activa ya que no se acumuló evidencia suficiente para que se infiera lo contrario, esto iniciaría el proceso de labilización/reconsolidación de la memoria original. Por otro lado, cuando se re-expone a 320 ECs, la inferencia es que una nueva causa latente está activa debido a la evidencia acumulada, lo cual desencadena la memoria de extinción. En re-exposiciones intermedias de 80 ECs o 160 ECs, el sistema no es capaz de asignar las observaciones a la causa original ni tampoco acumuló evidencia suficiente para asignar una nueva causa latente. En este espacio paramétrico se ubica el limbo, caracterizado por la ausencia de efecto de la cicloheximida debido a que la memoria original no es labilizada y tampoco se establece una memoria de extinción. En cuanto al efecto de la fuerza de la memoria sobre el destino que esta tomará luego de la re-exposición, el modelo bayesiano nos permite interpretar que en una memoria fuerte se ven aumentadas las probabilidades de que la causa latente del entrenamiento siga activa durante la re-exposición. Así, mientras que para una memoria estándar la re-exposición a 80 ECs produce limbo, para una memoria fuerte la misma re-exposición produce reconsolidación debido a que el sistema infirió que la misma causa latente del entrenamiento estaba activa en este caso, ya que las probabilidades de que así sea eran altas debido a la fuerza del entrenamiento.

4.5 - Modelo de transición entre reconsolidación y extinción.

El error de predicción generado por el recordatorio no reforzado parecería ser crítico en la desestabilización de la memoria EC-EI. Pero este mecanismo por sí solo no explica bien lo observado cuando se aumenta el número de re-exposiciones al EC. Bajo estas condiciones, se forma una memoria de extinción la cual se trata de una traza paralela que es almacenada sin destruir la traza original, pero que va a competir con la primera por el control del comportamiento (Brooks y Bouton, 1994). Es esta nueva memoria la que se vuelve vulnerable a los agentes amnésicos y en estas condiciones es esperable la retención de la memoria original en una sesión de evaluación. Según algunos autores (Dudai, 2002; Debiec, LeDoux y Nader, 2002), la reconsolidación y la extinción son dos procesos que compiten a nivel molecular. Si se utiliza un agente amnésico junto con una re-exposición al EC y se observa una retención de la memoria original, esto sería un indicador de que el proceso dominante sería la extinción. En cambio, si no hay retención de la memoria original el proceso dominante sería la reconsolidación. Esta teoría de dominancia de trazas (Devenport, 1998; Eisenberg et al., 2003) permite explicar situaciones extremas donde, de acuerdo a la duración del recordatorio, uno u otro proceso es dominante y este se evidencia ya que se vuelve sensible a los efectos del agente amnésico.

Si bien la duración del recordatorio determina de forma excluyente cuál de ambos procesos se va a llevar a cabo, también se ha observado que estos procesos

pueden co-existir bajo determinadas condiciones de re-exposición (Pérez-Cuesta y Maldonado, 2009). Sin embargo, no está del todo claro de qué manera ocurre la transición entre estos procesos. En observaciones recientes (Flavell y Lee, 2013; Merlo et al., 2014), se vio que existen situaciones intermedias de re-exposición en donde se observa insensibilidad a los agentes amnésicos e hipermnésicos, lo cual podría estar indicando que ni uno ni otro proceso estaría siendo desencadenado.

Es posible plantear al menos 3 modelos alternativos de transición entre reconsolidación y extinción (Merlo et al., 2014) en función del aumento de exposiciones al EC solo. El primer modelo, llamado modelo de transición gradual (Fig. 4.1A), propone estados de transición que involucran a uno u otro proceso en diferentes grados. Bajo este modelo, con una re-exposición a un número intermedio de EC, se disparan ambos procesos de forma parcial generando una RC que resultará de la interacción de estos dos procesos desencadenados. En el segundo modelo, denominado modelo de transición de dos fases (Fig. 4.1B), los procesos de reconsolidación y extinción son mutuamente excluyentes y no existen estados intermedios o de transición. Bajo este modelo existen solo dos estados posibles, un primer estado en donde se dispara la reconsolidación en su totalidad y un segundo estado donde se dispara la extinción en su totalidad. Por último, el tercer modelo denominado modelo de transición de tres fases (Fig. 4.1C), propone una transición con tres fases separadas. En una primera fase se desencadena la reconsolidación, luego una segunda fase de transición o limbo donde no se dispara ninguno de estos dos procesos, y finalmente una tercera fase donde se dispara la memoria de extinción.

Como fue planteado con anterioridad, la fase limbo podría tener la función de proteger la traza original y la RC ante una re-exposición intermedia al EC. Bajo el modelo de transición de tres fases, la fase limbo separa por lo tanto a la reconsolidación y extinción de forma discreta generando una tercera fase que se distingue de estas últimas dos. Así, unas pocas presentaciones del EC en la sesión de re-exposición producen la reconsolidación de la memoria, presentaciones intermedias del EC generan una fase transitoria o limbo donde no se desencadena ni reconsolidación ni extinción, y finalmente muchas presentaciones del EC desencadenan la memoria de extinción.

