

Tesis Doctoral

Organización neuroanatómica y funcional de neuronas involucradas en diferentes aspectos del aprendizaje visual de *Chasmagnathus*

Sztarker, Julieta

2006

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sztarker, Julieta. (2006). Organización neuroanatómica y funcional de neuronas involucradas en diferentes aspectos del aprendizaje visual de *Chasmagnathus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sztarker, Julieta. "Organización neuroanatómica y funcional de neuronas involucradas en diferentes aspectos del aprendizaje visual de *Chasmagnathus*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2006.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires

**Organización neuroanatómica y
funcional de neuronas involucradas en
diferentes aspectos del aprendizaje visual
de *Chasmagnathus***

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

Autora: Lic. Julieta Sztarker

Director: Dr. Daniel Tomsic

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neurobiología de la Memoria.
Depto. de FBMyC. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, marzo de 2006

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires, por brindarme la posibilidad de acceder a una excelente educación, libre y gratuita, y por otorgarme una beca de doctorado gracias a la cual pude realizar el presente trabajo de tesis.

A Daniel. En este ámbito en el que rara vez un director de tesis es más que un jefe, por tener un interés real en que el doctorado sea una etapa educativa y de crecimiento. Por tener siempre una palabra de apoyo, por tu paciencia ilimitada y por toda tu ayuda en la realización de esta tesis.

A Martín, mi hermano mayor en la ciencia, por todos estos años de trabajo compartidos.

Al resto de mi familia científica, los miembros del laboratorio de neurobiología de la memoria, por crear un ambiente de trabajo único en el que siempre es un placer estar.

A mis amigos, algunos cerca, otros a kilómetros de distancia, sin embargo, todos presentes siempre.

A mis papás, los primeros científicos de mi vida, por crear en mí el interés y el amor que siento por la ciencia. A mis hermanas, Lorena y Marcela, y a sus familias por ser siempre una fuente de alegría. A mis abuelos, por haber sido una gran influencia en mi vida.

A Martha, Carlos, Caty, Alex... no podría haber deseado una familia política mejor.

A Sergio, mi mejor amigo, mi colega, mi compañero de vida. Por todos estos maravillosos años compartidos y los que vendrán...

Resumen

Experimentos comportamentales recientes con artrópodos demuestran que estos animales poseen habilidades cognitivas que se suponía eran patrimonio exclusivo de los primates y, por ende, que estaban relacionadas con cerebros de gran tamaño. ¿Cómo es posible entonces que dichas habilidades estén contenidas en el minicerebro de los artrópodos?

Muchas de las neuronas del cerebro de los artrópodos presentan una extraordinaria complejidad, con múltiples e intrincadas arborizaciones que, en algunos casos, pueden extenderse a la casi totalidad del cerebro. En comparación con los grandes cerebros, en estos minicerebros una proporción aparentemente mayor de neuronas centrales responden individualmente a información multimodal. Nuestra hipótesis es que las diferencias de forma y función que parecen distinguir a los elementos constitutivos de los cerebros de artrópodos y vertebrados revelan dos distintas estrategias de optimización neural surgidas en el curso de la evolución. En este marco las capacidades conductuales de los artrópodos se explicarían en razón de que muchas de sus neuronas centrales poseen, en forma individual, una capacidad de tarea superior a la de la mayoría de las neuronas del cerebro de los vertebrados.

En esta tesis comenzamos a evaluar esta hipótesis investigando nuevos aspectos de las habilidades mnésicas de un artrópodo, el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*, a la vez que exploramos la capacidad de neuronas individuales para dar cuenta de esas habilidades. Investigamos conductas relacionadas con la percepción de estímulos visuales, por lo que el estudio contiene en primer lugar una descripción neuroanatómica detallada del cerebro del animal ocupado de procesar la información visual. Los resultados, además de permitirnos comprender la citoarquitectura del sistema y por ende sus eventuales potencialidades funcionales, constituyen un aporte significativo en el campo de la neuroanatomía comparada con implicancias evolutivas. A partir de allí, la investigación continúa con la caracterización de numerosas habilidades conductuales entre las que caben destacarse la estímulo-generalización y la transferencia interocular. Se evalúa conjuntamente el papel de un grupo particular de neuronas cerebrales en éstas y otras capacidades, registrando su actividad en el animal intacto durante el momento en que se encuentra aprendiendo. Los resultados apoyan la hipótesis planteada y se discuten en el marco de la neurobiología comparada.

Summary

Recent behavioral experiments with arthropods demonstrated that these animals have cognitive abilities that were assumed to be an exclusive heritage of primates and, as such, were thought to be related to large brains. How is it possible then that these abilities were contained in the minibrain of arthropods?

In comparison to vertebrates, some neurons from the arthropods' brain present an extraordinary complexity, with multiple and intricate branching structures that, in some cases, can spread through almost the entire brain. Also in comparison to the large brains, it appears that in the minibrains a larger portion of the central neurons responds individually to multimodal information. Our general hypothesis is that the differences in morphology and function that appear to distinguish the constituting elements of the brains of arthropods and vertebrates reveal two strategies for neural optimization that emerged during the course of evolution. In this framework, the arthropods' behavioral abilities could be explained in terms of the large proportion of central neurons which, individually, possess a higher capacity for information processing.

In this thesis we began to evaluate this hypothesis investigating new aspects of the mnemonic abilities of an arthropod, the crab *Chasmagnathus granulatus*, at the same time that we explored the capacity of individual neurons to account for these abilities. We investigated behaviors related to the perception of visual stimuli; therefore the study contains first a detailed neuroanatomical description of the animal's brain that processes visual information. The results, in addition to allowing us to understand the cytoarchitecture of the visual nervous system of the crab, and consequently its eventual functional potentialities, provide a significant contribution to the field of comparative neuroanatomy with evolutionary implications. The investigation then focused on the behavioral identification of different abilities such as the capacity for stimulus generalization and for interocular transfer of memory. The neurological substrate for each of these cognitive abilities were explored extensively by recording the activity of single neurons in the intact animal at the moment it is learning and recalling. The study rendered the identification of a particular group of cerebral neurons, which activity reflects the explored cognitive capacities. The results support the general hypothesis formulated above and is discussed within the framework of comparative neurobiology of cognition.

Índice

Prefacio.....	1
---------------	---

Introducción.....

Consideraciones generales de los estudios en neurobiología.....	2
Neuroetología	5
El cangrejo <i>Chasmagnathus</i> como modelo.....	5
El sistema visual de los cangrejos decápodos: Anatomía.....	6
El sistema visual de los cangrejos decápodos: Fisiología.....	8
Las Neuronas Detectoras de Movimiento de <i>Chasmagnathus</i>	9
Neuronas Detectoras de Movimiento y su rol en el comportamiento.....	10
Conocimiento actual de la neuroanatomía de <i>Chasmagnathus</i>	11
Organización modular y cognición.....	12
Neuronas visuales binoculares.....	14
Transferencia interocular.....	15
Hipótesis general de investigación	18
Objetivos particulares de la investigación	19

Materiales y métodos generales.....

Animales.....	20
Estudios neuroanatómicos.....	20
Estudios comportamentales.....	22
Registros electrofisiológicos.....	24

<i>Resultados</i>	27
Sección 1: Anatomía de los lóbulos ópticos de <i>Chasmagnathus</i>	27
Descripción general del sistema visual del cangrejo.....	27
Neuroarquitectura del sistema visual.....	28
La retina.....	32
La lámina.....	37
La médula.....	41
La lóbula.....	45
Un nuevo neuropilo visual en crustáceos.....	51
Discusión	53
Neuroarquitectura de los lóbulos ópticos.....	53
Características anatómicas del sistema de detectores de movimiento de la lóbula...55	
Un nuevo neuropilo visual en crustáceos: la <i>lobula plate</i>	56
Análisis comparativo.....	57
Sección 2: Estudios neuroetológicos en <i>Chasmagnathus</i>	60
Capítulo 1: Participación de las NDM en comportamientos visuales	61
Nivel de respuesta circaanual.....	63
Respuesta diferencial ante estímulos de distinta intensidad.....	65
Nivel de respuesta monocular y binocular.....	68
Discusión.....	70
Capítulo 2: Estímulo-especificidad y generalización	71
Materiales y métodos.....	73
Resultados.....	76
Discusión.....	89
Capítulo 3: Binocularidad y Neuronas Detectoras de Movimiento	91
Discusión.....	97

Capítulo 4: Binocularidad, plasticidad y transferencia interocular.....	102
Materiales y métodos.....	102
Resultados.....	103
La transferencia interocular.....	106
Discusión.....	110
<i>Discusión general.....</i>	<i>112</i>
<i>Bibliografía.....</i>	<i>117</i>

Algunos de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

Binocular visual integration in the crustacean nervous system. Sztarker J., Tomsic D. *Journal of Comparative Physiology A*, 190:951-962, 2004

Organization of optic lobes that support motion detection in a semiterrestrial crab. Sztarker J., Strausfeld N.J., Tomsic D. *Journal of Comparative Neurology*, 493:396-411, 2005

Prefacio

El estudio de una modalidad sensorial y del comportamiento de un animal guiado por dicho sentido puede ser abordado utilizando diversos enfoques. Por un lado, la etología como disciplina que estudia el comportamiento animal natural, permite contestar preguntas acerca de las habilidades conductuales de un animal y de las interacciones sociales entre individuos. Sin embargo este estudio es de tipo caja negra y no pretende entender cómo son los procesos mecanísticos que están involucrados en el comportamiento. La fisiología es la que se ocupa de estas preguntas. Estudia la maquinaria que posibilita el funcionamiento de una modalidad sensorial tratando de comprender cómo opera cada eslabón y sus conexiones e intenta explicar cuales son los cambios internos que llevan a las modificaciones que se observan en el comportamiento. Por otro lado, la anatomía estudia la organización morfológica interna del sistema, su arquitectura.

Si bien la etología, la fisiología y la anatomía parecen abarcar campos distintos, existen diversos puntos en común donde los resultados obtenidos en cada una de estas disciplinas pueden guiar la interpretación de resultados y la planificación de experimentos en las otras. Por ejemplo, observar el comportamiento de un animal enfrentado a la tarea de asociar la obtención de una recompensa a un determinado color puede sugerir las características fisiológicas del sistema visual del animal (ej. el rango de sensibilidad espectral de los fotorreceptores). A forma de otro ejemplo, el estudio de la morfología de un ojo puede indicar qué zona posee una mayor resolución y por lo tanto guiar el estudio de las claves visuales de mayor relevancia en el comportamiento del animal. Así, los distintos enfoques se complementan para dar una visión más integral del sistema investigado. El presente trabajo de tesis constituye un intento interdisciplinario para estudiar comportamientos guiados por la visión en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*.

Introducción

Consideraciones generales de los estudios en neurobiología

La neurobiología desarrolla sus estudios utilizando una amplia gama de animales. Por un lado, muchos investigadores eligen utilizar especies de animales típicas de laboratorio como ser ratones (*Mus musculus*), ratas (*Rattus norvegicus*), moscas (*Drosophila melanogaster*), etc. Estos animales presentan múltiples ventajas, son de fácil obtención y cuidado, y la cantidad de estudios ya realizados dan al investigador una amplia base de datos en donde poner en contexto su aporte. Contrariamente, otros investigadores eligen avocarse al estudio de especies menos convencionales tales como murciélagos, calamares, ciertos insectos o aves. La elección de este tipo de animales suele estar motivada por un doble propósito. Por un lado, por un interés evolutivo, ya que el estudio de nuevas especies enriquece el conocimiento general y permite sacar conclusiones acerca de la evolución de los sistemas complejos. Por otro lado, por el deseo de encontrar mejores modelos para estudiar fenómenos de interés (búsqueda de ventajas experimentales). Aún así, solamente se hallan bajo estudio cerca de 100 especies, número pequeño comparado con las más de 2 millones de especies presentes en el planeta (Menzel, 2001). Este hecho conlleva dos problemas: uno es que soluciones especie-específicas sean interpretadas como mecanismos generales y el otro es el ignorar la riqueza de estrategias que se pueden haber desarrollado durante la evolución para resolver similares demandas del ambiente. Sólo podemos aprender acerca de las similitudes y diferencias al comparar especies y solamente se pueden reconocer mecanismos generales si son encontrados una y otra vez. Mientras existen numerosas evidencias para asumir que los mecanismos celulares y moleculares están conservados a lo largo de la escala zoológica, las funciones de tipo sensorial, motora o cognitiva pueden estar fuertemente adaptadas al nicho particular de cada animal y por lo tanto mostrar distintas soluciones. Por otro lado, sistemas neurales que resuelvan efectivamente requerimientos básicos de la vida de un animal pueden hallarse conservados en la filogenia o bien, aparecer varias veces debido a presiones selectivas similares (Menzel, 2001). Nuevamente, estas conclusiones sólo pueden ser extraídas comparando múltiples especies. Todo lo anterior justifica y realza la importancia del estudio de animales no convencionales.

En cuanto a la búsqueda de modelos que permitan nuevos enfoques experimentales, cabe destacar aquí que una porción nada despreciable del conocimiento actual de la neurociencia deriva de estudios en invertebrados. A modo de ejemplo, el estudio del axón gigante del calamar permitió, por primera vez, comprender los fenómenos de potencial de reposo y potencial de acción e identificar sus bases iónicas (Hodgkin y Huxley, 1952a,b) y los estudios de Kandel y su grupo permitieron comenzar a entender las bases celulares y moleculares del aprendizaje y la memoria (revisado en Kandel, 2001). Precisamente en relación a la conducta, la alta complejidad del cerebro de los mamíferos representa un obstáculo para estudiar los principios neurofisiológicos del comportamiento. Por ello se ha argumentado que animales con sistemas nerviosos relativamente simples, como los artrópodos, ofrecen una importante ventaja ya que en éstos el circuito neuronal que controla el comportamiento a investigar puede ser lo suficientemente sencillo como para ser abordable. De hecho, en algunos casos se han encontrado neuronas individuales que están involucradas en un aspecto determinado del comportamiento. Por ejemplo, en abejas se encontró una neurona, la VUM_{mx1}, que señala la presencia del refuerzo (sucrosa) en un paradigma de condicionamiento clásico olor-recompensa medido por la respuesta de extensión de la probosis. Esta neurona es uno entre muchos ejemplos de neuronas de gran tamaño y con gran capacidad de integrar información presentes en los cerebros artrópodos. Lo anterior hace a estos invertebrados modelos interesantes y adecuados para estudios electrofisiológicos.

Más allá de poseer cerebros pequeños, muchos artrópodos poseen un repertorio comportamental extremadamente rico. Constituyen un grupo que ha sido muy exitoso desde el punto de vista evolutivo, de hecho, superan a los otros grupos de animales tanto en cantidad de individuos como en especies y han colonizado ambientes muy variados. Para explicar dicho éxito, este cerebro debe poder proveer soluciones adaptativas inteligentes a un amplio rango de problemas ecológicamente relevantes. Por otra parte, en los últimos años estudios comportamentales han comenzado a demostrar que en los “minicerebros” de estos animales, parecen estar presentes formas elementales de los procesos cognitivos descritos en los cerebros más complejos. Por ejemplo, Giurfa y colaboradores (1996; 2001) demostraron que las abejas poseen la capacidad de aprender reglas utilizando conceptos abstractos como la simetría y asimetría o los conceptos de igualdad y diferencia. El grupo de Jackson demostró que las arañas saltadoras poseen una flexibilidad comportamental extraordinaria la cual incluye la capacidad de construir

imágenes de búsqueda de sus presas favoritas y de utilizar la experiencia previa para innovar en sus estrategias de captura, revelando la existencia de un grado de planificación de las acciones que, hasta recientemente, había sido solamente adjudicada a los vertebrados (Jackson y Pollard, 1996; Jackson y Li, 2004).

Lo anterior señala a los artrópodos como modelos convenientes para el estudio de los mecanismos neurofisiológicos que subyacen a fenómenos complejos como el aprendizaje y la memoria. Sin embargo, los artrópodos no sólo resultan modelos experimentales adecuados para el estudio del comportamiento plástico. Desde el punto de vista funcional, en el sistema visual se ha encontrado un alto grado de convergencia evolutiva a través de especies filogenéticamente distantes (Osorio y Bacon, 1994; Somlyo y Walz, 1995; Rind y Simmons, 1999). Estudios comparados han demostrado, por ejemplo, que la sensibilidad de determinadas neuronas de la lóbula (tercer neuropilo óptico) de los insectos ante diferentes objetos en movimiento es asombrosamente similar a la de neuronas de la corteza visual de mamíferos, indicando que la convergencia evolutiva en el sistema visual no se halla limitada a las primeras etapas de procesamiento de la información (O'Carroll, 1993). En efecto, se ha sugerido que los principios computacionales que rigen el procesamiento visual del movimiento serían los mismos en vertebrados y artrópodos (Borst y Egelhaaf, 1989).

El estudio de los mecanismos fisiológicos que permiten la detección visual de movimiento, la cual es imprescindible para la supervivencia de muchos animales, reviste gran interés. Las neuronas que reaccionan a objetos en movimiento son denominadas detectoras de movimiento (NDM). Su característica fundamental es que responden mucho más a imágenes que se desplazan que a cambios estáticos en la intensidad de luz, es decir, funcionan como integradores espacio-temporales. Si bien las NDM de distintos animales muestran numerosas características comunes, la función de respuesta varía ampliamente entre células. Incluso en un mismo animal se encuentran distintos tipos de NDM. En efecto, las diferentes NDM de un animal constituye un conjunto de filtros ajustados a los requerimientos biológicos de cada especie. Por ejemplo, en la mosca, este tipo de neuronas es intensamente estudiado en relación a respuestas optomotoras (Gauck y Borst, 1999), en la langosta de tierra y en palomas, se han estudiado y comparado en relación a respuestas para evitar colisiones (Rind y Simmons, 1999), mientras que en sapos en relación a comportamientos de captura de presas (Ewert, 1997).

Neuroetología

La neuroetología es la disciplina que estudia las bases neurofisiológicas del comportamiento animal natural. Dentro de este amplio campo de investigación, uno de los temas más importantes consiste en establecer la relación entre un determinado comportamiento, el estímulo que lo evoca (estímulo llave) y las neuronas especializadas en responder a dicho estímulo (Ewert, 1997). Y no hay mejor sitio para estudiar estos fenómenos que en las respuestas defensivas ante predadores, ya que, para cumplir su función biológica, los circuitos que inician y controlan estas respuestas deben ser rápidos, económicos y confiables. Sin embargo, para evitar la amenaza de un predador, los animales por lo general poseen más de una estrategia y toman decisiones sobre cuál de las respuestas posibles es la más apropiada para una determinada situación. La decisión de iniciar una actividad específica debe ser tomada en algún punto del circuito neuronal sobre la base de la información sensorial que ingresa al sistema, la cual es por lo general procesada a través de neuronas detectoras de características específicas (*feature detectors*, Young 1989). La especificidad de estas neuronas detectoras es función de una combinación de características del estímulo. Por ejemplo, en el caso de una neurona detectora de movimiento del sistema visual, su respuesta resulta de la combinación de parámetros del estímulo tales como su velocidad, forma, contraste, distancia, etc. Así, las neuronas detectoras de características específicas son interneuronas del sistema nervioso central que poseen un alto grado de integración y que analizan las propiedades del estímulo actuando a modo de filtros que seleccionan (aceptan o rechazan) los estímulos a los cuales responder. En consecuencia, el estudio de estos detectores es central a toda investigación orientada a comprender las bases neurofisiológicas del proceso de toma de decisiones.

El cangrejo *Chasmagnathus* como modelo

El cangrejo *Chasmagnathus granulatus* constituye un modelo de estudio con múltiples ventajas. Por un lado, conforma una población natural que habita en estuarios, sitios donde el mar se mezcla con agua dulce, formando grandes comunidades. El hecho de que vivan en zonas de transición con constantes cambios de salinidad y de cantidad

de agua, los hace muy resistentes a las manipulaciones experimentales. Por otro lado, estos cangrejos despliegan una variedad de conductas entre la que se encuentra una característica respuesta de escape. En efecto, estos animales responden escapando ante la aproximación de cualquier objeto que remede las características de alguno de sus predadores, entre ellos las gaviotas. En el laboratorio, dicha respuesta es fácilmente evocable por medio de una pantalla opaca que se mueve sobre el animal y que por lo tanto constituye para éste un estímulo visual de peligro (EVP). Sin embargo, si el estímulo se presenta en forma repetida la respuesta de escape disminuye hasta eventualmente desaparecer. Esta modificación comportamental está basada en un aprendizaje cuya memoria, dependiendo de las características paramétricas del entrenamiento, puede ser muy breve (menos de 15 minutos) o muy larga (mayor a 5 días). El valor adaptativo de esta memoria ha sido analizado y discutido previamente (Tomsic y col., 1993). Dicho aprendizaje ha sido extensamente estudiado durante más de una década con enfoques comportamentales (ej. Pedreira y col., 1998; Pereyra y col., 1996; Hermitte y col., 1995, 1999; Tomsic y col., 1993, 1996, 1998), farmacológicos (ej. Pedreira y col., 1995, 1996; Romano y col., 1996; Tomsic y col., 1991) y de biología molecular (ej. Freudenthal y col., 1998). A partir de esta abundante información y siguiendo las ideas expresadas en los apartados anteriores, en nuestro laboratorio se desarrolló una preparación para estudiar con técnicas electrofisiológicas las neuronas del cerebro de *Chasmagnathus* que respondieran específicamente al EVP, es decir, para investigar aquellas neuronas en donde podría llevarse a cabo la decisión de efectuar o no la respuesta de escape frente a estímulos visuales.

El sistema visual de los crustáceos decápodos: Anatomía

El sistema nervioso central de los crustáceos decápodos está formado por un ganglio supraesofágico, un ganglio torácico y dos lóbulos ópticos constituidos por una serie de neuropilos ubicados en los pedúnculos oculares (ver Fig. 1). En la mayoría de los crustáceos, los pedúnculos oculares contienen a la retina, a tres neuropilos ópticos: la lámina, la médula, la lóbula y a una serie de regiones protocerebrales denominadas en conjunto protocerebro lateral. Estos neuropilos se conectan con el ganglio supraesofágico por medio del tracto protocerebral.

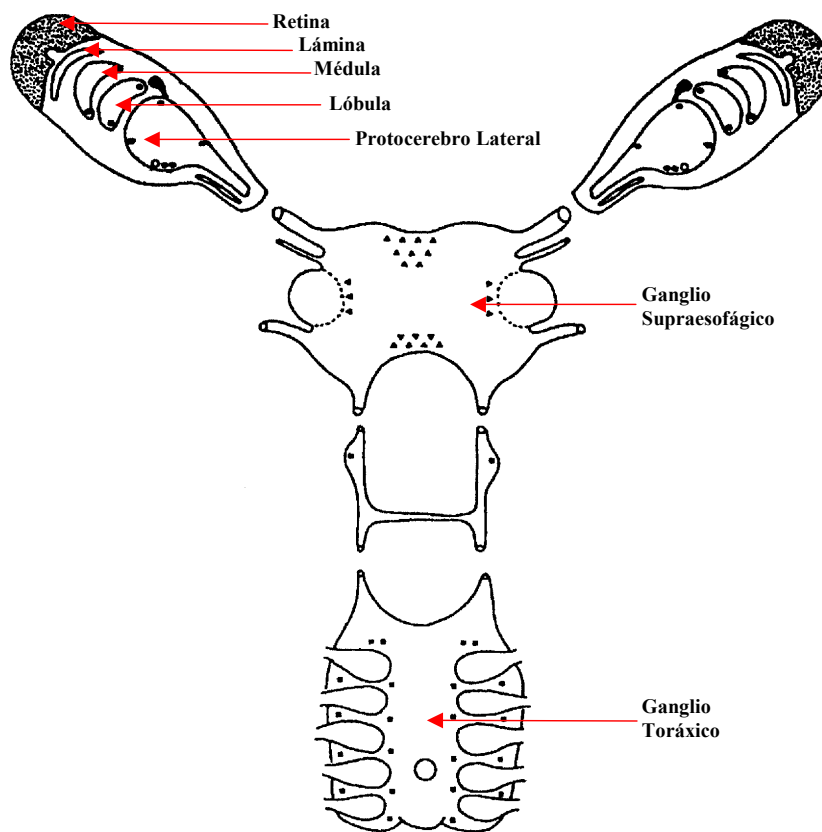


Figura 1: Esquema del sistema nervioso de un decápodo adulto. El mismo se compone de un ganglio supraesofágico y un ganglio torácico ubicados dentro del cefalotórax y de dos lóbulos ópticos ubicados en los pedúnculos oculares. Se señalan los componentes de cada lóbulo óptico.

Los cangrejos, al igual que la mayoría de los artrópodos poseen ojos compuestos, los cuales consisten en muchas unidades ópticas discretas cada una de las cuales posee su propia lente y enfoca la luz de una pequeña región del ambiente en su propio grupo de fotorreceptores. Cada una de estas unidades es llamada omatidia. Dentro de cada una de ellas se encuentran los fotorreceptores o células retinulares en las cuales se realiza la fototransducción. Los axones de los fotorreceptores se proyectan desde la retina hacia la lámina en donde hacen sinapsis con las interneuronas visuales primarias. De aquí en más la señal luminosa, captada inicialmente por los fotorreceptores y traducida al lenguaje eléctrico del sistema nervioso, se modifica progresivamente a medida que fluye en forma centrípeta hacia los centros de integración del sistema. De este modo, mientras que las neuronas más periféricas del sistema

responden sólo a cambios generales de luminosidad, las neuronas más centrales comienzan a responder preferentemente a determinadas características de los estímulos visuales hasta alcanzar un grado de especialización tal que puede hacerlas insensibles a los cambios generales de iluminación pero sumamente reactivas a algún parámetro específico del estímulo como puede ser la velocidad de un objeto en movimiento. Este mecanismo progresivo de integración involucra la participación de neuronas organizadas en forma de unidades columnares y de neuronas que poseen la capacidad de vincular las señales procedentes de las diferentes columnas, obteniéndose así información de los cambios de intensidad que se producen sobre toda una región de la superficie del ojo.

El sistema visual de los crustáceos decápodos. Fisiología

Si bien, como fue destacado anteriormente, existe consenso en la importancia de los estudios comparados la mayor parte de las investigaciones del sistema visual se realizan en vertebrados y en insectos. En crustáceos, la información con que se cuenta es escasa y la mayor parte de los trabajos se ha centrado en el *crayfish* (langosta de río) mayormente en las especies *Procambarus clarkii* y *Pacifastacus leniusculus*. Una excepción es el extenso trabajo de Wiersma y sus colaboradores, quienes estudiaron el procesamiento visual en varias especies (Wiersma, 1966; Wiersma y Yamaguchi, 1967a,b; York y Wiersma, 1975; Wiersma y col., 1982). Mediante registros extracelulares tomados del tracto protocerebral, estos investigadores identificaron y caracterizaron tres grupos principales de neuronas visuales: las neuronas *sustaining*, las neuronas *dimming* y las neuronas sensibles al movimiento. Sin embargo, con registros extracelulares sólo se puede obtener información acerca de cambios en la frecuencia de disparo de potenciales de acción de neuronas activas. Para obtener información sobre neuronas pasivas (aquellas que no disparan potenciales de acción) es necesario realizar registros intracelulares. Utilizando esta técnica se registraron en el *crayfish* neuronas con respuestas pasivas hiperpolarizantes ante un pulso de luz, como las monopolares y las amácrinas de la lámina y las células tangenciales, neuronas con respuestas pasivas depolarizantes ante un pulso de luz, como las transmedulares y las amácrinas de la médula (Waldrop y Glantz, 1985; Wang-Bennett y Glantz, 1987a,b; Pfeiffer y Glantz,

1989, 1991) y también neuronas *sustaining* y *dimming* (Kirk y col., 1982, 1983b). En el *crayfish*, todos estos grupos celulares se encuentran ubicados en el primer y segundo neuropilo (lámina y médula). En cangrejos, neuronas con respuesta tipo *sustaining*, *dimming*, pasivas hiperpolarizantes y pasivas depolarizantes fueron caracterizadas utilizando registros y tinciones intracelulares, encontrándose grandes similitudes en su fisiología (Berón de Astrada y col., 2001) y forma (observaciones no publicadas) con las descritas en el *crayfish*. Si bien todas estas neuronas presentan cierta sensibilidad ante estímulos en movimiento, existe un grupo de neuronas que muestra una marcada preferencia ante estímulos en movimiento en comparación con estímulos que consisten en cambios estacionarios en la intensidad de luz. Estas neuronas detectoras de movimiento fueron únicamente descritas en detalle en *Chasmagnathus* (Berón de Astrada y Tomsic, 2002).

Las Neuronas Detectoras de Movimiento de *Chasmagnathus*

Estudios recientes en *Chasmagnathus* han permitido identificar Neuronas Detectoras de Movimiento (NDM) que responden al mismo estímulo visual de peligro (EVP) que evoca la respuesta de escape del cangrejo en los estudios comportamentales (Berón de Astrada y Tomsic, 2002). La característica general de respuesta de estas neuronas al EVP es una depolarización o potencial excitatorio postsináptico (PEPS) sobre el cual se produce una descarga de potenciales de acción. Sin embargo, distintos parámetros de la respuesta al EVP (campo receptivo, direccionalidad, etc.) como así también las diferencias en la respuesta a distintos estímulos (pulso de luz, estímulos táctiles, etc.) permiten suponer que existen varias categorías diferentes de NDM. No obstante, las tinciones intracelulares con Lucifer Yellow revelaron que en todos los casos analizados las arborizaciones de las NDM se encuentran en el tercer (lóbula) y cuarto (protocerebro lateral) neuropilo óptico. En la lóbula generalmente la neurona posee un árbol dendrítico formado por numerosas ramas que corren paralelas unas a otras siguiendo el eje lateromedial del neuropilo. La mayoría de las neuronas teñidas mostraron una organización biestratificada, donde el árbol dendrítico ocupa dos niveles. Estas dendritas convergen hacia la parte medial de la lóbula para formar una única rama que desciende al protocerebro lateral. Allí se divide en dos, una de estas ramas arboriza

dentro de dicho neuropilo, la otra atraviesa el protocerebro lateral y sale por el tracto protocerebral. En aquellas neuronas en que pudo ser identificado, el soma estaba localizado en el grupo de cuerpos celulares ubicado debajo de la lóbula. Fue reportado también un segundo tipo de neuronas que poseen su árbol dendrítico ubicado únicamente en un estrato horizontal (Berón de Astrada y Tomsic, 2002).

Neuronas Detectoras de Movimiento y su rol en el comportamiento

Para estudiar el rol de las NDM en la ejecución de la respuesta de escape mediada por estímulos visuales de peligro (EVP) y su modificación por aprendizaje, se comenzó por comparar el curso temporal de la respuesta al EVP de las NDM con el del comportamiento del cangrejo. Se encontró que los perfiles de respuesta conductual y neuronal son muy similares y que las NDM anticipan la respuesta comportamental en aproximadamente 120 mseg (Tomsic y col., 2003), lo que sugiere que las NDM forman parte del circuito que controla la respuesta de escape provocada por el EVP.

Es sabido que la formación de memoria depende de la frecuencia de presentación de los ensayos (Hintzman, 1974). Utilizando distintos animales y diversas tareas de aprendizaje se ha observado que intervalos cortos entre estímulos (entrenamiento masivo) llevan a la formación de memorias breves a intermedias mientras que intervalos más largos (entrenamiento espaciado) conllevan la formación de memorias de largo término (Tully y col., 1994; Menzel y col., 2001).

En *Chasmagnathus* un entrenamiento masivo utilizando el EVP lleva a una rápida supresión de la respuesta de escape que dura poco en el tiempo (menos de 10 minutos). Esta memoria es independiente del contexto y por lo tanto es llamada memoria-señal (MS). El entrenamiento espaciado, por otro lado, produce una reducción en la respuesta que dura días. Esta memoria sólo se evidencia cuando el animal es evaluado en el mismo ambiente en el que fue entrenado, es decir está determinada por una asociación establecida entre el estímulo y el contexto, por lo cual esta memoria es llamada memoria contexto-señal (MCS).

Al analizar la respuesta de las NDM durante los dos tipos de entrenamientos se encontró que las tasas de caída y recuperación de la respuesta coinciden con lo observado a nivel comportamental. El entrenamiento masivo lleva a una caída rápida y

profunda de la respuesta que se recupera completamente 15 minutos luego del entrenamiento. En contraste, el entrenamiento espaciado produce una reducción en la respuesta que se mantiene 15 minutos luego del entrenamiento. Esta reducción en la respuesta no es el resultado de cambios en el potencial de reposo de las NDM ni en la excitabilidad general de la célula (Tomsic y col., 2003).

Dado que los cambios producidos como resultado de un entrenamiento espaciado duran días, se investigó si los cambios observados en las NDM podían persistir al menos por 24 hs. Con este fin se midió la respuesta de las NDM a la presentación de un EVP el día siguiente a un entrenamiento espaciado y se comparó dicha respuesta con la obtenida en un grupo control, expuesto únicamente al contexto en el día 1. La respuesta de las NDM (medida como número de potenciales de acción disparados durante la presentación del EVP) del grupo entrenado fue significativamente menor a la del grupo control y la magnitud de la reducción fue semejante a la ocurrida a nivel conductual (Tomsic y col., 2003).

Estos y otros resultados (Berón de Astrada, 2005) indican que las NDM son elementos centrales en la formación de memorias visuales de corto y largo plazo en *Chasmagnathus*.

Conocimiento actual de la neuroanatomía de *Chasmagnathus*

Como fue mencionado anteriormente en los últimos años se avanzó considerablemente en la identificación electrofisiológica de diversos tipos celulares involucrados en el procesamiento de la información visual en el cangrejo (Berón de Astrada y col., 2001; Berón de Astrada y Tomsic, 2002). La ubicación e identificación morfológica de algunos de estos tipos neuronales y en particular de las NDM de *Chasmagnathus* se obtuvo a partir de tinciones intracelulares. Esto fue posible en parte debido a que, por su gran tamaño y su orientación (todas poseen neuritas primarias con orientación tangencial), estas neuronas son susceptibles de ser registradas y teñidas intracelularmente.

Si bien esta técnica de tinción es imprescindible para la identificación de neuronas individuales ya que permite relacionar la morfología y la fisiología, brinda un conocimiento limitado que se reduce a unos pocos subtipos neuronales. Además al

permitir ver únicamente una neurona por vez dificulta llegar a conclusiones acerca de la orientación relativa de las distintas neuronas y de cuál es el número de neuronas que compone cada grupo. Para obtener este tipo de información hace falta utilizar otras técnicas de histología que, al teñir neuronas masivamente, permiten describir la arquitectura general del tejido, constituyendo así un atlas del sistema nervioso donde luego ubicar neuronas identificadas por otros métodos.

Desafortunadamente, el conocimiento actual sobre la organización neuroanatómica del sistema visual de los crustáceos y de los tipos celulares que lo conforman es aún muy limitado. De hecho, con escasas excepciones (Sinakevitch y col., 2003), el conocimiento que poseemos se deriva casi exclusivamente de los estudios realizados sobre los dos primeros neuropilos del *crayfish* (Nässel, 1977; Strausfeld y Nässel, 1980). No obstante, recientemente el estudio de la organización neuroanatómica de los neuropilos ópticos de crustáceos ha cobrado gran interés, ya que se utiliza como argumento en el renovado debate acerca del origen filogenético de los insectos y crustáceos (Harzsch, 2002; Sinakevitch y col., 2003). En efecto, las semejanzas estructurales de los tres neuropilos de insectos y crustáceos llevaron a la creencia actual de que el sistema nervioso visual de los crustáceos es homólogo al de los insectos (Strausfeld, 2005), lo que permite que algunas de las conclusiones derivadas de los estudios en uno de estos grupos puedan ser generalizadas al otro.

De todo lo anterior surge claramente la importancia de avanzar en el conocimiento de la anatomía del sistema visual de crustáceos.

Organización modular y cognición

El concepto de modularidad juega un rol central en las ciencias cognitivas. Implica que cualquier sistema que deba realizar operaciones computacionales grandes y complejas debe estar organizado en una serie de módulos más pequeños, relativamente independientes y especializados. Esta sería la forma más eficiente de procesar información (Coltheart, 1999). Cuando hablamos de un sistema tan complejo como el cerebro humano resulta natural hablar de este tipo de organización y de hecho hay numerosos estudios que apoyan este esquema (Leslie, 1992; Peretz y Coltheart, 2003)

pero, ¿qué pasa en un sistema que se supone más sencillo, como el cerebro de un artrópodo?

La visión tradicional del comportamiento de un artrópodo implica una serie de conjuntos independientes de rutinas sensomotoras, cada una responsable de posibilitar el desarrollo de una tarea en particular. En un insecto, ejemplos de estas tareas serían: el comportamiento sexual gatillado por feromonas, el cuidado apropiado de las larvas y el desarrollo de comportamientos defensivos, entre otros. Según Menzel y Giurfa (2001) este tipo de rutinas se asemeja a los módulos de procesamiento de dominio específico de la teoría modular de la mente (Coltheart, 1999). El funcionamiento de estos módulos es vertical e implica el activado rápido de programas motores específicos ante la presencia de un determinado estímulo llave. Su base neurobiológica está dada por circuitos simples de pocas o incluso una neurona (neuronas comando).

Sin embargo, para explicar la variedad de comportamientos complejos y plásticos observados en insectos es necesario agregar a esta organización la posibilidad de combinar horizontalmente la información de diversos módulos. El cerebro de un insecto podría entonces ser interpretado como una red de módulos interconectados que posibiliten comportamientos tanto flexibles como estereotipados.

Pero, ¿qué sucede cuando un animal está aprendiendo una tarea compleja? ¿cómo se guarda esa información? ¿toda junta en un único módulo? ¿o segregada en muchos módulos separados? Estudios de lesiones en humanos indican que existen zonas particulares del cerebro que se encargan de procesar la información concerniente a distintos aspectos del aprendizaje y que de hecho diferentes regiones están involucradas en los distintos tipos de memorias. ¿Es posible que este mismo patrón de segregación de la información ocurra en artrópodos?