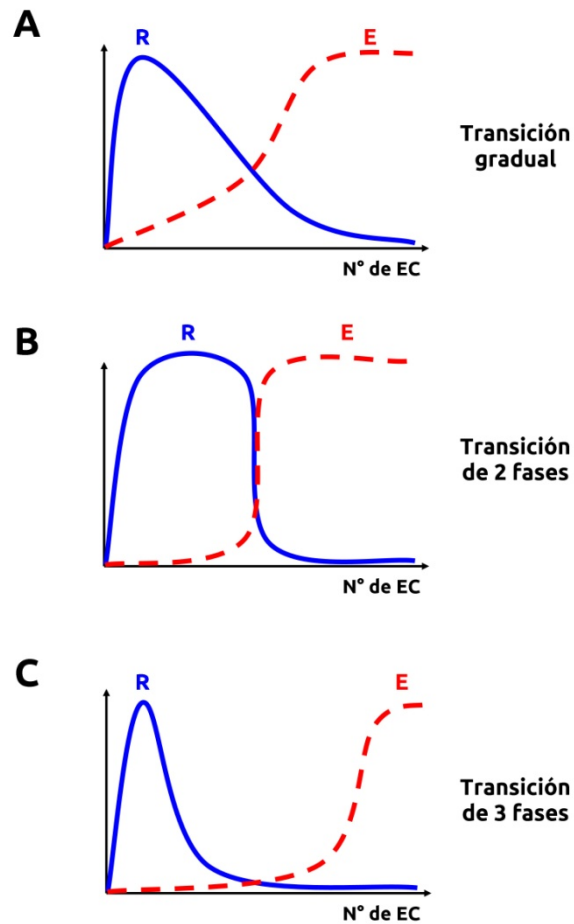


Figura 4.1. **Modelo de transición de reconsolidación a extinción.** **A.** Modelo de transición gradual **B.** Modelo de transición de dos fases. **C.** Modelo de transición de tres fases. R: reconsolidación; E: extinción; Eje x: número de estímulos condicionados presentados durante la sesión de re-exposición; Eje y: dependencia de NMDAR. (Adaptado de Merlo et al., 2014)

Los resultados obtenidos en esta Tesis se condicen con el modelo de transición de tres fases, donde en una memoria estándar 1 o 40 presentaciones del EC producen reconsolidación, 80 o 160 presentaciones producen limbo, y 320 presentaciones producen extinción (Fig. 4.2A). Luego, para una memoria fuerte, 80 presentaciones del EC producen reconsolidación debido a un corrimiento hacia la derecha de la cantidad de EC necesarios para desencadenar este proceso (Fig. 4.2B).