Existen algunas evidencias en insectos que sugieren que distintos aspectos de un aprendizaje son guardados en sitios distintos. En abejas, luego de un condicionamiento clásico olor-recompensa, el trazo mnésico para las claves olfativas parece estar presente en forma independiente en las dos regiones de procesamiento de la información olfativa, la primaria (los lóbulos antenales) y la secundaria (los cuerpos pedunculados o *mushroom bodies*). Cada uno de estos centros es capaz de controlar la respuesta condicionada pero parecen procesar aspectos distintos de la información. Se piensa que los lóbulos antenales constituyen el sustrato para formas elementales de asociación mientras que los *mushroom bodies* estarían involucrados en las asociaciones

contextuales y en la representación de la configuración espacial de los estímulos (Menzel, 2001). En cucarachas se demostró que los cuerpos pedunculados participan en la formación de memorias espaciales (Mizunami y col., 1998). En *Drosophila*, tanto moscas normales como mutantes que poseen cuerpos pedunculados reducidos muestran una capacidad semejante para aprender tareas de discriminación visual. Sin embargo, las mutantes no pueden generalizar la información aprendida a otros contextos (Liu y col., 1999). Los experimentos anteriores sugieren que distintos componentes de una misma memoria son guardados en distintas partes (módulos) del cerebro artrópodo.

En *Chasmagnathus*, las NDM están involucradas en el aprendizaje y la memoria generada por la presentación repetida de un EVP. De hecho, éste es el único artrópodo en donde se han identificado neuronas individuales vinculadas con una memoria visual de largo término. Resulta entonces interesante continuar investigando en que extensión estas neuronas están implicadas en los diferentes componentes del aprendizaje. Por ejemplo, interesa evaluar si estas neuronas manejan sólo información referente al estímulo en la configuración precisa en la que éste fue aprendido durante el entrenamiento o si, por lo contrario, contienen la capacidad de reconocerlo en otras condiciones. Es decir, ¿existe en el cerebro de este cangrejo un módulo que procesa la información referente al estímulo aprendido y otro que procesa la información referente a la configuración espacial o toda esta información es procesada en los mismos elementos?

Neuronas visuales binoculares

La binocularidad constituye una cualidad importante de muchos sistemas visuales, otorgando entre otras, la ventaja de poder estimar distancias con precisión. Para llevar a cabo este tipo de funciones, las señales que ingresan por cada ojo deben transitar el sistema nervioso hasta alcanzar un sitio en donde confluyen. A nivel celular, este sitio está representado por neuronas que poseen la capacidad de responder a estímulos que ingresan por uno u otro ojo, es decir, neuronas con respuesta binocular.

En mamíferos, la respuesta de neuronas individuales a estímulos que ingresan tanto por uno como por otro ojo aparece a nivel de las neuronas del córtex visual (Kuffler y Nicholls, 1976). En gatos, Hubel y Wiesel (1959) demostraron que el 80 %

de las neuronas del córtex visual eran binoculares. Al estudiar estas neuronas observaron que los campos receptivos en ambos ojos eran coincidentes. Además mostraban igual preferencia para la orientación del estímulo y al excitar simultáneamente a los dos ojos se obtenía una respuesta sinérgica. Encontraron también otro tipo de neuronas binoculares que poseían una mayor especialización de sus campos receptivos. Dichas neuronas no respondían a los estímulos presentados a uno u otro ojo por separado sino que sólo mostraban respuesta cuando ambos ojos recibían la estimulación simultáneamente, observándose además que en ellas no existía una correspondencia exacta entre los campos receptivos de ambos ojos. Estas neuronas fueron implicadas entonces en la percepción de profundidad (Hubel y Wiesel, 1970).

En insectos han sido encontradas NDM con respuesta binocular en la *lobula plate*, un neuropilo que se halla asociado al tercer neuropilo óptico (Gauck y col., 1997; Gauck y Borst, 1999). En crustáceos, se habían descrito algunos casos de NDM con respuesta binocular (Wiersma y col., 1982), sin embargo, dado que estos últimos estudios habían sido realizados por medio de registros extracelulares tomados del tracto protocerebral, las características fisiológicas de respuesta de estas neuronas así como su ubicación en el sistema nervioso no fueron establecidas.

Recientemente, se realizaron estudios en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus* tendientes a evaluar la posible presencia de neuronas binoculares en los pedúnculos oculares utilizando registros intracelulares (Sztarker, 2000). Se registraron neuronas de distinto tipo (*sustaining*, *dimming*, pasivas hiperpolarizantes, pasivas depolarizantes, *on-off*, NDM) y sólo uno de esos grupos, el de las NDM probó ser binocular. Dado que al realizar registros intracelulares sólo se puede explorar una subpoblación de las neuronas presentes, no es posible descartar la existencia de otras neuronas binoculares en el sistema. De todas formas lo que sí se puede afirmar es que la integración de la información binocular comienza ya en los neuropilos ópticos.

Transferencia interocular

Si un animal que aprende a responder a un estímulo visual presentado a un solo ojo continúa mostrando la respuesta aprendida cuando el estímulo es presentado al ojo contrario se dice que presenta transferencia interocular (Wehner y Müller, 1985). Este

fenómeno ha sido ampliamente estudiado en una variedad de animales y con distintos protocolos. Sin embargo resulta llamativo que todos estos estudios fueron realizados a nivel comportamental y no existe ningún precedente en estudios fisiológicos. La única excepción es un estudio realizado por Glantz (1974a) donde midió la transferencia interocular (TIO) de la habituación de la respuesta refleja de defensa en el *crayfish* a través de electromiogramas de los músculos de los quelípedos (de todas formas ésta es una medición equivalente a medir la respuesta comportamental ya que se registra en los músculos efectores) y de hecho los resultados reportados no permiten una conclusión certera dado que muestra un número bajo de repeticiones y resultados contradictorios entre animales.

En *Chasmagnathus* se mostró falta de TIO en dos tipos de paradigmas, en la memoria contexto-señal (MCS) y en la habituación de la actividad exploratoria ante nuevos ambientes (Hermitte y col., 1995).

No obstante, el hecho de que todas las NDM sean binoculares y de que en ellas tenga lugar al menos parte del fenómeno de plasticidad que subyace a la MCS, alienta la posibilidad de desarrollar un modelo experimental que permita una aproximación a nivel fisiológico al estudio de la transferencia interocular. En otras palabras, parece posible evaluar si los cambios que ocurren a nivel de una neurona mientras el animal está aprendiendo con un ojo continúan manifestándose ante la estimulación del otro ojo.

El estudio de la TIO también puede ayudar a comprender cómo funciona el procesamiento y almacenamiento de la información visual en los artrópodos. En los crustáceos una parte importante del cerebro se ubica dentro de los pedúnculos oculares. Esto implica que zonas de alta integración como la lóbula y el protocerebro lateral se hallan duplicadas y separadas espacialmente. Anteriormente hemos mencionado que neuronas presentes en estos neuropilos están relacionadas con el aprendizaje y los cambios producidos por él. Esta característica sugiere que podría existir un procesamiento paralelo en los dos lóbulos ópticos donde la información sea analizada y almacenada independientemente.

El estudio de la TIO puede ayudar a evaluar esta posibilidad, brindando información central para comprender cómo funciona el cerebro de estos animales. La falta de TIO sugeriría que el cangrejo adquiere dos memorias visuales similares, cada una en un lóbulo óptico, las que solo pueden ser evocadas cuando el estímulo es

percibido por el ojo previamente entrenado. Esto implicaría la existencia de dos sistemas de almacenamiento simétricos e independientes y por lo tanto los mecanismos mnésicos serían redundantes. Por otro lado, la existencia de TIO hablaría de un sistema con una representación única y concentrada de la información.

Hipótesis general de la investigación

Trabajos recientes con artrópodos demuestran que estos animales poseen habilidades cognitivas que, hasta muy recientemente, sólo eran atribuibles a primates. Como ejemplo vale mencionar que las abejas son capaces de aprender relaciones abstractas como ser los conceptos de simetría, de igualdad o de diferencia (Giurfa y col., 1996; 2001). Estas habilidades parecen no corresponderse con el pequeño cerebro de estos animales, lo que conduce a preguntarse cómo funcionan estos minicerebros (Menzel y Giurfa, 2001). Algunas neuronas de estos minicerebros presentan árboles dendríticos extremadamente complejos. Además, parece ser que en el cerebro de los artrópodos, la proporción de neuronas que procesan información multimodal es muy superior a la del cerebro de los vertebrados. A partir de estas impresiones formulamos la siguiente hipótesis: "Bajo una perspectiva evolutiva, la estrategia de optimización de los recursos neuronales del cerebro de los artrópodos se ha diferenciado de aquella seguida en los vertebrados. En los artrópodos cada célula nerviosa central integraría y procesaría individualmente mayor diversidad (y tal vez cantidad) de información. Esto posibilitaría que, con un número comparativamente pequeño de neuronas, los minicerebros de los artrópodos sean capaces de sostener habilidades conductuales que se corresponderían con un cerebro mayor". Evidentemente, la comprobación de una hipótesis evolutiva como la enunciada trasciende ampliamente la posibilidad de un trabajo de tesis. Por tanto, los objetivos particulares definidos a continuación constituyen solamente algunos ejemplos del tipo de preguntas que esperamos responder para comenzar a poner a prueba nuestra hipótesis.

Objetivos particulares de la investigación

Anatomía:

Realizar una descripción detallada de la organización neuroanatómica de las regiones del cerebro del cangrejo haciendo hincapié en aquellas que fueron identificadas previamente como sustrato de los procesos de memoria visual. Este estudio tiene un doble propósito. Por un lado está dirigido a obtener información que permita relacionar la posesión de ciertas capacidades cognitivas con el grado de desarrollo y organización circuital del cerebro del cangrejo. Por otra parte, debido a que existen muy pocos estudios sobre la neuroanatomía del cerebro de los crustáceos, el otro objetivo de la descripción es proveer información de amplio interés biológico y evolutivo.

Comportamiento:

Avanzar en el conocimiento de las capacidades cognitivas de los artrópodos, investigando la existencia de componentes modulares de la memoria contexto-señal del cangrejo. Concretamente, evaluar aspectos del fenómeno mnésico tales como la generalización y la transferencia interocular. Además de permitir conocer aspectos no descritos de las capacidades mnésicas del cangrejo, este estudio tiene la finalidad de establecer condiciones particulares de evaluación del aprendizaje que puedan ser investigadas a nivel neurofisiológico.

Neurofisiología:

Investigar en qué medida la actividad de las NDM, previamente relacionada con la ocurrencia de memorias visuales duraderas, puede reflejar y contener la expresión de los diferentes aspectos que conforman una memoria compleja.

*Materiales y
Métodos*

Animales

Los animales utilizados fueron cangrejos machos adultos de la especie *Chasmagnathus granulatus* con un tamaño de caparazón entre 2,7 y 3 cm. Estos animales habitan la zona costera del sur de Brasil, Uruguay y Argentina, ocupando los bancos de limo mesolitoral y supralitoral de la zona de transición entre agua dulce y marina. Para este estudio fueron recolectados en los estuarios de San Clemente del Tuyú, Provincia de Buenos Aires, Argentina. La salinidad de estas aguas se mantiene a lo largo del año entre 1,2-1,4%. En el laboratorio fueron mantenidos en recipientes plásticos de 35 x 48 x 27 cm con 0,5 cm de agua preparada con hw-Marinex (1,0-1,4% de salinidad y pH de 7,4 –7,6). El cangrejario fue mantenido en un ciclo de 12 hs de luz-oscuridad y la temperatura fue mantenida entre 20 y 24°C. Los animales fueron capturados y transportados al laboratorio a lo largo de todo el año. Los experimentos fueron realizados dentro de las 2 semanas siguientes a la llegada de los animales al laboratorio.

Estudios neuroanatómicos

Tinciones intracelulares

Luego de caracterizar fisiológicamente una neurona de interés a través de registros intracelulares (ver más adelante), la misma se inyectó electroforéticamente con Neurobiotina 5% (Tris 50mM, KCl 0,5M, pH=7,6). Se utilizaron pulsos cuadrados de 500 mseg de 3 a 5 nA por un período entre 20 min y 2 horas. Luego de la inyección se dejó difundir el colorante entre 2 y 24 hs en el animal vivo. Se realizó la disección del sistema nervioso, aislando el ojo ipsilateral, el contralateral y el ganglio supraesofágico. Se fijó el tejido en 4% PFA (paraformaldehído) por 18 hs aproximadamente. Se lavó el fijador en PTA (Buffer fosfato 0,1M, 2% Tritón, 0,1% Azida sódica). Luego se incubó en 1:3000 Avidina-Rodamina:PTA por 24 hs. Se lavó el excedente con PTA, se deshidrató en series ascendentes de alcoholes y se aclaró utilizando metilsalicilato. Los preparados fueron montados con metilsalicilato en portaobjetos socavados y observados en un microscopio confocal.

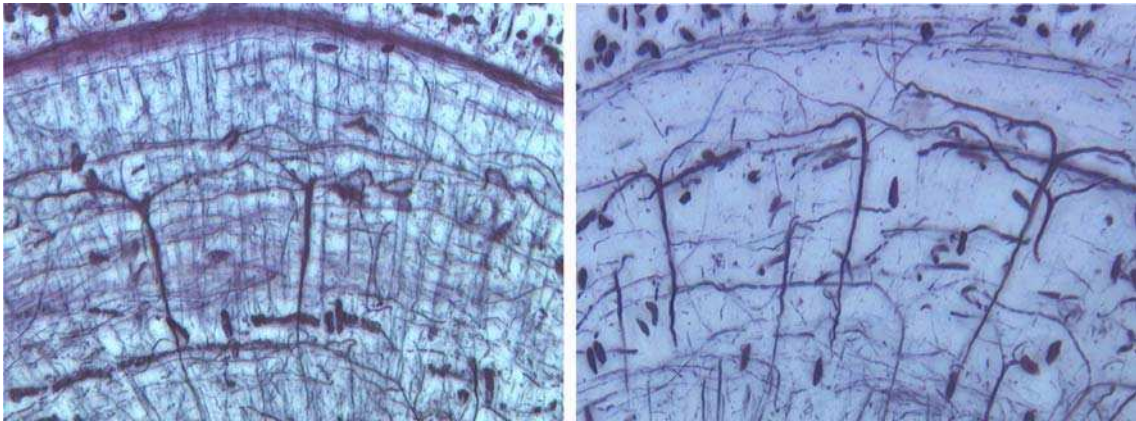
Tinción de Bodian

Se utilizó el método de tinción de plata reducida de Bodian (1937). Esta técnica tiñe los microtúbulos permitiendo evidenciar la estructura de las células. En el presente trabajo se estudió la neuroanatomía de los lóbulos ópticos de *Chasmagnathus granulatus*. Los animales fueron anestesiados utilizando agua salada (1,4%) con hielo. Los lóbulos ópticos fueron disecados y fijados por 6 horas en AAF (5% ácido acético, 85% alcohol etílico absoluto, 10% formol comercial). Luego fueron lavados en alcohol 70% y deshidratados en una serie de alcoholes de concentración ascendente. Luego de dos inmersiones en alcohol 100%, el tejido fue aclarado con α -terpineol y colocado en xileno. Fue calentado a 60°C en estufa y luego transferido a una mezcla 1:1 de Paraplast Plus y xileno por 20 min. A continuación fue colocado dos veces en Paraplast puro por 30 min y finalmente se retiró de la estufa y se colocó en agua con hielo para que solidificara. Se realizaron cortes seriados en micrótomo con grosores entre 12 y 25 micrones. Con el fin de obtener información de la citoarquitectura de los neuropilos en las tres dimensiones se efectuaron cortes ortogonales en distintas preparaciones.

Las secciones fueron desparafinadas e incubadas a 45°C por 15 hs aproximadamente (*overnight*) en 1% proteinato de plata y 2 a 7 gr de cobre puro cada 100 ml de agua destilada. Como puede verse en la figura 2, las distintas concentraciones de cobre seleccionan el tamaño de las células teñidas, a mayor concentración se tiñen menor número de fibras y de mayor diámetro.

Después de la incubación los preparados fueron colocados en el revelador (1% hidroquinona, 5% sulfito de sodio anhidro) por 5 min, luego coloreados con cloruro de oro 1% por 7 min, reducidos en 2% ácido oxálico por 5 min y fijados en 5% tiosulfato de sodio por 5 min. Luego fueron deshidratados en series sucesivas de alcoholes y montados en Entellan.

Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital CCD Sony DKC 5000. Para cada imagen final, entre 4 y 16 imágenes ópticas fueron tomadas y combinadas posteriormente utilizando Adobe Photoshop.



**Baja concentración Cu
(2 gr/100ml)**

**Alta concentración Cu
(7 gr/100ml)**

Figura 2: Variaciones en los resultados obtenidos dependiendo de la concentración de cobre utilizada en la tinción de Bodian. A mayores concentraciones de cobre (7 gr /100 ml en este caso) la tinción se vuelve selectiva para ciertos tipos celulares.

Coordenadas del lóbulo óptico y planos de sección

La mayoría de los estudios realizados sobre el sistema visual de los crustáceos se realizaron en el *crayfish* o en camarones, cuyos pedúnculos oculares están orientados casi horizontalmente. Los pedúnculos de los cangrejos, en cambio, están orientados de manera aproximadamente vertical. A continuación se definen los planos de sección utilizados en el presente estudio:

Longitudinal: corte a través del pedúnculo en el eje anteroposterior del animal.

Transversal: corte a través del pedúnculo en el eje lateromedial del animal.

Tangencial: cortes realizados tangenciales a la superficie apical del pedúnculo.

Estudios conductuales

Los experimentos comportamentales fueron realizados utilizando un actómetro que consiste en un recipiente cóncavo con una pendiente pronunciada y 12 cm de alto

(diámetro superior: 23 cm, diámetro inferior: 9 cm), que contiene 0,5 cm de profundidad de agua marina. El recipiente se halla conectado a un dispositivo que transduce la locomoción del cangrejo en señales eléctricas que se digitalizan y almacenan en una PC utilizando unidades arbitrarias. El estímulo visual de peligro (EVP) que se utiliza para evocar la respuesta de escape consiste en una pantalla rectangular negra (25 x 8 cm) unida a un motor que provoca su desplazamiento horizontal a unos 40 cm por encima del animal. La pantalla pivota sobre uno de sus extremos con un desplazamiento rotacional de ida y vuelta de 90° en un tiempo de 2,2 seg. Cada ensayo está compuesto por dos de estos ciclos de movimiento precedidos por 2,3 seg, de modo tal que la duración total de un ensayo es de 9 seg (Fig. 3).