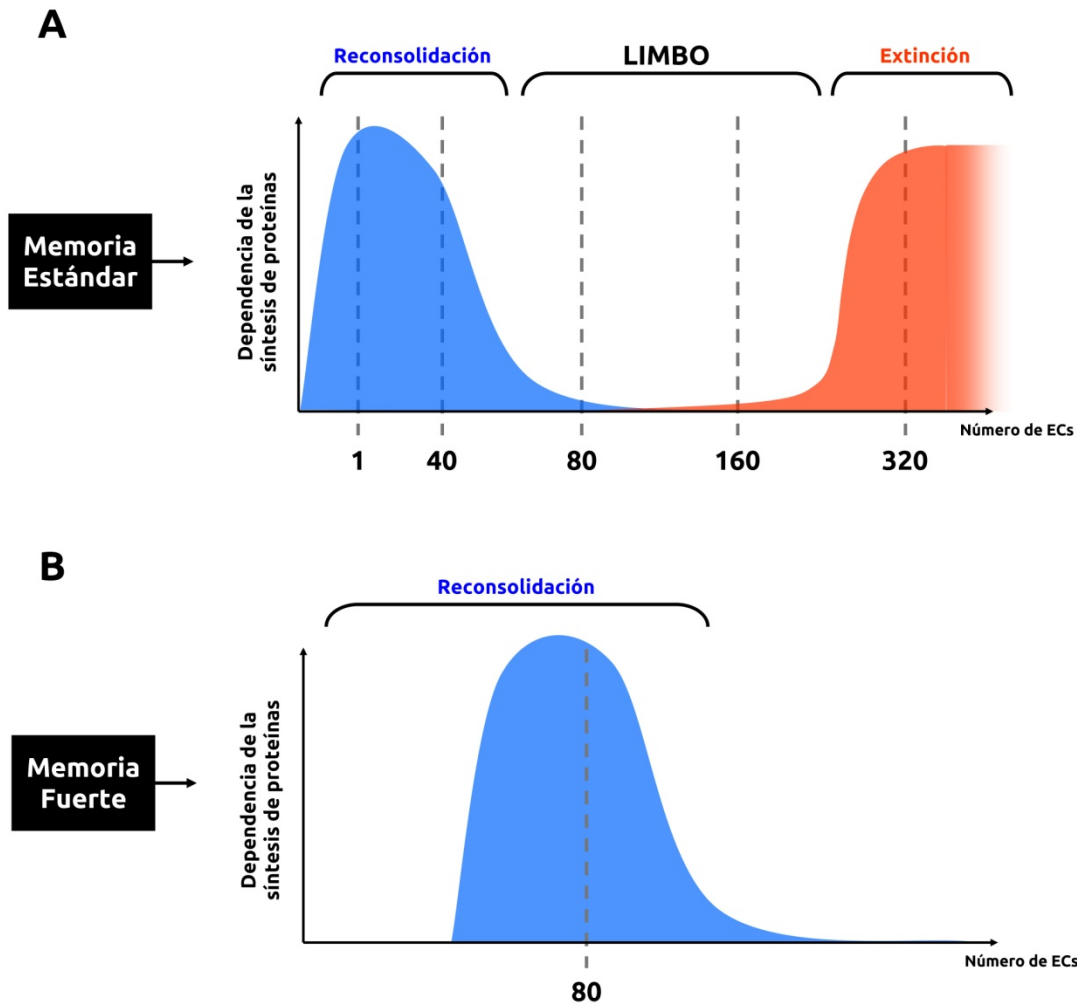


Figura 4.2. **Modelo de transición de reconsolidación a extinción del CCP en función del número de ECs.**
A. Dependencia de la síntesis de proteínas para una memoria estándar del CCP de 15 ensayos en función del número de ECs presentados en la sesión de re-exposición. **B.** Dependencia de la síntesis de proteínas para una memoria fuerte del CCP de 30 ensayos en función del número de ECs presentados en la sesión de re-exposición.

4.6 - Perspectivas a futuro.

En esta Tesis se comprobó que la fase limbo está evolutivamente conservada, ya que se encuentra tanto en roedores y humanos, como en un animal invertebrado como el cangrejo *Neohelice granulata*. Esta fase transitoria o limbo es desencadenada por una re-exposición intermedia al EC. Además, la fuerza de la traza mnésica resulta en una condición limitante para que esta fase se lleve a cabo.

Una pregunta que se desprende inmediatamente de estos resultados es si esta fase limbo en realidad se trata de un proceso de extinción que fue iniciado pero no es lo suficientemente fuerte como para observar cambios comportamentales. Si este fuera el caso, se debería poder facilitar la consolidación de este proceso iniciado al punto de observar cambios en la respuesta comportamental. Un facilitador de la consolidación de la memoria de extinción en el cangrejo es el muscimol (MUS), un agonista de los receptores de tipo GABA_A. Este efecto facilitador de la consolidación se da cuando la droga es administrada previa a un entrenamiento de extinción débil (Carbó Tano et al., 2013). Un experimento que podría responder a esta pregunta sería replicar el experimento 5 de esta Tesis pero inyectando MUS inmediatamente antes

de la sesión de re-exposición. En este caso, si la presentación de 160 EC inician el proceso de extinción pero no son suficientes para poder observar un cambio comportamental, un grupo inyectado con MUS no mostrará retención de la memoria ya que la droga potenciará la consolidación de esta extinción, comparado con un grupo VHC que si mostrará retención de la memoria.

En cuanto a las condiciones limitantes para desencadenar esta fase limbo, un interrogante que surge a partir de los resultados presentados es si el corrimiento en la cantidad de ECs necesarios para iniciar cada proceso se da también para las fases limbo y de extinción cuando se trata de una memoria fuerte. Para responder a esta pregunta se podría indagar sobre la cantidad de ECs necesarios que deben ser presentados en una sesión de re-exposición como para desencadenar tanto la fase limbo como la extinción, luego de la consolidación de una memoria fuerte.

4.7 - Entendiendo los mecanismos de persistencia de memorias aversivas para su aplicación clínica.

Dentro de los desórdenes de ansiedad, el síndrome de estrés post-traumático (TEPT) o las fobias específicas afectan a un 11% de la población adulta [Ministerio de Salud de la Nación; (Kessler et al., 2005)]. El TEPT y las fobias específicas se basan en la presencia de un componente de memoria traumática (Parsons y Ressler, 2013), aberrantemente persistente y formadas durante la exposición a una situación traumática o por transmisión de información (miedo o aversión a animales, situaciones o contextos sociales, etc. para fobias específicas).

Resulta interesante que la mayor parte de los tratamientos clínicos usados hoy en día para TEPT o fobias específicas no apuntan directamente a la causa básica del desorden: la persistencia de memorias aversivas aberrantes. La terapia preponderante, la terapia cognitiva conductual (TCC), intenta inhibir la respuesta de miedo de los pacientes por medio de sesiones de exposición a narraciones retrospectivas de la experiencia traumática o a las claves ambientales asociadas con la experiencia negativa. Esta terapia es efectiva sólo en una fracción de los pacientes y aún en estos casos se reportan tasas de recaída elevadas (Craske et al., 2014). El efecto de la TCC, mediado por el proceso de extinción, depende de la formación de una memoria inhibitoria que regule la expresión de la memoria aversiva original. Para que la terapia conductual cognitiva sea efectiva este balance debe favorecer a la nueva memoria inhibitoria, pero los mecanismos que gobiernan la persistencia de la memoria excitatoria original o su interacción con la nueva memoria inhibitoria formada por la TCC son ampliamente desconocidos. Además, bajo determinadas condiciones o estímulos análogos a los protocolos experimentales de reversión, la memoria original puede reaparecer. Es por esto que una terapia eficaz y duradera debería ser capaz de atacar estos desórdenes de ansiedad desde la degradación o inhibición permanente de estas memorias asociativas aberrantes. Algunas evidencias obtenidas en experimentos piloto con pacientes sugieren la aplicación con éxito de este tipo de tratamientos (Brunet et al., 2008; Soeter y Kindt, 2015). Por este motivo y con vistas al desarrollo de nuevas herramientas farmacológicas para el tratamiento de estas enfermedades, es fundamental profundizar nuestro conocimiento acerca de los mecanismos comportamentales, moleculares y neuroquímicos necesarios para la persistencia o inhibición de memorias aversivas (Merlo et al., 2015).

Las observaciones recientes sobre un estado de transición o limbo con la presentación de un número intermedio de ECs coinciden con el patrón de efectos de la evocación sobre la persistencia de la memoria aversiva que se observa al hacer un tratamiento de mejoramiento de la memoria (por medio del agente hipermnésico D-cicloserina, DCS) en terapias de exposición para desórdenes de ansiedad (Smits et al., 2013). Cuando la exposición a las claves fue breve, DCS empeoró los síntomas, probablemente por potenciación de la reconsolidación de la memoria traumática. Cuando la exposición fue prolongada, alcanzando niveles significativos de extinción en la sesión, DCS tuvo un efecto potenciador del tratamiento, probablemente potenciando el proceso de extinción. Sin embargo, para exposiciones intermedias, DCS no tuvo efecto alguno comparado con el grupo que recibió placebo, sugiriendo que la sesión no produjo ni reconsolidación ni extinción, probablemente por la inducción del estado de limbo. El uso de DCS en tratamientos de exposición a mostrado efectos positivos (Guastella et al., 2008; Otto et al., 2010), efectos negativos (Smits et al., 2013) y ausencia de efecto (Kleine et al., 2012). Este patrón de resultados es consistente con la presencia de memorias aversivas maladaptativas de diferente fuerza donde el grado de re-exposición al EC necesario para desencadenar cada uno de los procesos va a variar de un individuo a otro.

Desde hace varias décadas se han utilizado investigaciones pre-clínicas en animales de laboratorio, con el fin de conocer los mecanismos de memoria que subyacen a la formación y mantenimiento de memorias aversivas en individuos sanos. De esta forma, conocer los mecanismos que regulan la terminación de la reconsolidación podría beneficiar a las terapias que están siendo desarrolladas en la actualidad, por lo que el entendimiento de los mecanismos que llevan al arresto de la reconsolidación en esta fase transitoria o limbo podría contribuir considerablemente al diseño de nuevos tratamientos más sencillos y eficaces en términos de la reducción de la respuesta comportamental y de la duración de los efectos.

Bibliografía

- Abbott, J. (1970). Absence of blood-brain barrier in a crustacean, *Carcinus maenas* L. *Nature*, 225(5229), 291.
- Alberini, C. M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes?. *Trends in neurosciences*, 28(1), 51-56.
- Alberini, C. M. (2011). The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5, 12.
- Alcock, J. (2005). Animal behavior. 6. *Massachusetts: Sinauer Associates Inc.*
- Auchter, A., Cormack, L. K., Niv, Y., Gonzalez-Lima, F., & Monfils, M. H. (2017). Reconsolidation-extinction interactions in fear memory attenuation: the role of inter-trial interval variability. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 11, 2.
- Baumgärtel, K., Genoux, D., Welzl, H., Tweedie-Cullen, R. Y., Koshibu, K., Livingstone-Zatchej, M., ... & Mansuy, I. M. (2008). Control of the establishment of aversive memory by calcineurin and Zif268. *Nature neuroscience*, 11(5), 572.
- Berman, D. E., & Dudai, Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, 291(5512), 2417-2419.
- Bond-Buckup, G., Fontoura, N. F., Marroni, N. P., & Kucharski, L. C. (1991). O caranguejo: manual para o ensino prático em Zoologia. *Porto Alegre: Editora da Universidade Federal de Rio Grande do Sul.*
- Bouton, M. E. (2002). Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biological psychiatry*, 52(10), 976-986.
- Bouton, M. E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learning & memory*, 11(5), 485-494.
- Brooks, D. C., & Bouton, M. E. (1994). A retrieval cue for extinction attenuates response recovery (renewal) caused by a return to the conditioning context. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 20(4), 366.
- Brunet, A., Orr, S.P., Tremblay, J., Robertson, K., Nader, K. & Pitman, R.K. (2008) Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder. *Journal of psychiatric research*, 42, 503-506.
- Byrne, J. H. (1987). Cellular analysis of associative learning. *Physiological Reviews*, 67(2), 329-439.
- Carbó Tano, M. (2013). *Rol del sistema GABAérgico sobre las distintas fases de la memoria de extinción en el cangrejo Neohelice granulata* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).
- Carbo Tano, M., Molina, V.A., Maldonado, H., and Pedreira, M.E. (2009). Memory consolidation and reconsolidation in an invertebrate model: the role of the GABAergic system. *Neuroscience* 158, 387–401.
- Carew, T. J., Pinsker, H. M., & Kandel, E. R. (1972). Long-term habituation of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, 175(4020), 451-454.
- Cassini, L. F., Flavell, C. R., Amaral, O. B., & Lee, J. L. (2017). On the transition from reconsolidation to extinction of contextual fear memories. *Learning & Memory*, 24(9), 392-399.
- Courville, A. C., Daw, N. D., & Touretzky, D. S. (2006). Bayesian theories of conditioning in a changing world. *Trends in cognitive sciences*, 10(7), 294-300.
- Craske, M.G., Treanor, M., Conway, C.C., Zbozinek, T. & Vervliet, B. (2014) Maximizing exposure therapy: an inhibitory learning approach. *Behaviour research and therapy*, 58, 10-23.