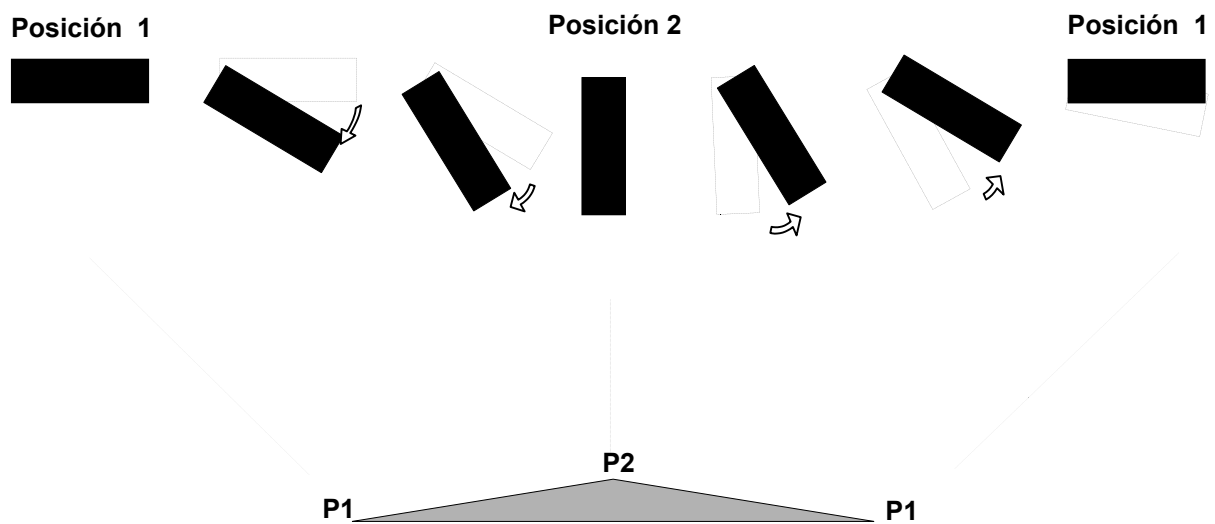


Figura 3: Estímulo visual de peligro (EVP) utilizado para evocar la respuesta de escape del cangrejo *Chasmagnathus*. Se ilustra una vista superior de la trayectoria y el sentido de desplazamiento del EVP. La pantalla, fija en uno de sus extremos, recorre primero 90° desde una posición 1 hasta una posición 2 e inmediatamente los desanda. El ciclo completo dura 2,2 seg. De aquí en más un triángulo como el representado en la parte inferior de la figura, ilustrará el ciclo de estimulación con el EVP. Cada ensayo está compuesto por dos de estos ciclos precedidos por 2,3 seg.

El actómetro fue colocado dentro del equipo de registro de electrofisiología para utilizar en las mediciones conductuales exactamente los mismos estímulos que se usan durante el registro de las NDM, de forma de poder comparar los resultados obtenidos con ambos métodos.

En los experimentos de generalización y transferencia interocular se utilizaron dos EVP (18 x 8 cm) ubicados más cerca del cangrejo (a 19 cm), cada uno de los cuales puede ser controlado desde fuera de la caja de Faraday para que se mueva en forma independiente o en forma conjunta. La actividad de cada cangrejo se midió en el período en que el EVP se estaba desplazando.

Se utilizaron dos tipos de entrenamiento, el masivo, en que el intervalo entre estímulos es de 2,3 seg y el espaciado, en que el intervalo entre estímulos es de 3 min. A menos que se indique en el texto otro número, un entrenamiento constó de 15 ensayos.

Registros electrofisiológicos

Se realizaron registros intracelulares *in vivo* en neuronas de los lóbulos ópticos de los pedúnculos oculares de *Chasmagnathus granulatus*. La figura 4 esquematiza las características generales de la preparación. Brevemente, el animal es firmemente sujetado por medio de una pinza de los costados del caparazón, dejando libre el movimiento de las patas. Una tira de goma es pegada a las quelas para prevenir movimientos que desestabilicen el registro. Los pedúnculos oculares son fijados al caparazón por medio de pegamento acrílico en su posición normal de observación, que corresponde a un ángulo de aproximadamente 70-80 grados con respecto al plano horizontal. Bajo lupa se realiza una operación donde se remueve una pequeña porción de cutícula libre de omatidias del área superior de uno de los pedúnculos oculares para permitir el ingreso del microelectrodo. Un electrodo de referencia es colocado en contacto con la hemolinfa a través de un pequeño orificio realizado en la zona dorsal del caparazón. El animal es montado en el equipo de registro y, bajo lupa, se procede al descenso vertical del microelectrodo de vidrio a través de la zona libre de cutícula del pedúnculo ocular. Los capilares de vidrio son estirados con un *puller* Sutter P77 de manera de obtener microelectrodos con resistencias de punta entre 40-80 MΩ al ser llenados con una solución 3M de KCl. Los movimientos del microelectrodo son controlados por un micromanipulador y todo el sistema se halla montado sobre una mesa neumática antivibratoria cuya superficie fue pintada de color negro mate para minimizar los reflejos. El equipo experimental consta además de una jaula de Faraday completamente cerrada para evitar estímulos visuales no controlados provenientes del

exterior, cuyo techo y paredes se hallan revestidos del lado interior con cartulina blanca para aumentar el contraste del EVP. La penetración de las células se realiza ejecutando pequeños movimientos de descenso del electrodo y provocando oscilaciones en el dispositivo de compensación de capacitancia del amplificador, al tiempo que se observan las deflexiones de potencial en un osciloscopio. Luego de penetrar una célula y reconocerla como una NDM por su respuesta a movimientos de la mano, el frente abierto de la caja se cubre con una cortina negra y se da lugar al inicio del experimento. El sistema de registro cuenta con un amplificador, un digitalizador (Digidata 1200 Axon Instruments) y una computadora. Los estímulos así como también la adquisición de los datos electrofisiológicos se realizan por programas de computadora (Pclamp6).

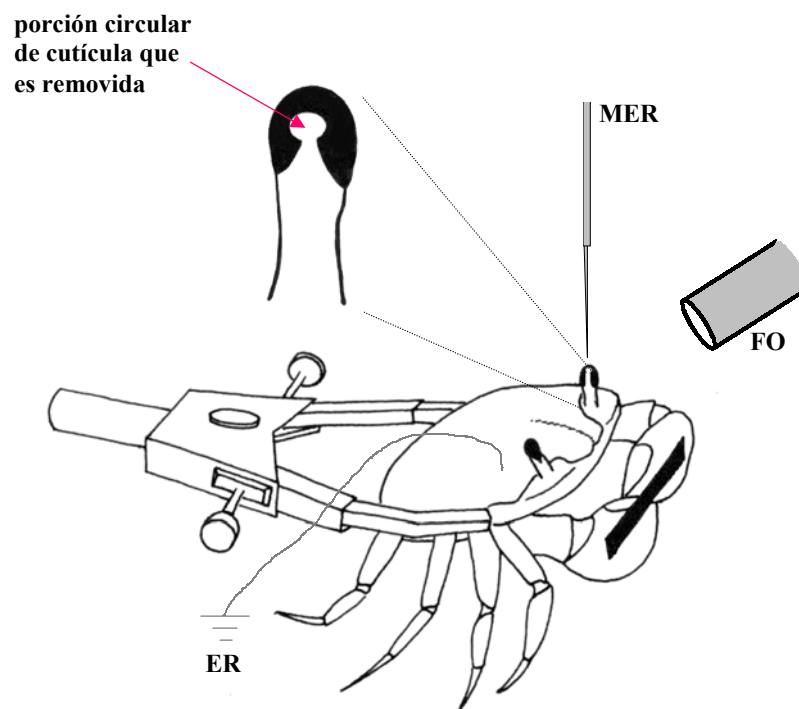


Figura 4: Esquema de las características principales de la preparación experimental que utilizamos para realizar registros intracelulares en el cangrejo vivo. Una explicación detallada de la preparación se da en el texto. Se observa una ampliación del pedúnculo ocular desde una vista medial desde donde puede apreciarse la región de cutícula que es removida para permitir el ingreso del electrodo. FO: fibra óptica, MER: microelectrodo de registro, ER: electrodo de referencia.

Dentro del dispositivo experimental se utilizan básicamente dos tipos de estímulos visuales. El primero consiste en un pulso de luz de 1 seg de duración y de 25 W/m^2 de intensidad, el cual se genera con una lámpara de Xenón ubicada fuera de la jaula cuya luz es guiada por una fibra óptica de 8 mm de diámetro. El control temporal se realiza a través de un *shutter* electromagnético cuya apertura está dirigida por la computadora. La respuesta a la luz es normalmente utilizada como carácter diagnóstico para la identificación de los distintos tipos de neuronas. El segundo tipo de estímulo que se utiliza es el EVP descrito anteriormente. En muchos de los experimentos de esta tesis se utilizaron dos de estos estímulos ubicados en distintas posiciones del espacio.

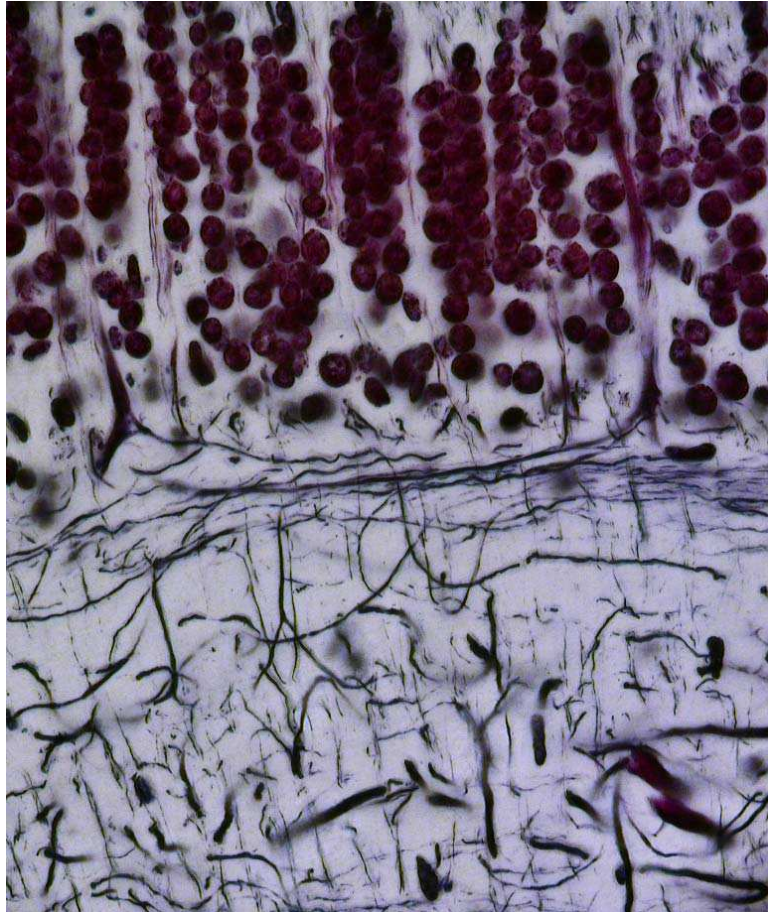
En algunos experimentos se utilizó un tabique divisor para separar los campos visuales de ambos ojos. Este tabique está compuesto de dos partes: por un lado de una cartulina negra que se adosa a la parte dorsal del caparazón del animal siguiendo la forma del cuerpo, y por otro de una cartulina negra más gruesa que se encuentra montada en el dispositivo que sostiene los EVP. Al momento de ubicar al animal para realizar los registros, ambas partes se acomodan de manera de solapar las cartulinas y así impedir la transmisión de luz entre ambos lados del cangrejo. Este arreglo del tabique divisor en dos partes permite una completa separación de los campos visuales de los dos ojos a la vez que previene las inestabilidades mecánicas que hubiera causado una única gran pieza unida al animal. Se utilizaron distintos protocolos de entrenamiento y evaluación que serán explicados en detalle en cada capítulo de los resultados.

El análisis de los registros electrofisiológicos fue realizado con posterioridad al experimento utilizando el programa Clampfit. La frecuencia de digitalización de los registros fue de 1,5 kHz. Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando correlaciones y *tests* de Student.

Cabe destacar que en todos los experimentos electrofisiológicos el cangrejo se encuentra vivo, no anestesiado, observando y aprendiendo de forma análoga a como lo hace en los experimentos comportamentales. Más aun, al finalizar los registros intracelulares el animal permanece saludable y en los días posteriores no se distingue su conducta de la de animales no registrados.

Resultados

Sección 1



Neuroanatomía

Sección 1: Anatomía de los lóbulos ópticos de *Chasmagnathus*

Chasmagnathus granulatus es un cangrejo semiterrestre que posee importantes habilidades visuales. Durante los últimos 20 años se han estudiado en este animal procesos relacionados con aprendizajes y memorias visuales utilizando distintas técnicas (para una revisión consultar Maldonado, 2002). Sin embargo, las regiones del cerebro involucradas en la formación de estas memorias hasta hace muy poco eran completamente desconocidas. Recientemente se mostró que en el cangrejo era posible realizar registros y tinciones intracelulares de neuronas del lóbulo óptico en animales vivos durante el aprendizaje. Así, se encontró que NDM del tercer neuropilo óptico, la lóbula, están estrechamente vinculadas con la formación y mantenimiento de las memorias visuales (Tomsic y col., 2003). Cabe recordar, no obstante, que los registros y tinciones intracelulares sólo permiten investigar de manera rutinaria a grandes neuronas tangenciales, vedando el acceso a células tangenciales finas y a las decenas de miles de pequeñas neuronas columnares de diversas clases que componen el mosaico retinotópico. Dadas las particulares ventajas de este modelo y las prometedoras perspectivas de estudios combinando el comportamiento y la fisiología, es importante contar con un mejor conocimiento de la arquitectura del sistema nervioso de este cangrejo. Este es el objetivo principal de esta sección.

Descripción general del sistema visual del cangrejo

Los ojos de *Chasmagnathus granulatus* están montados en el extremo de pedúnculos oculares que se extienden de forma prácticamente vertical sobre el caparazón (Fig. 5). Un recuento del número de facetas realizado bajo lupa nos permitió determinar que cada ojo posee aproximadamente 7000 omatidias, las cuales están distribuidas alrededor de toda la zona superior de los pedúnculos oculares excepto por una pequeña región de cutícula localizada en la parte medial. Como consecuencia de esta distribución el campo visual de cada ojo comprende virtualmente todo el panorama visual. Abarca 360° en el plano horizontal (dada la curvatura del ojo incluso la zona medial no posee ningún punto ciego). En el plano vertical el campo visual se extiende aproximadamente 160° en la zona frontal reduciéndose en la parte

posterior a 100° aproximadamente. El número de omatidias encontrado en *Chasmagnathus* supera en 3 veces el informado para el *crayfish* adulto (Strausfeld y Nässel, 1980), el crustáceo cuyo sistema visual ha sido el más estudiado. Este hecho concuerda con la observación de que los cangrejos semiterrestres son visualmente más reactivos que otros decápodos totalmente acuáticos como el *crayfish*.



Figura 5: Foto de un cangrejo macho adulto *Chasmagnathus granulatus* con un ancho de caparazón de 2.8 cm. Se puede apreciar la posición normal de observación de los pedúnculos oculares.

Neuroarquitectura del sistema visual

De aquí en adelante se detallan los resultados obtenidos mediante el estudio de los neuropilos ópticos del cangrejo utilizando la técnica de plata reducida de Bodian. Al teñir microtúbulos, esta técnica revela neuronas de todo calibre y forma (ver materiales y métodos) permitiendo, por lo tanto, resolver la arquitectura neuroanatómica del sistema nervioso. Este tipo de tinciones masivas permite describir la ubicación y orientación de neuronas previamente identificadas y posibilita sacar conclusiones acerca de las poblaciones neuronales en cuanto a número e interacciones de unas con otras.

En los crustáceos decápodos, los pedúnculos oculares contienen a la retina y a tres neuropilos ópticos, clásicamente denominados lámina ganglionaris, médula externa y médula interna, junto con una serie de neuropilos protocerebrales incluidos en las regiones conocidas como médula terminal y cuerpo hemielipsoide (Sandeman y col., 1992). En su conjunto, estos neuropilos se reúnen bajo el término lóbulo óptico y se conectan con el ganglio supraesofágico por medio del tracto protocerebral. La figura 6 ilustra el arreglo de los neuropilos ópticos (ojo derecho) dentro de los pedúnculos oculares de *Chasmagnathus*. Los tres primeros neuropilos por debajo de la retina son actualmente considerados claramente homólogos a la lámina, médula y lóbula de los insectos (Strausfeld y Nässel, 1980; Harzsch, 2002; Sinakevitch y col., 2003) y por lo tanto se utiliza aquí dicha terminología. El término protocerebro lateral se refiere a la médula terminal y al cuerpo hemielipsoide en conjunto. El cuerpo hemielipsoide se ubica lateral a la médula terminal y está compuesto por dos neuropilos, el más pequeño denominado I y el de mayor tamaño II (Fig. 7B). Estos neuropilos están mayormente compuestos por aproximadamente 200 células parasol las cuales son multimodales, procesando información olfatoria, táctil y visual (McKinzie y col., 2003).

Como es característico en los artrópodos, los tres primeros neuropilos, la lámina, médula y lóbula de *Chasmagnathus*, presentan un arreglo retinotópico de unidades columnares anatómico-funcionales intersecado por estratos de procesos tangenciales. En cambio los neuropilos del protocerebro lateral, más próximos al ganglio supraesofágico, no presentan una organización estructural definida (Fig. 7).

En los neuropilos ópticos cada columna representa una unidad de muestreo visual de la retina: 8 fotorreceptores de una omatidia mandan sus axones en forma de un haz hacia una columna de la lámina. A su vez neuronas eferentes de la lámina proyectan este arreglo hacia la parte distal de la médula. Dicha organización retinotópica es preservada a lo largo de la médula por medio de neuronas columnares que luego mapean esta geometría en la lóbula. En cangrejos e insectos, los axones que conectan la lámina con la médula y la médula con la lóbula forman sendos quiasmas, los cuales invierten y luego re-invierten el orden anteroposterior del mosaico retinal. Dado que el eje mayor de la lámina está rotado respecto al de la médula (ver esquema Fig. 6) los planos de entrecruzamiento de los quiasmas dan la impresión de estar rotados 90°, si bien no lo están (Fig. 7).

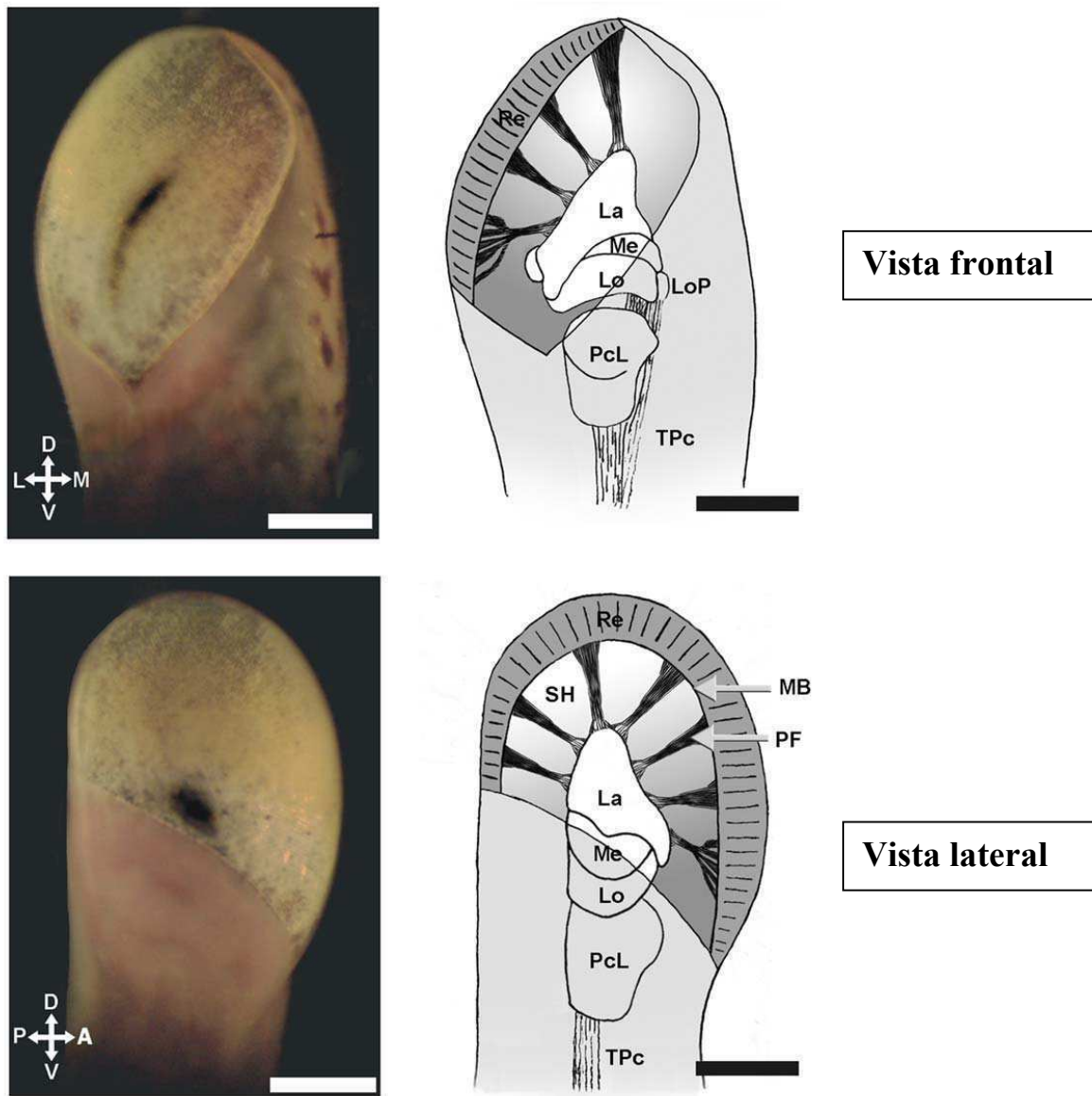
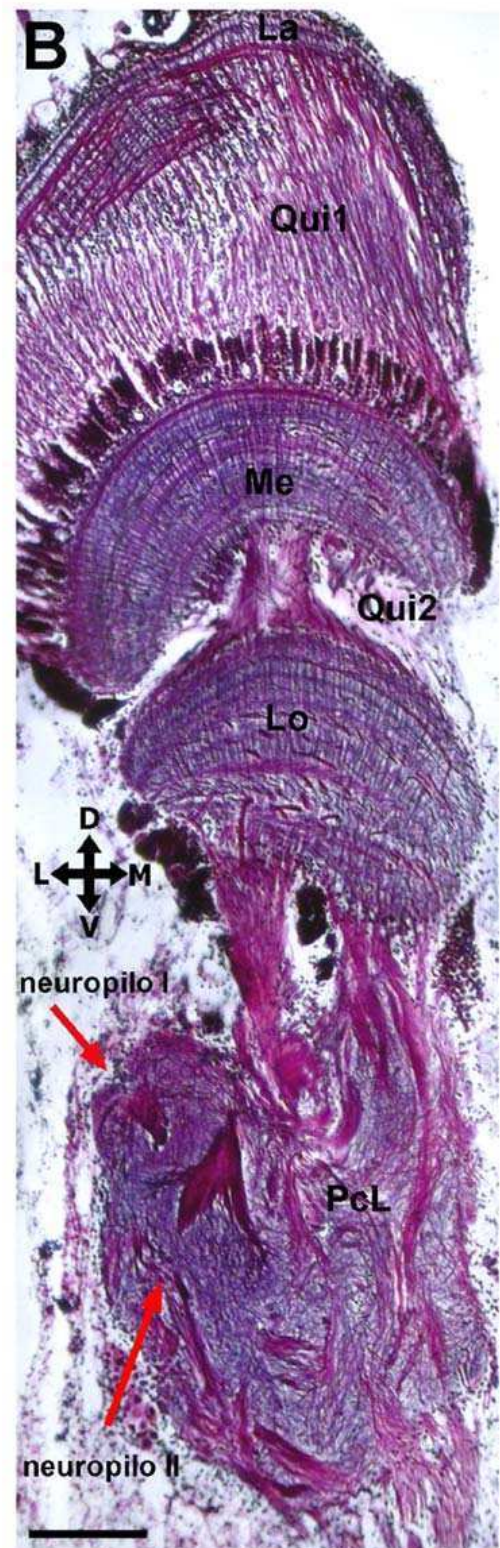
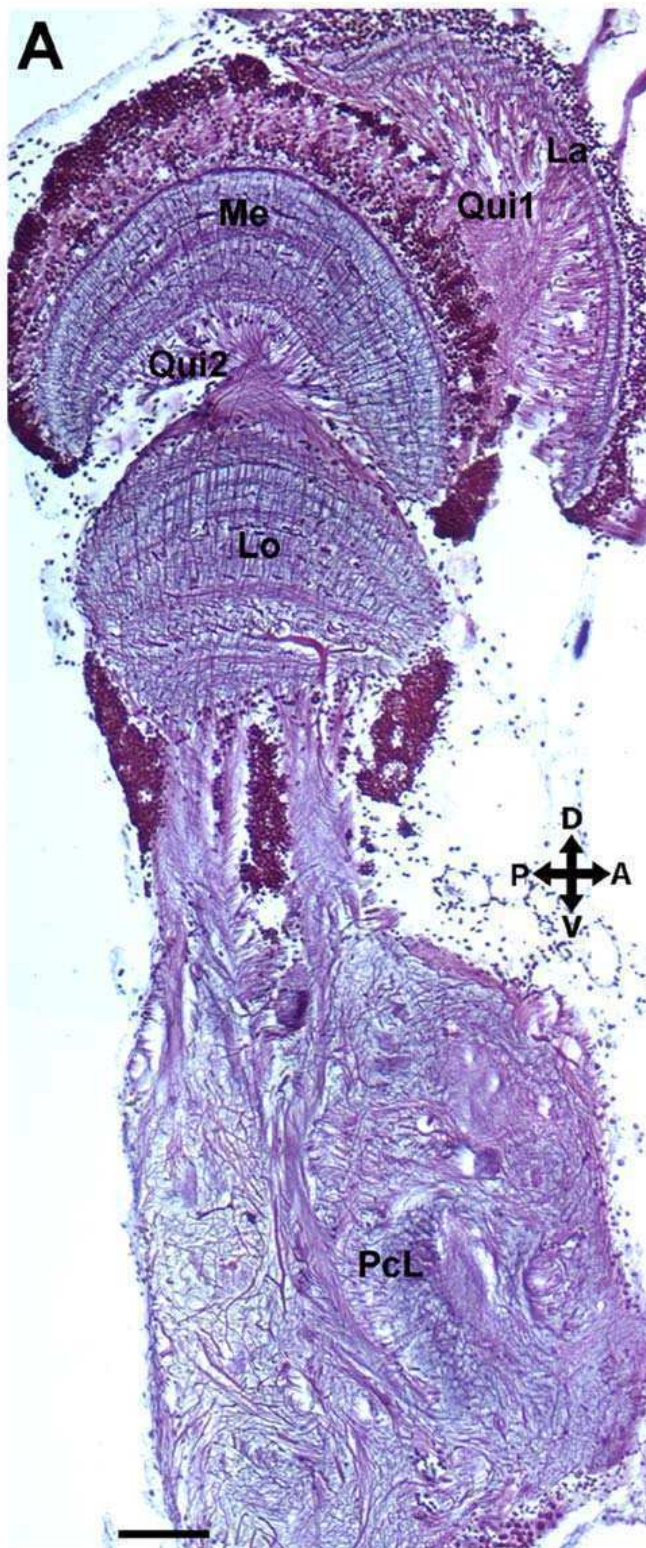


Figura 6: Sistema visual de *Chasmagnathus*. En el panel superior se muestra una vista frontal y en el inferior una vista lateral de los pedúnculos oculares y neuropilos ópticos de un ojo derecho. En las fotos puede observarse la distribución desigual de las omatidias en las distintas regiones y la pseudopupila (región oscura). Los diagramas a la derecha de cada foto muestran la retina y la organización y tamaño relativo de los neuropilos ópticos. Abreviaciones: La: lámina, Lo: lóbula, LoP: *lobula plate*, Me: médula, MB: membrana basal, PF: paquete de fibras de las células retinulares, PcL: protocerebro lateral, Re: retina, TPC: tracto protocerebral, SH: seno hemolinfático; A: anterior, D: dorsal, L: lateral, M: medial, P: posterior, V: ventral. Escala: 500 μ m.



La retina

Los ojos compuestos de los insectos y de los crustáceos son muy similares. Cada omatidia de un ojo compuesto está constituida por un conjunto de células retinulares o fotorreceptores y un aparato dióptrico, consistente de una lente córnea y un cono cristalino (Fig. 8).

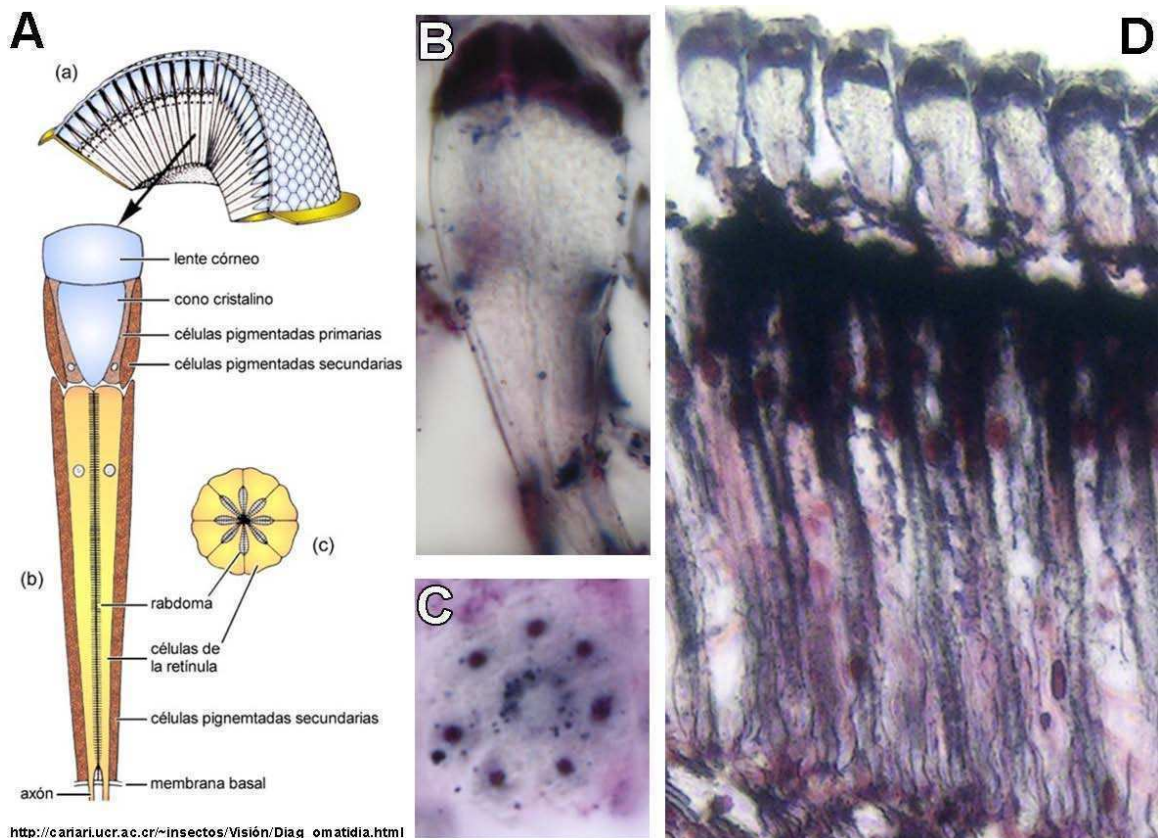


Figura 8: Organización de la retina de *Chasmagnathus*. A modo de ejemplo y con fines comparativos en la figura A se muestra un esquema del ojo compuesto de un insecto. (a) Aspecto general. (b) Esquema de una omatidia. (c) Corte tangencial de una omatidia donde se ven los 8 fotorreceptores y el rabdoma en el centro. B-D: Las omatidias del ojo compuesto de *Chasmagnathus* presentan similares características a las de los insectos (secciones de 12 µm teñidas con 5 gr Cu/100 ml). B) Se observa la lente córnea y el cono cristalino de una omatidia. C) Sección tangencial donde pueden verse 7 núcleos de los fotorreceptores de cada omatidia, correspondientes a los 7 fotorreceptores de mayor tamaño que aportan al rabdoma fusionado, el 8º de menor tamaño se ubica por debajo de los anteriores. D) Sección transversal mostrando un conjunto de omatidias.

Cada fotorreceptor tiene una estructura especializada, el rabdómero, que comprende una serie de invaginaciones de la membrana apical o microvilli. En los microvilli se hallan ubicados los pigmentos fotosensibles, las rodopsinas, junto con la maquinaria bioquímica necesaria para transducir la señal lumínica en una respuesta eléctrica. Los rabdómeros de los fotorreceptores de una omatidia forman en conjunto el rabdoma. El rabdoma actúa como una guía de luz por tener un índice de refracción mucho mayor que sus alrededores.

Los cangrejos semiterrestres poseen generalmente ojos de aposición, definidos así porque los fotorreceptores reciben luz proveniente del lente de su propia omatidia únicamente. En cambio en los ojos de superposición, como los del *crayfish*, cada fotorreceptor recibe luz de múltiples omatidias vecinas, implicando una menor resolución en la imagen final. Este tipo de adaptación aparece en animales que viven en ambientes menos luminosos.

Las omatidias de *Chasmagnathus* no son todas iguales. En efecto, presentan un gradiente en su tamaño cuyos extremos son las omatidias de la zona ventral (40 μm) y de la zona dorsal (25 μm). En la figura 9 se puede observar una sección transversal de la retina donde resulta evidente la variación de tamaño omatidial antes descripta.

En los decápodos, cada omatidia está compuesta de ocho células retinulares o fotorreceptores, 7 de gran tamaño que contribuyen al rabdoma fusionado y proyectan hacia la lámina (se pueden observar en *Chasmagnathus* en la Fig. 8C). El octavo (R8) es más pequeño, forma la parte distal del rabdoma y proyecta directamente hacia la médula (Stowe, 1977). Se ha demostrado en el *crayfish* la presencia de dos rodopsinas (Kennedy y Bruno, 1961) que permiten a los fotorreceptores máximos de absorción a 565-570 nm (amarillo-verde) y 425-445 (azul-violeta). Se ha sugerido que los 7 fotorreceptores grandes son los que poseen la sensibilidad en el amarillo-verde y que es el octavo el que posee la sensibilidad en el azul-violeta (Goldsmith, 1978).