- Davis, M., & Myers, K. M. (2002). The role of glutamate and gamma-aminobutyric acid in fear extinction: clinical implications for exposure therapy. *Biological psychiatry*, *52*(10), 998-1007.
- de Kleine, R. A., Hendriks, G. J., Kusters, W. J., Broekman, T. G., & van Minnen, A. (2012). A randomized placebo-controlled trial of D-cycloserine to enhance exposure therapy for posttraumatic stress disorder. *Biological psychiatry*, *71*(11), 962-968.
- de Oliveira Alvares, L., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Haubrich, J., Santana, F., & Quillfeldt, J. A. (2013). Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, *244*, 42-48.
- de Oliveira Alvares, L., Einarsson, E. Ö., Santana, F., Crestani, A. P., Haubrich, J., Cassini, L. F., ... & Quillfeldt, J. A. (2012). Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus*, *22*(5), 1092-1095.
- Debiec, J., LeDoux, J. E., & Nader, K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron*, *36*(3), 527-538.
- Devenport, L. D. (1998). Spontaneous recovery without interference: Why remembering is adaptive. *Animal Learning & Behavior*, *26*(2), 172-181.
- DeZazzo, J., & Tully, T. (1995). Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends in neurosciences*, *18*(5), 212-218.
- Dickinson, A. (1980). *Contemporary animal learning theory* (Vol. 1). CUP Archive.
- Dudai, Y. (1989). *The neurobiology of memory: concepts, findings, trends*. Oxford University Press.
- Dudai, Y. (2002). Memory from A to Z. *Keywords, Concepts and Beyond*. Oxford.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?. *Annu. Rev. Psychol.*, *55*, 51-86.
- Dudai, Y. (2012). The restless engram: consolidations never end. *Annual review of neuroscience*, *35*, 227-247.
- Dudai, Y., & Eisenberg, M. (2004). Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron*, *44*(1), 93-100.
- Eisenberg, M., Kobil, T., Berman, D. E., & Dudai, Y. (2003). Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science*, *301*(5636), 1102-1104.
- Exton-McGuinness, M. T., Lee, J. L., & Reichelt, A. C. (2015). Updating memories—the role of prediction errors in memory reconsolidation. *Behavioural brain research*, *278*, 375-384.
- Falls, W. A., Miserendino, M. J., & Davis, M. (1992). Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *Journal of Neuroscience*, *12*(3), 854-863.
- Federman, N., Zalzman, G., de la Fuente, V., Fustiñana, M. S., & Romano, A. (2014). Epigenetic mechanisms and memory strength: a comparative study. *Journal of Physiology-Paris*, *108*(4-6), 278-285.
- Fernández, R. S., Boccia, M. M., & Pedreira, M. E. (2016). The fate of memory: reconsolidation and the case of prediction error. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *68*, 423-441.
- Finnie, P. S., & Nader, K. (2012). The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *36*(7), 1667-1707.
- Flavell, C. R., & Lee, J. L. (2013). Reconsolidation and extinction of an appetitive pavlovian memory. *Neurobiology of learning and memory*, *104*, 25-31.
- Forcato, C., Bavassi, L., De Pino, G., Fernández, R. S., Villarreal, M. F., & Pedreira, M. E. (2016). Differential left hippocampal activation during retrieval with different types of reminders: an fMRI study of the reconsolidation process. *PLoS one*, *11*(3), e0151381.