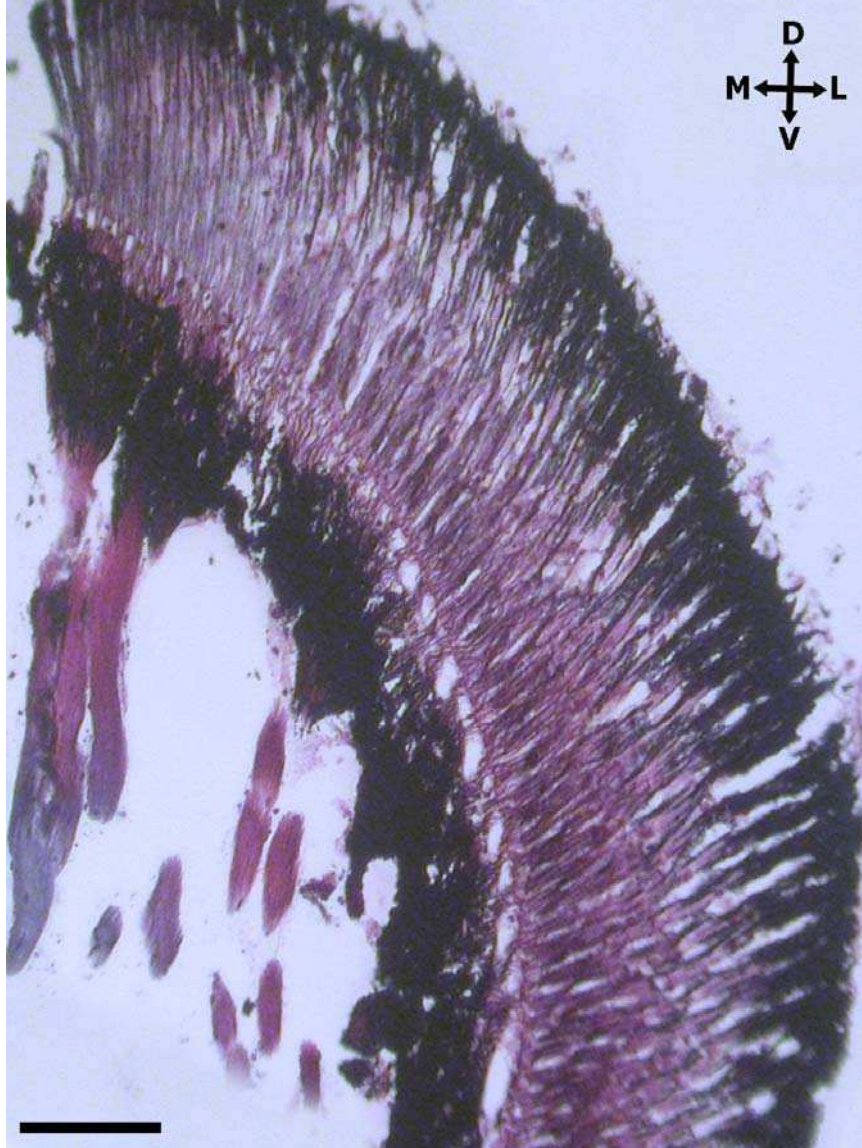
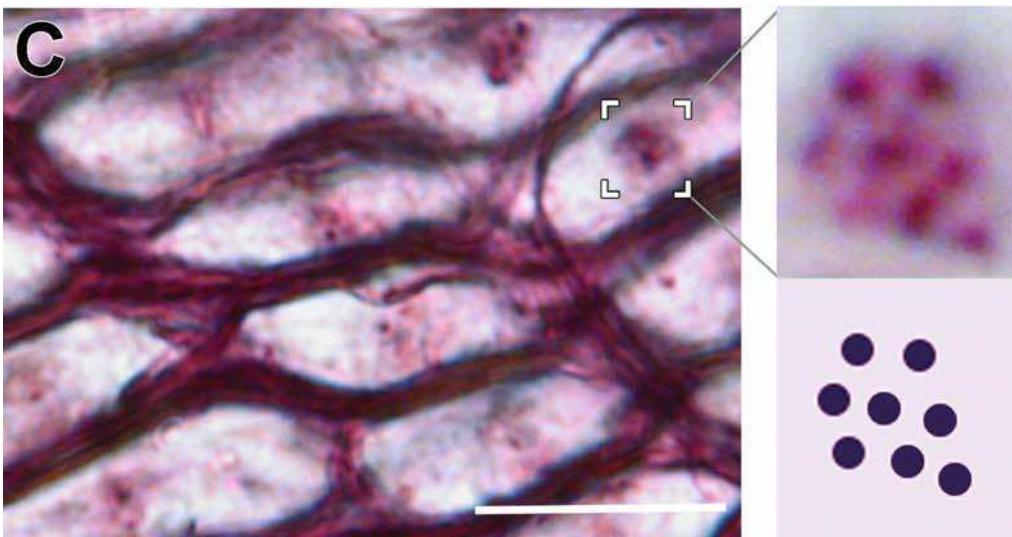
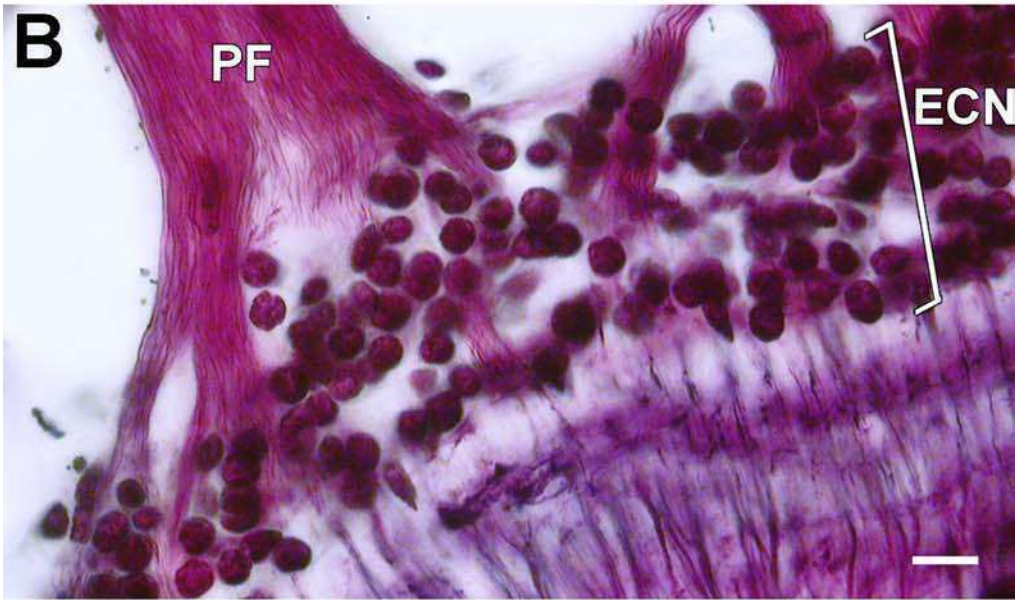
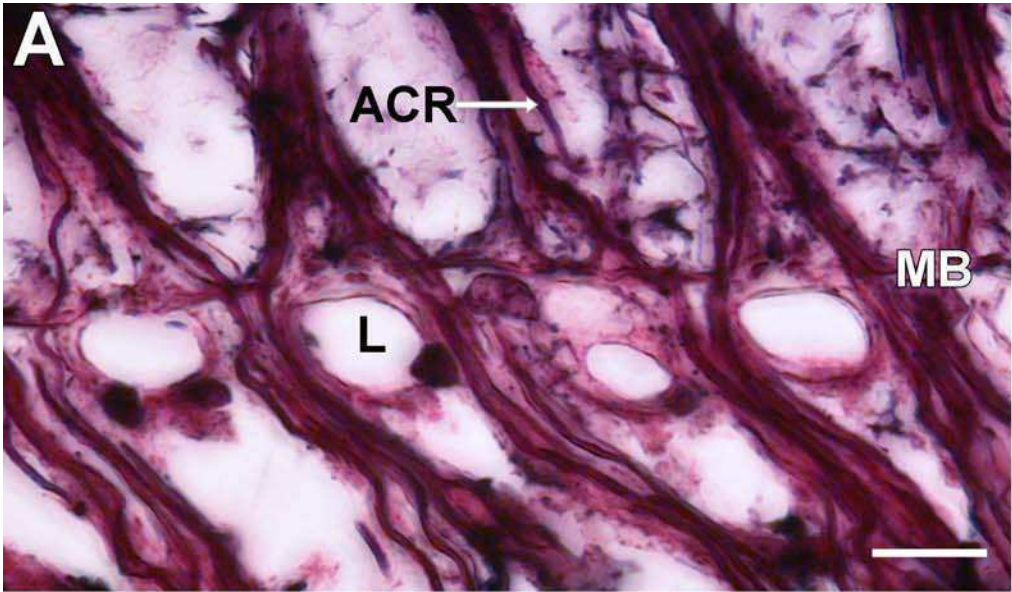


Figura 9: Gradiente en el tamaño de las omatidias en el cangrejo *Chasmagnathus*. Sección transversal de la retina de 12 μm de espesor teñida con 5 gr Cu/100 ml. Se puede observar la variación en el tamaño de las omatidias. Las omatidias dorsales son las más pequeñas, luego gradualmente el tamaño va aumentando hasta llegar al máximo en la zona ventral. Escala: 50 μm .

Los ocho axones de cada omatidia se extienden formando un haz coherente hasta la membrana basal de la retina (Fig. 10A). Se ha descrito en varias especies de cangrejos que los axones de las células retinulares de una omatidia pasan por 4 aberturas distintas de la membrana basal. Por cada orificio pasan 8 axones pero de omatidias vecinas. La observación de estos patrones de penetración hizo suponer que los cangrejos poseían ojos de superposición neural. En insectos, la superposición neural es encontrada en especies con rabdoma abierto e implica que en cada columna óptica (*cartridge*) de la lamina se juntan las células retinulares de distintas omatidias que comparten un mismo eje óptico.

Por debajo de la membrana basal, los axones de hasta 30 omatidias se juntan formando anchos haces que cruzan las lagunas hemolinfáticas hasta la lámina (Fig. 10B, ver también Fig. 6). Dentro de cada haz los axones provenientes de una omatidia muestran una tendencia a permanecer agrupados. Al penetrar la capa de somas de la lámina el haz se divide 4 o 5 veces hasta volver a formar los grupos de 8 (Fig. 10B,C). Utilizando técnicas de rastreo de axones con microscopía electrónica Stowe (1977) pudo comprobar en el cangrejo *Leptograpsus variegatus* que los axones de cada omatidia penetran en una misma columna de la lámina. Es decir, el mapa retinal es representado en la lámina por los terminales de las células retinulares en un arreglo inalterado. La apariencia general de las proyecciones entre la retina y la lámina que encontramos en *Chasmagnathus granulatus* coincide con esta descripción, por lo cual suponemos que las conclusiones expuestas más arriba son igualmente válidas para *Chasmagnathus*.



La lámina

La lámina es el neuropilo visual mejor estudiado en crustáceos (Hafner, 1973, 1974; Nässel, 1975, 1977; Nässel y col., 1978, Stowe y col., 1977; Strausfeld y Nässel, 1980; Elofsson y Hagberg, 1986; Wang-Bennett y col., 1989; Glantz y col., 2000; Kleinlogel y col., 2003). Al igual que en insectos está formada por cuatro tipos de neuronas:

- 1) terminales de los fotorreceptores de la retina
- 2) células monopolares y de tipo T (neuronas eferentes) que llevan la información desde la lámina hacia la médula
- 3) células centrífugas de la médula que terminan en la lámina
- 4) interneuronas locales o células amácrinas que proporcionan los circuitos locales entre los elementos de la lámina

La lámina de *Chasmagnathus* es una estructura elongada (Fig. 6, 7) cuyo eje mayor se extiende desde la zona anterolateral del ojo hacia la zona posteromedial. Al igual que en otros taxones descritos, la lámina está compuesta por una capa plexiforme (donde ocurren las sinapsis) y dos capas formadas por procesos tangenciales, el estrato tangencial distal y el proximal. Por encima de la capa distal se encuentra un estrato de cuerpos neuronales de las células monopolares (Fig. 11A-C). La organización de este neuropilo ejemplifica la encontrada en el resto de los neuropilos ópticos: procesos neuronales organizados en estratos que intersectan neuronas columnares que atraviesan el neuropilo. Por ejemplo, los axones de las células monopolares se extienden a través de las capas tangenciales proximal y distal, las cuales están formadas por los procesos de células centrífugas provenientes de la médula, por los procesos de células amácrinas que arborizan en ambos estratos de la lámina y por las ramas colaterales de las células monopolares.

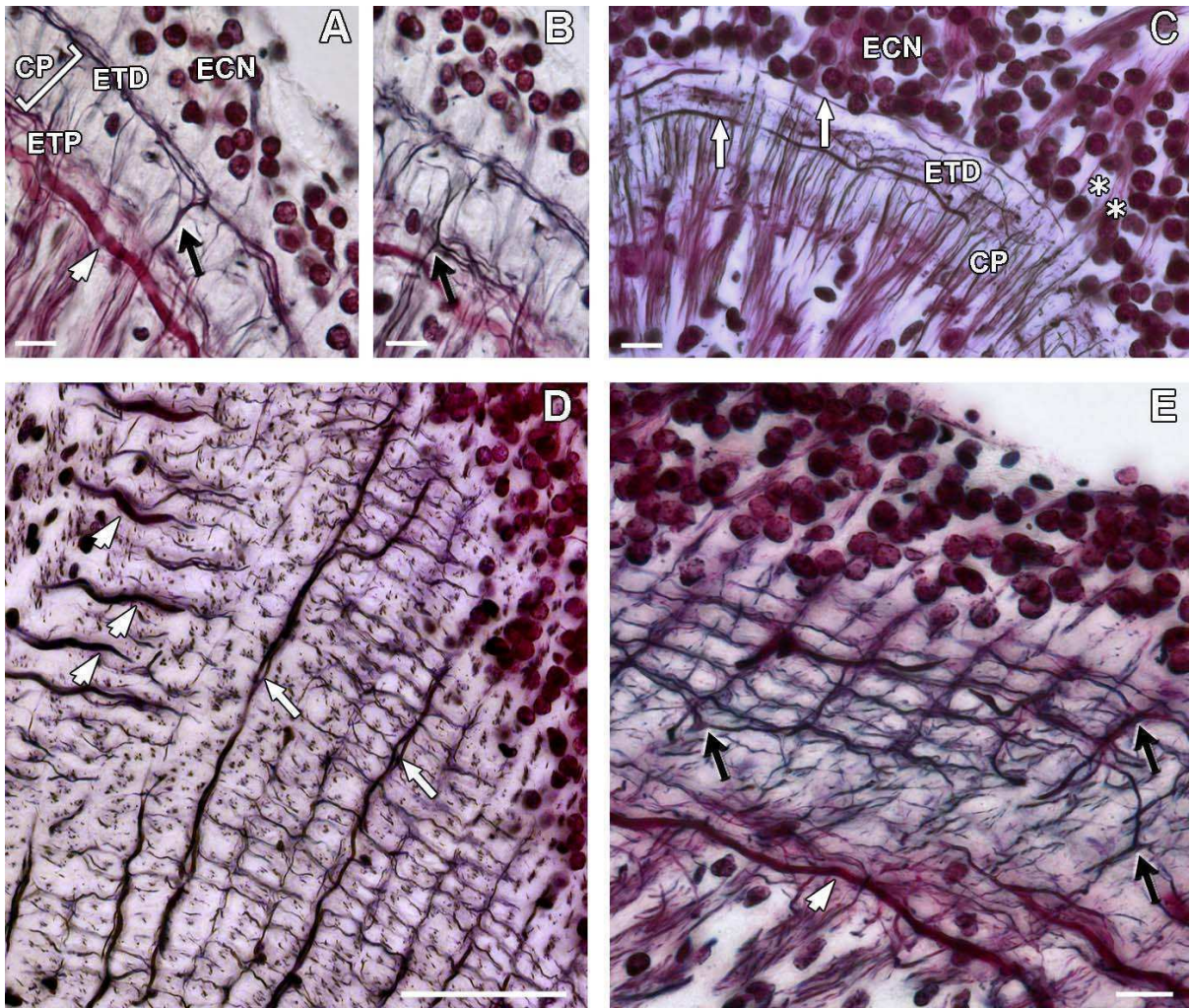


Figura 11: Arquitectura de la lámina de *Chasmagnathus*. La lámina está compuesta por una capa plexiforme (CP) y dos capas formadas por procesos tangenciales, el estrato tangencial distal (ETD) y el proximal (ETP). El neuropilo está cubierto por un estrato de cuerpos neuronales (ECN) de las células monopolares. A) y B) son secciones transversales donde se observan procesos de las neuronas Tan 1 (flechas negras) extendiéndose en las capas distal (A) y proximal (B). Los procesos principales de las Tan 2 (cabecitas de flecha blanca) se extienden en la ETP. Tanto los procesos tangenciales de las Tan 1 como los de las Tan 2 se extienden en el eje lateromedial y no pueden ser vistos en las secciones longitudinales, como en C, donde los elementos de tipo Tan 3 (flechas blancas) muestran sus largos procesos extendiéndose anteroposteriormente en el ETD justo por debajo del ECN. Los asteriscos en C muestran los haces de axones de los fotorreceptores entrando en la lámina. D) Sección tangencial donde se observa la demarcación de las columnas retinotópicas. Los procesos de las Tan 2 corren de forma perpendicular respecto a las Tan 3, los procesos principales de las cuales corren usualmente entrelazados de a pares. Los bordes que demarcan el arreglo rectilíneo de las columnas ópticas están definidos por los procesos tangenciales de las Tan 1. Esto se observa claramente en E) donde la sección es tangencial pero oblicua. Las flechas negras resaltan los procesos distales de tres Tan 1. Secciones de 12 μm de espesor teñidas con 2,5 gr Cu/100 ml. Escala: 10 μm en A, B, C, E; 50 μm en D.

Ciertos tipos neuronales previamente descritos en otras especies pudieron ser identificados en *Chasmagnathus*. Un ejemplo son las neuronas tangenciales de tipo 1 (Tan 1) las cuales han sido descritas en el *crayfish* utilizando la técnica de Golgi (Nässel, 1977). Las mismas poseen de 3 a 6 ramificaciones principales, a partir de las cuales se extienden numerosos procesos tangenciales biestratificados que a su vez se dividen formando procesos terciarios. Este patrón de ramificación le da a la célula una apariencia arbustiva (*bush-like*).

Si bien con la técnica de Bodian no es posible dilucidar las estructuras más finas de las neuronas, en *Chasmagnathus* se observan neuronas con procesos en los dos estratos tangenciales (Fig. 11A,B) que poseen una organización similar a la descrita para los procesos primarios y secundarios de las Tan 1 del *crayfish*. Cabe destacar sin embargo, que mientras la técnica de Golgi muestra el patrón de arborización de una neurona en su máximo detalle, la técnica de Bodian muestra que cuando el conjunto de estas células es teñido éstas proveen un plexo regular de procesos ubicados en forma rectilínea (Fig. 11D,E). Las ramas principales se extienden verticalmente mientras que los procesos secundarios corren en el eje anteroposterior. Cada una de estas ramas puede extenderse a través de hasta 10 columnas ópticas. Se puede observar un alto grado de superposición entre los procesos de varias Tan 1 (Fig. 11E).

Las neuronas tangenciales de tipo 2 (Tan 2), también descritas originalmente en el *crayfish*, poseen una neurita primaria de importantes dimensiones que se extiende por debajo del estrato proximal, al mismo nivel en que los axones de las células monopolares salen hacia el primer quiasma óptico (Nässel, 1977). De estas ramas primarias, surgen procesos secundarios que se proyectan verticalmente hacia el estrato tangencial distal. En *Chasmagnathus* los voluminosos procesos primarios de las Tan 2 pueden ser observados en las secciones transversales (Fig. 11A) pero no en las secciones longitudinales (Fig. 11C), mostrando que únicamente se extienden en el plano lateromedial (Fig. 11D).

Un tercer tipo de neurona tangencial que no fue descrita previamente se evidencia en nuestros preparados de *Chasmagnathus*. Las llamamos correlativamente neuronas tangenciales de tipo 3 (Tan 3). Estas neuronas poseen largos procesos que se extienden en el eje anteroposterior en el estrato externo o distal, justo por debajo del estrato de cuerpos neuronales (Fig. 11C). Frecuentemente se observan dos de estos procesos, probablemente de dos células distintas, que se entrelazan y viajan juntos a través de numerosas columnas (Fig. 11D). Los procesos de estas neuronas tienden a

ensancharse hacia el lado lateral donde se los observa descender a través de la capa plexiforme de la lámina hacia el quiasma óptico. Se puede seguir la trayectoria de estos axones y verlos atravesar el quiasma y reunirse en la zona medial de la médula donde dan lugar a un grupo de somas de gran tamaño (Fig. 12). El número de somas que comprende este grupo es aproximadamente 100 y la forma de esta estructura es más o menos esférica ocupando alrededor de 160 μm tanto en el plano longitudinal como en el transversal. La posición y el tamaño de estos somas alientan la posibilidad de realizar registros intracelulares en estas neuronas y así poder caracterizar fisiológicamente un nuevo tipo de neurona tangencial de los crustáceos.