- Forcato, C., Fernandez, R. S., & Pedreira, M. E. (2013). The role and dynamic of strengthening in the reconsolidation process in a human declarative memory: what decides the fate of recent and older memories?. *PLoS one*, *8*(4), e61688.
- Forcato, C., Fernandez, R. S., & Pedreira, M. E. (2014). Strengthening a consolidated memory: the key role of the reconsolidation process. *Journal of Physiology-Paris*, *108*(4-6), 323-333.
- Forcato, C., Rodríguez, M. L., & Pedreira, M. E. (2011). Repeated labilization-reconsolidation processes strengthen declarative memory in humans. *PLoS One*, *6*(8), e23305.
- Freudenthal, R., Locatelli, F., Hermitte, G., Maldonado, H., Lafourcade, C., Delorenzi, A., & Romano, A. (1998). κ -B like DNA-binding activity is enhanced after spaced training that induces long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience letters*, *242*(3), 143-146.
- Frieder, B., & Allweis, C. (1978). Transient hypoxic-amnesia: evidence for a triphasic memory-consolidating mechanism with parallel processing. *Behavioral biology*, *22*(2), 178-189.
- Fustiñana, M. S., Tano, M. C., Romano, A., & Pedreira, M. E. (2013). Contextual Pavlovian conditioning in the crab *Chasmagnathus*. *Animal cognition*, *16*(2), 255-272.
- Gershman, S. J., & Niv, Y. (2012). Exploring a latent cause theory of classical conditioning. *Learning & behavior*, *40*(3), 255-268.
- Gibbs, M. E., & Ng, K. T. (1977). Counteractive effects of norepinephrine and amphetamine on ouabain-induced amnesia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *6*(5), 533-537.
- Goldman-Rakic, P. S. (1992). Working memory and the mind. *Scientific American*, *267*(3), 110-117.
- Guastella, A. J., Richardson, R., Lovibond, P. F., Rapee, R. M., Gaston, J. E., Mitchell, P., & Dadds, M. R. (2008). A randomized controlled trial of D-cycloserine enhancement of exposure therapy for social anxiety disorder. *Biological psychiatry*, *63*(6), 544-549.
- Hammer, M., & Menzel, R. (1995). Learning and memory in the honeybee. *Journal of Neuroscience*, *15*(3), 1617-1630.
- Harlow, H. F., & Bromer, J. A. (1938). A test-apparatus for monkeys. *The Psychological Record*, *2*(19), 434-436.
- Healy, S. D., Bacon, I. E., Haggis, O., Harris, A. P., & Kelley, L. A. (2009). Explanations for variation in cognitive ability: behavioural ecology meets comparative cognition. *Behavioural Processes*, *80*(3), 288-294.
- Hepp, Y., Pérez-Cuesta, L. M., Maldonado, H., & Pedreira, M. E. (2010). Extinction memory in the crab *Chasmagnathus*: recovery protocols and effects of multi-trial extinction training. *Animal cognition*, *13*(3), 391-403.
- Hoeger, U., & Florey, E. (1989). Catecholamine degradation in the hemolymph of the chinese crab, *Eriocheir sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, *92*(2), 323-327.
- Howell, D. C. (2009). *Statistical methods for psychology*. Cengage Learning.
- Ikegami, S., & Inokuchi, K. (2000). Antisense DNA against calcineurin facilitates memory in contextual fear conditioning by lowering the threshold for hippocampal long-term potentiation induction. *Neuroscience*, *98*(4), 637-646.
- Inda, M. C., Muravieva, E. V., & Alberini, C. M. (2011). Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *Journal of Neuroscience*, *31*(5), 1635-1643.
- Izquierdo, I., Barros, D. M., e Souza, T. M., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A., & Medina, J. H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, *393*(6686), 635.

- Kessler, R. C., Chiu, W. T., Demler, O., & Walters, E. E. (2005). Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of general psychiatry*, 62(6), 617-627.
- Khalaf, O., Resch, S., Dixsaut, L., Gorden, V., Glauser, L., & Gräff, J. (2018). Reactivation of recall-induced neurons contributes to remote fear memory attenuation. *Science*, 360(6394), 1239-1242.
- Konorski, J. (1948). *Conditioned reflexes and neuron organization*. CUP Archive.
- Lai, C. S. W., Franke, T. F., & Gan, W. B. (2012). Opposite effects of fear conditioning and extinction on dendritic spine remodelling. *Nature*, 483(7387), 87.
- Le Pelley, M. E. (2004). The role of associative history in models of associative learning: A selective review and a hybrid model. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B*, 57(3b), 193-243.
- Lee, J. L. (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends in neurosciences*, 32(8), 413-420.
- Lee, J. L. (2010). Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4, 168.
- Lee, J. L., Everitt, B. J., & Thomas, K. L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, 304(5672), 839-843.
- Lee, S. H., Choi, J. H., Lee, N., Lee, H. R., Kim, J. I., Yu, N. K., ... & Kaang, B. K. (2008). Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science*, 319(5867), 1253-1256.
- Lee, S. H., Toth, Z., Wong, L. Y., Brulois, K., Nguyen, J., Lee, J. Y., ... & Jung, J. U. (2012). Novel phosphorylations of IKK γ /NEMO. *MBio*, 3(6), e00411-12.
- Lewis, D. J., & Maher, B. A. (1965). Neural consolidation and electroconvulsive shock. *Psychological review*, 72(3), 225.
- Locatelli, F., Maldonado, H., & Romano, A. (2002). Two critical periods for cAMP-dependent protein kinase activity during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiology of learning and memory*, 77(2), 234-249.
- López, M. A., Santos, M. J., Cortasa, S., Fernández, R. S., Tano, M. C., & Pedreira, M. E. (2016). Different dimensions of the prediction error as a decisive factor for the triggering of the reconsolidation process. *Neurobiology of learning and memory*, 136, 210-219.
- Lozada, M., Romano, A., & Maldonado, H. (1990). Long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiology & Behavior*, 47(1), 35-41.
- Lu, K. T., Walker, D. L., & Davis, M. (2001). Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *Journal of Neuroscience*, 21(16), RC162-RC162.
- Mackintosh, N. J. (1975). Blocking of conditioned suppression: role of the first compound trial. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 1(4), 335.
- Makkar, S. R., Zhang, S. Q., & Cranney, J. (2010). Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharmacology*, 35(8), 1625.
- Maldonado, H. (2002). Crustaceans as models to investigate memory illustrated by extensive behavioral and physiological studies in *Chasmagnathus*. In *The crustacean nervous system*(pp. 314-327). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Maldonado, H., Romano, A., & Tomsic, D. (1997). Long-term habituation (LTH) in the crab *Chasmagnathus*: a model for behavioral and mechanistic studies of memory. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 813-826.
- McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 153(3742), 1351-1358.