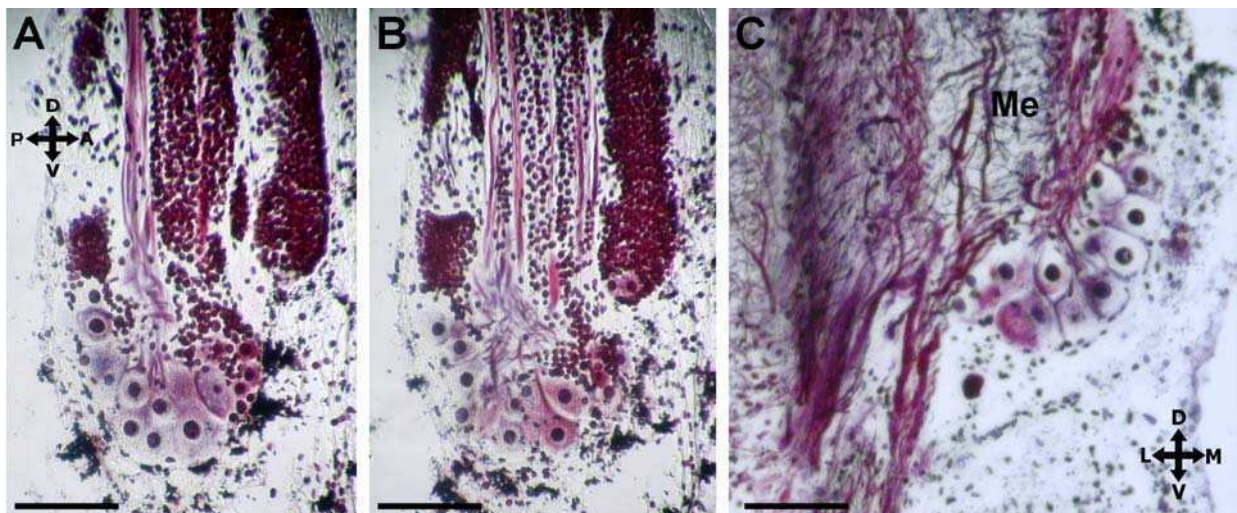
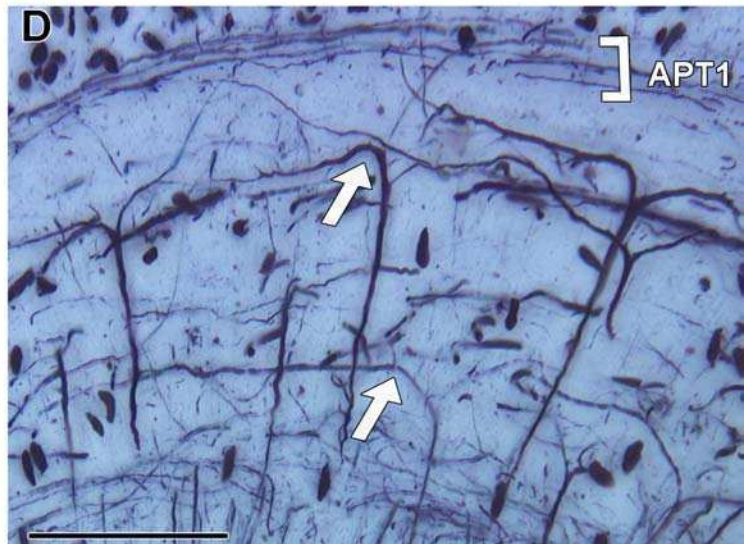
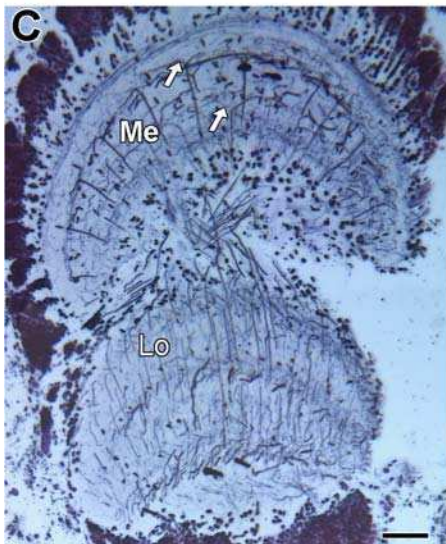
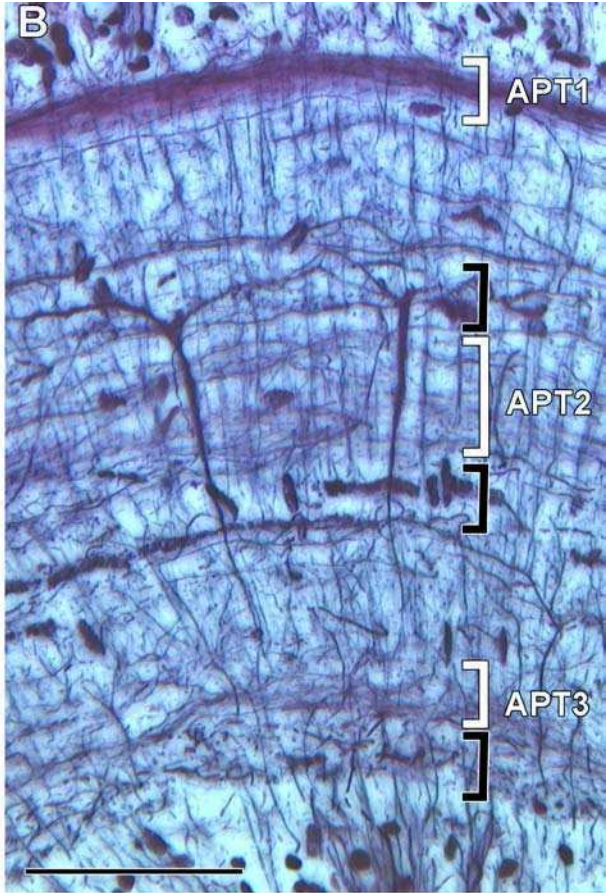
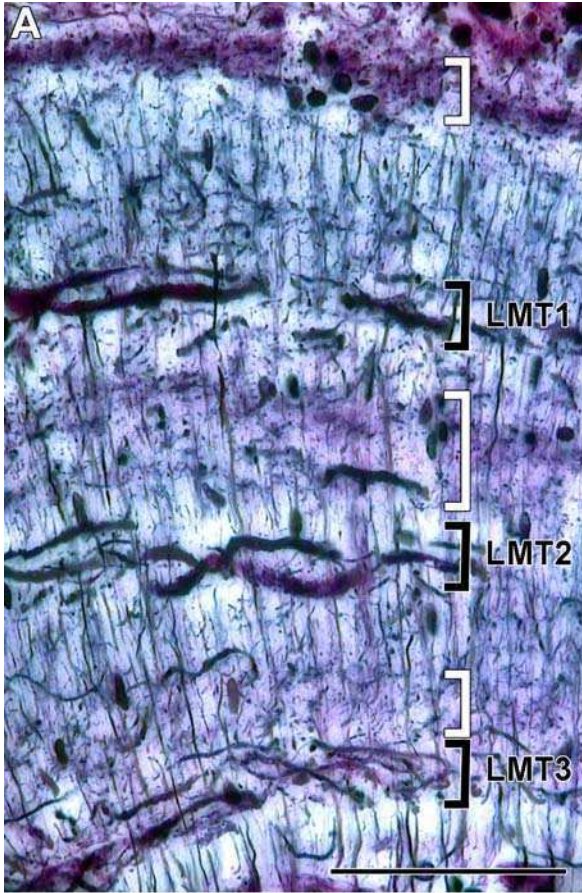


Figura 12: Grupo de somas perteneciente a las neuronas Tan 3 de *Chasmagnathus*. A, B) Dos secciones longitudinales consecutivas en el extremo medial del preparado. Se pueden ver los axones de las Tan 3 proyectando hacia los somas en forma de haces. C) Sección transversal donde se puede apreciar la posición relativa de este grupo de somas respecto a la médula. Secciones de 12 μm de espesor teñidas con 2,5 gr Cu/100 ml. Escala: 50 μm .

La médula

La médula de *Chasmagnathus* tiene forma de domo siendo el eje lateromedial un poco más elongado por lo cual parece más amplia en la vista frontal que en la lateral (Fig. 6, 7). La médula recibe información retinotópica vía el primer quiasma óptico a través del fotorreceptor R8 proveniente de la retina y a través de las células monopolares y T de la lámina. Se han descrito muy pocas neuronas de la médula con anterioridad y éstas han sido casi exclusivamente del *crayfish* (Strausfeld y Nässel, 1980). Los tipos neuronales identificados son los siguientes: neuronas transmedulares que terminan en la lóbula y poseen sus somas en el estrato externo de la médula. Diversos tipos de células T que poseen sus somas por debajo de la médula, y al igual que las transmedulares, poseen procesos dendríticos en la médula y terminales en la lóbula. Además de los tipos neuronales anteriores que fueron descritos utilizando la técnica de Golgi, se conocen dos tipos de neuronas tangenciales que fueron identificadas utilizando tinciones intracelulares con Lucifer Yellow (Kirk y col., 1982, 1983a) y otros elementos tangenciales selectivamente revelados con anticuerpos anti-alostina (Dirksen y col., 1999).

Nuestros preparados teñidos con plata reducida en *Chasmagnathus* muestran que la médula está organizada en estratos y columnas. Notablemente, el patrón observado en las secciones longitudinales y transversales es muy distinto. Esto se debe a que la organización de los procesos que se extienden tangencialmente a través del mosaico de columnas es rectilínea: en cada estrato los procesos se extienden o bien a lo largo del eje anteroposterior o bien del lateromedial. Esto puede verse comparando las figuras 13 A y B donde los estratos definidos por los procesos tangenciales que se extienden siguiendo el eje lateromedial (Fig. 13A) aparecen como capas de puntos en las secciones cortadas en el eje anteroposterior (Fig. 13B). Del mismo modo, los estratos definidos por procesos tangenciales siguiendo el eje anteroposterior, visibles en los cortes longitudinales, se observan como estratos conformados por perfiles discretos en las secciones transversales.



En las secciones transversales se observan 3 estratos de procesos tangenciales (Fig. 13A). Estos estratos se hallan separados por capas intermedias compuestas por los delgados procesos dendríticos de los elementos columnares y por los antes mencionados procesos tangenciales anteroposteriores seccionados en forma perpendicular a su eje principal. Partiendo de la superficie distal de la médula hacia la proximal (interna), hemos denominado a los mismos como estratos lateromediales tangenciales 1-3 (LMT1, LMT2, LMT3). El LMT1 y el LMT2 están formados por procesos de diámetro considerable mientras que el LMT3 está compuesto de elementos más finos y relativamente más cortos. Las ramas de las neuronas que conforman los LMT1 y LMT2 siguen una trayectoria sinusoidal que atraviesa gran parte del mosaico retinotópico columnar (Fig. 14B). Las tinciones intracelulares (Fig. 14A) demuestran que al menos parte de estos procesos pertenecen a las neuronas *sustaining* y *dimming*, las cuales proyectan sus axones directamente hacia el ganglio supraesofágico.

En las secciones longitudinales (Fig. 13B) también quedan definidos 3 estratos tangenciales que han sido denominados del más distal al más proximal estratos anteroposteriores tangenciales 1-3 (APT1, APT2, APT3). Estos estratos están formados por procesos finos. APT1 comprende numerosas fibras densamente compactadas que derivan de los somas que se encuentran por encima de la médula. Por lo tanto interpretamos que este estrato está compuesto principalmente por las neuritas de neuronas transmedulares y amácrinas. En contraste las capas APT2 y APT3 muestran un arreglo menos compacto de sus componentes. La variación en la densidad de estas capas se manifiesta como cambios de opacidad en las secciones transversales (Fig. 13A).

En las secciones longitudinales se puede identificar un grupo de neuronas transmedulares que poseen su dendrita distal bifurcada en forma de Y. Como puede advertirse mirando la figura 13 cada una de estas neuronas está orientada en el eje anteroposterior del mosaico retinal. Sus dendritas y axón se originan a partir de una fina neurita que proviene de APT1 (Fig. 13D). Debido a la orientación del segundo quiasma óptico los axones de neuronas Y individuales no pueden verse completos en una única sección. Sin embargo, al utilizar una alta concentración de cobre en los preparados, estas neuronas son marcadas selectivamente y por lo tanto se puede seguir la trayectoria de sus axones a lo largo de varias secciones y observar que proyectan a niveles profundos de la lóbula (Fig. 13C).

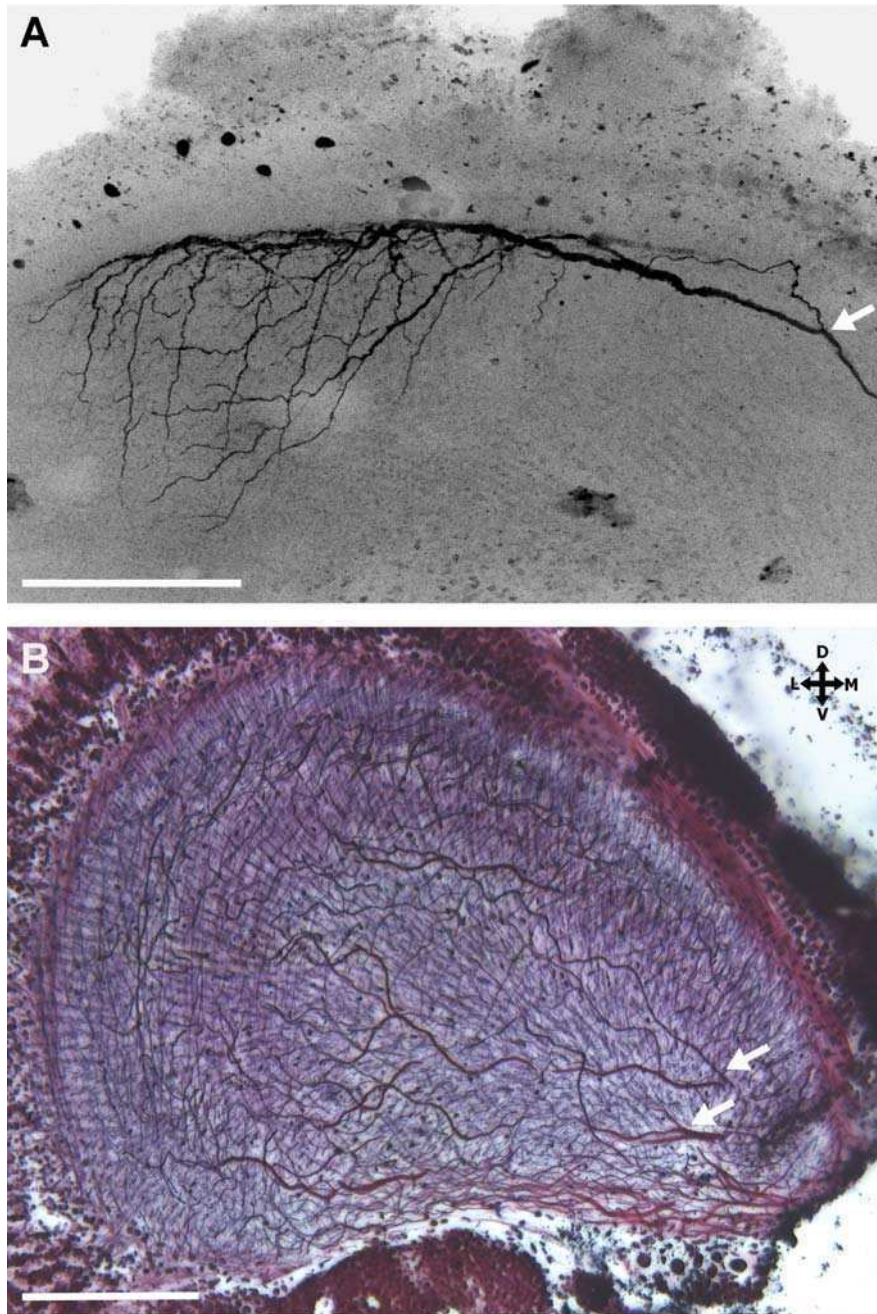
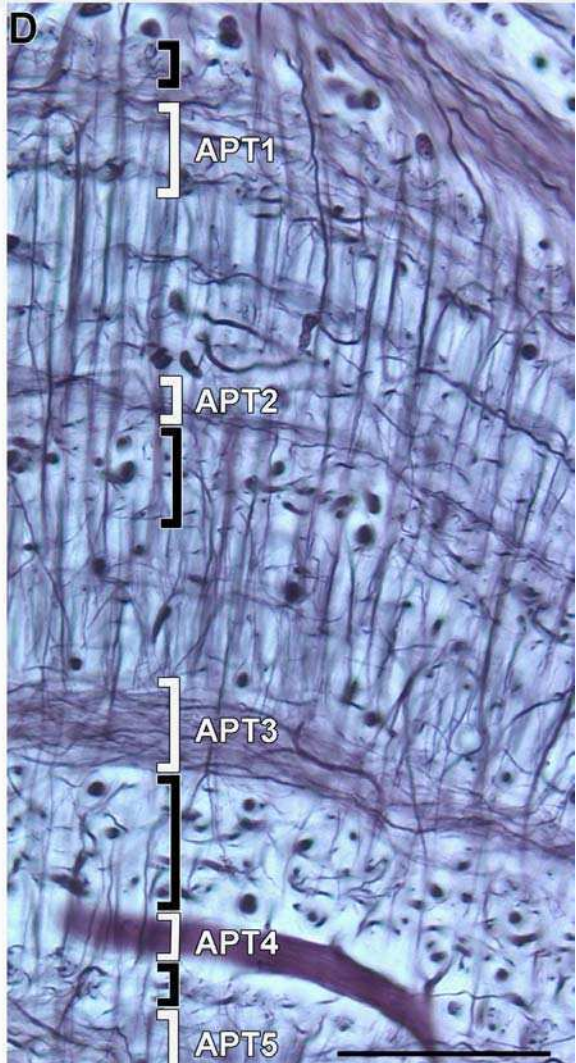
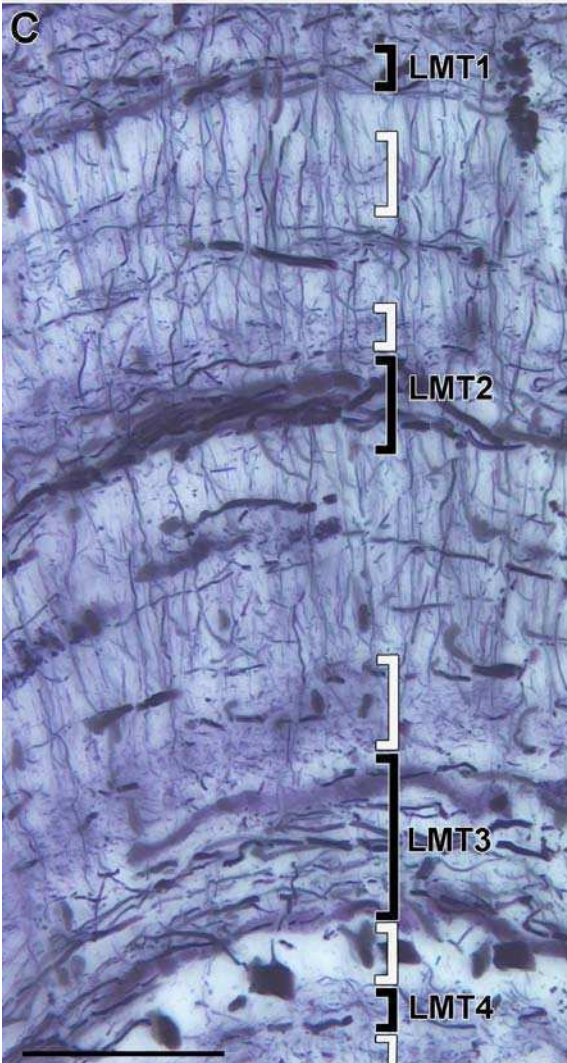
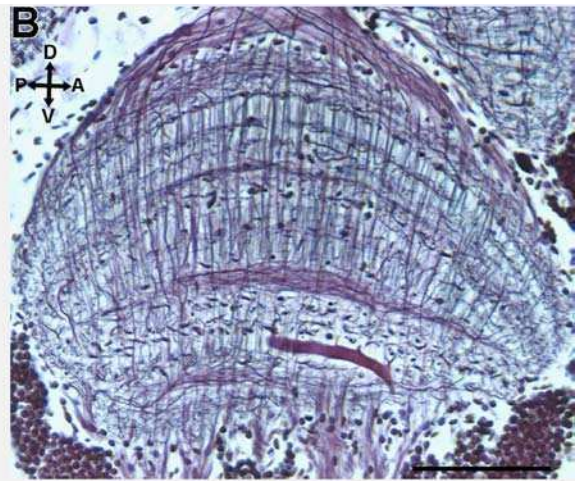
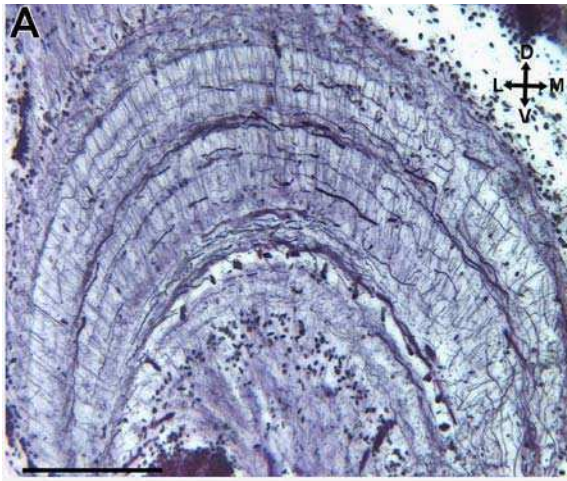


Figura 14: Neuronas tangenciales de la médula de *Chasmagnathus*. A) Imagen confocal (vista frontal) de una tinción intracelular de una neurona *dimming* mostrando la extensión de su árbol dendrítico en la médula. Las neuritas principales parecen extenderse en el estrato LMT 1. B) Sección tangencial de una preparación teñida con Bodian (12 μm , 2,5 gr Cu/100 ml) de un borde de la médula mostrando las trayectorias y patrón de ramificación de elementos tangenciales que se ensanchan y convergen hacia la zona medial del neuropilo. Parte de estos procesos parecen corresponder a neuronas tipo *dimming* (flechas). Escala: 100 μm .