- McGaugh, J. L. (2000). Memory—a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251.
- Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, 185(4), 323-340.
- Merlo, E. & Milton, A.L. (2012) Cue-exposure approach for the treatment of intrusive memory disorders. In Murray, J. (ed) *Exposure Therapy: New Developments*. Nova Science Publishers, Inc., pp. 151-178.
- Merlo, E., & Romano, A. (2008). Memory extinction entails the inhibition of the transcription factor NF- κ B. *PLoS one*, 3(11), e3687.
- Merlo, E., Milton, A. L., & Everitt, B. J. (2018). A Novel Retrieval-Dependent Memory Process Revealed by the Arrest of ERK1/2 Activation in the Basolateral Amygdala. *Journal of Neuroscience*, 3273-17.
- Merlo, E., Milton, A. L., Goozée, Z. Y., Theobald, D. E., & Everitt, B. J. (2014). Reconsolidation and extinction are dissociable and mutually exclusive processes: behavioral and molecular evidence. *Journal of Neuroscience*, 34(7), 2422-2431.
- Merlo, E., Milton, A.L. & Everitt, B.J. (2015) Enhancing cognition by affecting memory reconsolidation. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 4, 41-47.
- Misanin, J. R., Miller, R. R., & Lewis, D. J. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*, 160(3827), 554-555.
- Morris, R. G., Inglis, J., Ainge, J. A., Olverman, H. J., Tulloch, J., Dudai, Y., & Kelly, P. A. (2006). Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron*, 50(3), 479-489.
- Myers, K. M., & Davis, M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*, 36(4), 567-584.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000a). Reply—Reconsolidation: The labile nature of consolidation theory. *Nature reviews neuroscience*, 1(3), 216.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000b). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722.
- Otto, M. W., Tolin, D. F., Simon, N. M., Pearlson, G. D., Basden, S., Meunier, S. A., ... & Pollack, M. H. (2010). Efficacy of d-cycloserine for enhancing response to cognitive-behavior therapy for panic disorder. *Biological psychiatry*, 67(4), 365-370.
- Parsons, R. G., & Ressler, K. J. (2013). Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nature neuroscience*, 16(2), 146.
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditional reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*.
- Pearce, J. M., & Hall, G. (1980). A model for Pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. *Psychological review*, 87(6), 532.
- Pearce, J. M., & Mackintosh, N. J. (2010). Two theories of attention: A review and a possible integration. *Attention and associative learning: From brain to behaviour*, 11-39.
- Pedreira, M. E., & Maldonado, H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, 38(6), 863-869.
- Pedreira, M. E., Dimant, B., Tomic, D., Quesada-Allue, L. A., & Maldonado, H. (1995). Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52(2), 385-395.
- Pedreira, M. E., Perez-Cuesta, L. M., & Maldonado, H. (2002). Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: Protein synthesis requirement and

- mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *Journal of Neuroscience*, 22(18), 8305-8311.
- Pedreira, M. E., Pérez-Cuesta, L. M., & Maldonado, H. (2004). Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. *Learning & Memory*, 11(5), 579-585.
- Pedreira, M. E., Romano, A., Tomic, D., Lozada, M., & Maldonado, H. (1998). Massed and spaced training build up different components of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Animal Learning & Behavior*, 26(1), 34-45.
- Pereyra, P., Portino, E. G., & Maldonado, H. (2000). Long-lasting and context-specific freezing preference is acquired after spaced repeated presentations of a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiology of learning and memory*, 74(2), 119-134.
- Pereyra, P., Saraco, M., & Maldonado, H. (1999). Decreased response or alternative defensive strategies in escape: two different types of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Journal of Comparative Physiology A*, 184(3), 301-310.
- Pereyra, P., Saraco, M., & Maldonado, H. (1999). Decreased response or alternative defensive strategies in escape: two different types of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Journal of Comparative Physiology A*, 184(3), 301-310.
- Pérez-Cuesta, L. M., & Maldonado, H. (2009). Memory reconsolidation and extinction in the crab: Mutual exclusion or coexistence?. *Learning & memory*, 16(11), 714-721.
- Przybylski, J., & Sara, S. J. (1997). Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioural brain research*, 84(1-2), 241-246.
- Przybylski, J., Roulet, P., & Sara, S. J. (1999). Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: Role of β adrenergic receptors. *Journal of Neuroscience*, 19(15), 6623-6628.
- Reichelt, A. C., & Lee, J. L. (2013). Memory reconsolidation in aversive and appetitive settings. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 7, 118.
- Rescorla, R. A. (2004). Spontaneous recovery. *Learning & Memory*, 11(5), 501-509.
- Rescorla, R. A., & Holland, P. C. (1976). Some behavioral approaches to the study of learning. *Neural mechanisms of learning and memory*, 165-192.
- Rescorla, R. A., & Wagner, A. R. (1972). A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. *Classical conditioning II: Current research and theory*, 2, 64-99.
- Roberts, R. B., & Flexner, L. B. (1969). The biochemical basis of long-term memory. *Quarterly reviews of biophysics*, 2(2), 135-173.
- Rosenthal, R., Robert, R., & Rosnow, R. L. (1985). *Contrast analysis: Focused comparisons in the analysis of variance*. CUP Archive.
- Ross, D.A., Arbuckle, M.R., Travis, M.J., Dwyer, J.B., van Schalkwyk, G.I. & Ressler, K.J. (2017) An Integrated Neuroscience Perspective on Formulation and Treatment Planning for Posttraumatic Stress Disorder: An Educational Review. *JAMA Psychiatry*, 74, 407-415.
- Santini, E., Muller, R. U., & Quirk, G. J. (2001). Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *Journal of Neuroscience*, 21(22), 9009-9017.
- Sara, S. J., & Hars, B. (2006). In memory of consolidation. *Learning & Memory*, 13(5), 515-521.
- Sedman, G., O'Dowd, B., Rickard, N., Gibbs, M. E., & Ng, K. T. (1991). Brain metabolic activity associated with long-term memory consolidation. *Molecular Neurobiology*, 5(2-4), 351-354.

- Sevenster, D., Beckers, T., & Kindt, M. (2012). Retrieval per se is not sufficient to trigger reconsolidation of human fear memory. *Neurobiology of learning and memory*, *97*(3), 338-345.
- Sevenster, D., Beckers, T., & Kindt, M. (2013). Prediction error governs pharmacologically induced amnesia for learned fear. *Science*, *339*(6121), 830-833.
- Sevenster, D., Beckers, T., & Kindt, M. (2014). Prediction error demarcates the transition from retrieval, to reconsolidation, to new learning. *Learning & Memory*, *21*(11), 580-584.
- Shettleworth, S. J. (1993). Where is the comparison in comparative cognition? Alternative research programs. *Psychological Science*, *4*(3), 179-184.
- Smits, J.A., Hofmann, S.G., Rosenfield, D., DeBoer, L.B., Costa, P.T., Simon, N.M., O'Cleirigh, C., Meuret, A.E., Marques, L., Otto, M.W. & Pollack, M.H. (2013) D-cycloserine augmentation of cognitive behavioral group therapy of social anxiety disorder: prognostic and prescriptive variables. *Journal of consulting and clinical psychology*, *81*, 1100-1112.
- Soeter, M. & Kindt, M. (2015) An Abrupt Transformation of Phobic Behavior After a Post-Retrieval Amnesic Agent. *Biol Psychiatry*, *78*, 880-886.
- SPSS, I. (2011). IBM SPSS statistics for Windows, version 25.0. *New York: IBM Corp.*
- Squire, L. R. (1987). Memory and brain New York: Oxford University Press. *Google Scholar*.
- Studio, R.. (2012). RStudio: integrated development environment for R. *RStudio Inc, Boston, Massachusetts*, 74.
- Sutton, M. A., Masters, S. E., Bagnall, M. W., & Carew, T. J. (2001). Molecular mechanisms underlying a unique intermediate phase of memory in Aplysia. *Neuron*, *31*(1), 143-154.
- Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J., & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*, *24*(20), 4787-4795.
- Tano, M. C., Molina, V. A., & Pedreira, M. E. (2013). The involvement of the GABAergic system in the formation and expression of the extinction memory in the crab *Neohelice granulata*. *European Journal of Neuroscience*, *38*(9), 3302-3313.
- Taylor, J. R., Olausson, P., Quinn, J. J., & Torregrossa, M. M. (2009). Targeting extinction and reconsolidation mechanisms to combat the impact of drug cues on addiction. *Neuropharmacology*, *56*, 186-195.
- Team, R. C. (2013). R: A language and environment for statistical computing.
- Thorpe, W. H. (1963). The concepts of learning and their relation to those of instinct. In *Symp. Soc. Exp. Biol* (Vol. 4, pp. 387-408).
- Tomsic D, Massoni V, Maldonado. (1993). Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs: Ontogenic, ecological and opioid modulation correlates. *J Comp Physiol* *173*:621-633
- Tomsic, D., Pedreira, M. E., Romano, A., Hermitte, G., & Maldonado, H. (1998). Context-us association as a determinant of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Animal Learning & Behavior*, *26*(2), 196-209.
- Troncoso, J., & Maldonado, H. (2002). Two related forms of memory in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by NMDA receptor antagonists. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *72*(1-2), 251-265.
- Wagner, A. R., & Rescorla, R. A. (1972). Inhibition in Pavlovian conditioning: Application of a theory. *Inhibition and learning*, 301-336.
- Wang, S. H., de Oliveira Alvares, L., & Nader, K. (2009). Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nature neuroscience*, *12*(7), 905.

- Winters, B. D., Tucci, M. C., & DaCosta-Furtado, M. (2009). Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. *Learning & memory*, *16*(9), 545-553.
- Zeil, J., & Zanker, J. M. (1997). A glimpse into crabworld. *Vision research*, *37*(23), 3417-3426.