La lóbula

Al igual que la médula, la lóbula de *Chasmagnathus* tiene forma de domo siendo su eje lateromedial un poco más elongado (Fig. 6, 7). La lóbula recibe información retinotópica de la médula a través del segundo quiasma óptico, siendo una de sus entradas las neuronas transmedulares de tipo Y descritas en la sección anterior y mostradas en la figura 13C. Estas neuronas terminan en un estrato profundo de la lóbula y su distribución en la médula y lóbula muestra una reducción en el mosaico retinotópico, es decir, la información correspondiente a varias columnas ópticas converge en este tipo neuronal. Sin embargo, esta reducción no es común a todos los elementos medulares de proyección. Resultados preliminares utilizando la técnica de Golgi muestran que la mayoría de los tipos neuronales de proyección aparecen en columnas contiguas. Es decir, en la lóbula se preserva el arreglo retinotópico columnar sin síntesis anatómica evidente. Esta característica resulta perceptible también en los preparados de Bodian donde el espaciado de las columnas en la lóbula es aproximadamente el mismo que en la médula (ver Fig. 7). Por lo tanto, en contraste con lo que sucede en el caso de los insectos terrestres (Strausfeld, 1998; Sinakevitch y col., 2003), la representación del mosaico retinotópico no converge en la lóbula de los crustáceos excepto por el espaciado de ciertos tipos de neuronas de proyección como las neuronas Y de la médula.

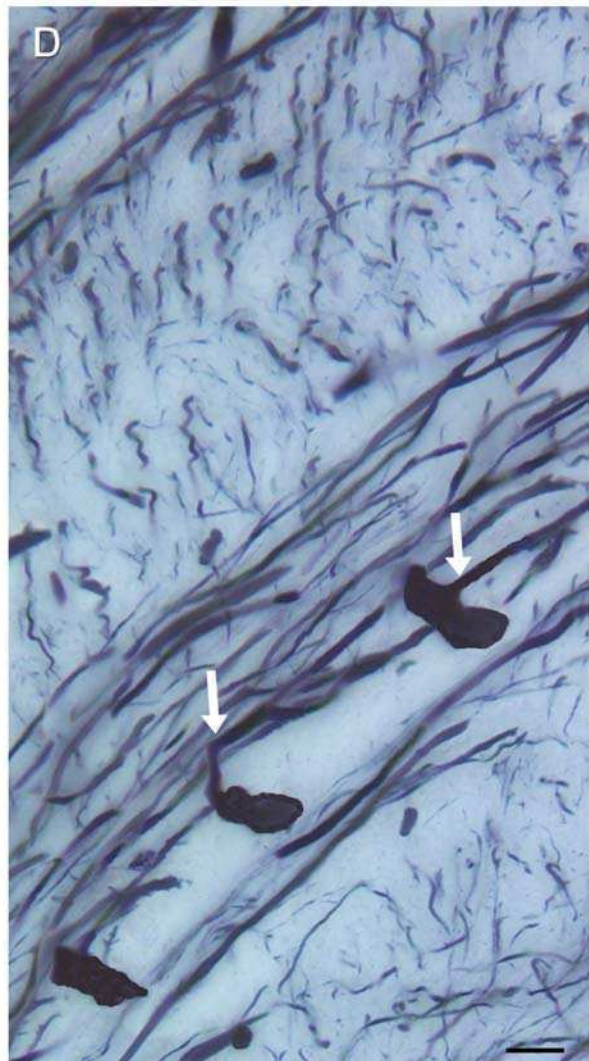
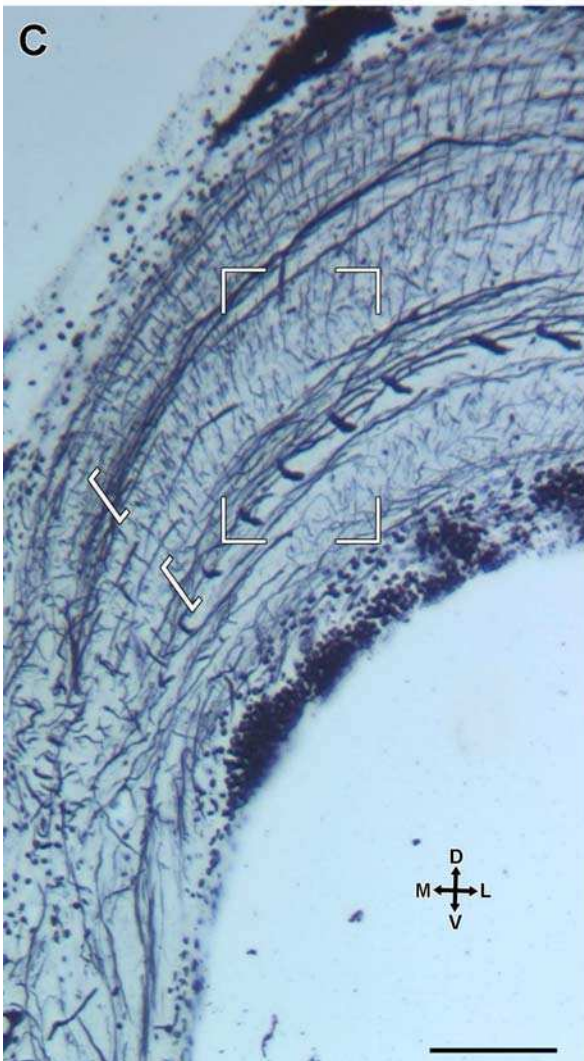
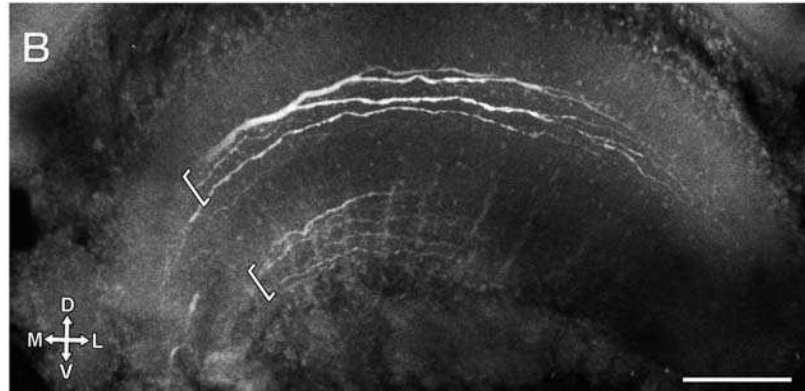
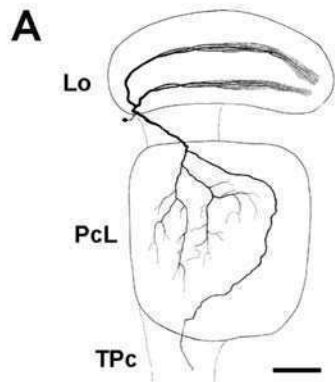
Al igual que en la lámina y la médula, la apariencia de la fibroarquitectura de la lóbula depende de la orientación de los cortes ya que los diferentes tipos neuronales tienen sus procesos tangenciales orientados exclusivamente en un plano. En los cortes transversales se pueden observar 4 estratos de procesos tangenciales orientados lateromedialmente. De la periferia al centro han sido denominados LMT1-4 (Fig. 15A,C). Estos estratos están separados por regiones conteniendo las arborizaciones de elementos columnares, ramificaciones secundarias de neuronas tangenciales, interneuronas locales y los perfiles de las neuronas que corren anteroposteriormente. Los estratos LMT1 y LMT4 están compuestos por elementos tangenciales relativamente finos, en cambio los estratos LMT2 y LMT3 contienen neuronas de mayor diámetro y que se ensanchan hacia la parte medial del neuropilo (Fig. 15A, 16C). Se observan otros procesos tangenciales pero que no forman estratos definidos.

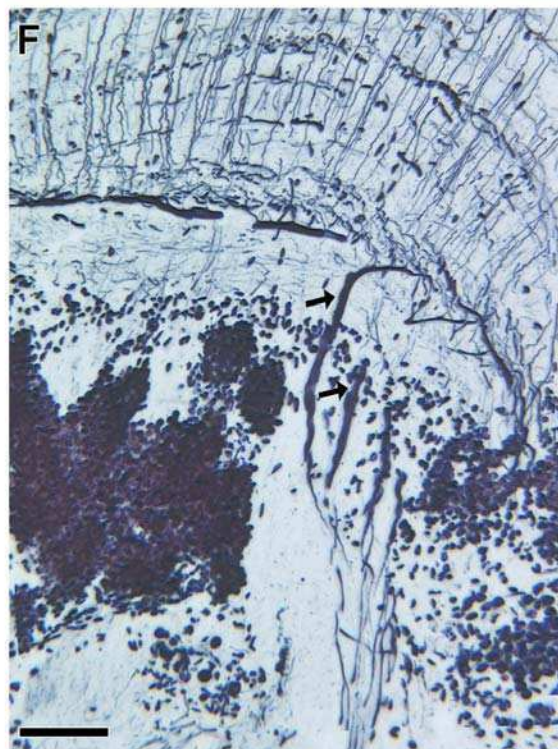
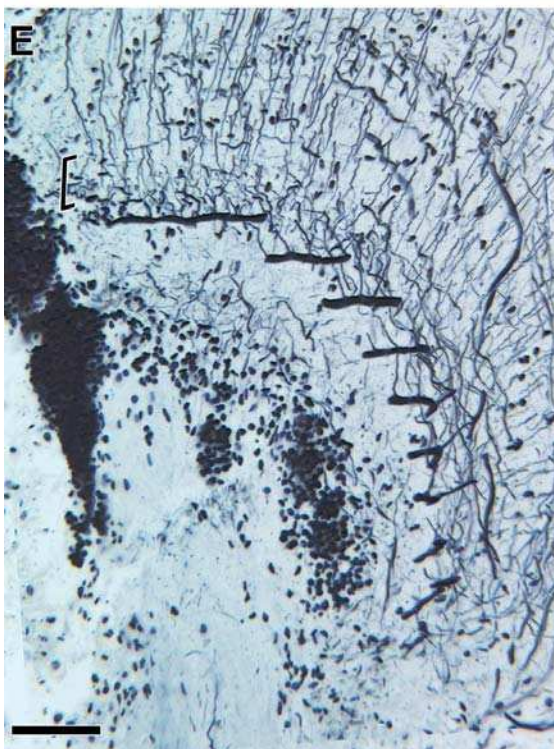
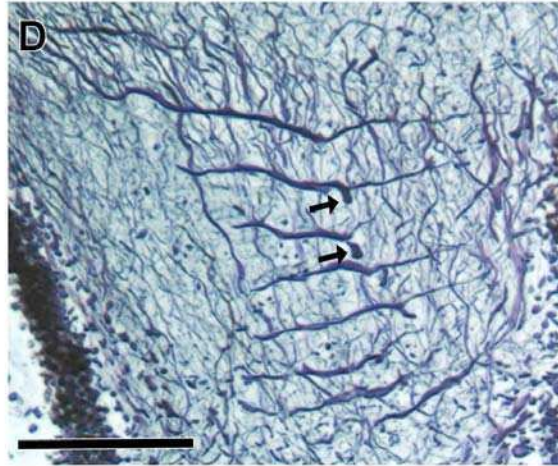
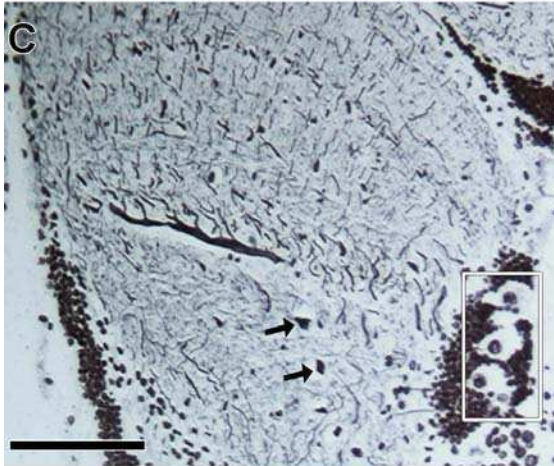
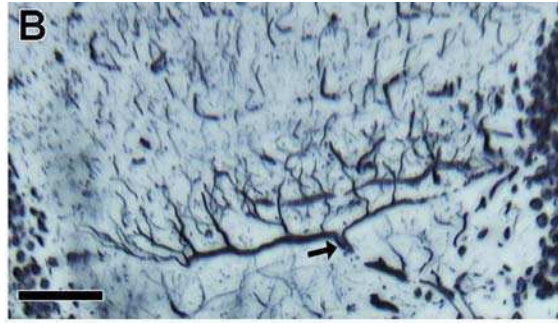
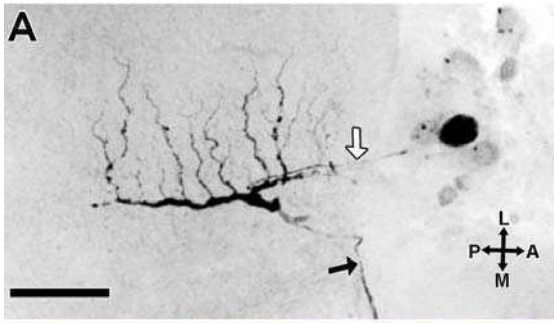


Tinciones intracelulares (Fig. 16A,B) demuestran que las capas LMT2 y LMT3 comprenden el árbol dendrítico de neuronas detectoras de movimiento (NDM) previamente identificadas (Berón de Astrada y Tomsic, 2002). Aquí decidimos renombrar estos elementos como neuronas detectoras de movimiento biestratificadas (B-NDM) para diferenciarlas del tipo monoestratificado que será descrito más adelante. El árbol dendrítico de cada una de estas B-NDM está formado por numerosas ramificaciones que corren paralelas unas a otras en el eje lateromedial de la lóbula. Las dendritas convergen hacia la parte medial del neuropilo a una rama axónica única que puede ser seguida atravesando el protocerebro lateral y saliendo por el tracto protocerebral (Berón de Astrada y Tomsic, 2002).

Los cortes longitudinales de la lóbula (Fig. 15B,D) muestran 5 estratos compuestos por procesos tangenciales orientados anteroposteriormente. Desde la periferia al centro los hemos denominado APT1-5. Estos estratos se hallan separados por espacios más claros donde la organización columnar es evidente y se observan los perfiles de los procesos orientados perpendiculares al plano de sección.

El estrato APT4 merece especial atención ya que se halla formado por 14 células, cada una de las cuales posee una neurita primaria de considerables dimensiones (8-10 μm de diámetro) orientada en el eje anteroposterior (Fig. 15B,D, también ver Fig. 7A). Las neuritas primarias de estas 14 células se ubican en paralelo, separadas una de otra por 35 μm (Fig. 16C, 17D). De cada neurita primaria surgen en ángulo recto múltiples neuritas colaterales que corren en el eje lateromedial (Fig. 17A,B) aparentemente en íntimo contacto con la rama inferior de las B-NDM en el LMT3 (Fig. 16C,D, 17E). Cada neurita primaria se conecta a un axón que recorre una pequeña distancia antes de reducir dramáticamente su tamaño. Este atraviesa luego el protocerebro lateral y desciende por el tracto protocerebral (Fig. 17A). Todos los axones de este grupo celular se reúnen en un haz para atravesar el protocerebro lateral (Fig. 17F). Los cuerpos celulares de estas neuronas son muy grandes (aproximadamente 35 μm de diámetro) y se encuentran agrupados en la zona anteromedial de la lóbula. Una neurita muy fina los une a la neurita primaria (Fig. 17A,C).





Estudios fisiológicos en conjunto con tinciones intracelulares demostraron que este tipo neuronal pertenece al grupo de las llamadas Neuronas Detectoras de Movimiento descrito originalmente por Berón de Astrada y Tomsic (2002). Dado que todo el árbol dendrítico de estas neuronas se extiende únicamente en un estrato las hemos denominado aquí Neuronas Detectoras de Movimiento Monoestratificadas (M-NDM).

El hecho de que estas neuronas estén involucradas en el aprendizaje y la memoria visual de *Chasmagnathus* (Tomsic y col., 2003) junto con su gran tamaño y el dato de que su población está compuesta por sólo 14 unidades, brinda interesantes oportunidades para el estudio de los eventos celulares que subyacen a estos complejos fenómenos, al tiempo que se producen en el animal intacto.

Un nuevo neuropilo visual en crustáceos

En ciertos órdenes de insectos (Coleóptera, Lepidóptera y Díptera) la lóbula se halla acompañada por un cuarto neuropilo, la *lobula plate*, formando así el complejo lobular (*lobula complex*). Tanto la lóbula como la *lobula plate* reciben proyecciones retinotópicas de la médula. El orden lineal de dichas proyecciones es revertido en la lóbula mediante el segundo quiasma, mientras que en la *lobula plate* el ordenamiento es el mismo que en la médula.

La *lobula plate* es un neuropilo de forma alargada y chata. En su interior se encuentran neuronas tangenciales (LPTC: *lobula plate tangential cells*) de gran diámetro que proyectan sus axones hacia tractos descendentes al cerebro (Strausfeld, 1998). Dado el gran tamaño de sus procesos (cerca de 10 μm) estas neuronas fueron de las primeras en ser registradas intracelularmente en la mosca (en diversas especies aunque la más estudiada es *Calliphora vicina*). En cada *lobula plate* se pueden identificar cerca de 60 neuronas distintas basándose en su anatomía y propiedades fisiológicas. En general, las LPTC son excitadas por movimientos en una dirección e inhibidas por movimientos en la dirección contraria. Según los resultados de experimentos de ablación y las similitudes entre las respuestas de estas neuronas y los distintos tipos de comportamientos guiados por la visión, se ha concluido que estas neuronas están involucradas en la ejecución de las respuestas optomotoras y en el control de la trayectoria de vuelo (Borst y Haag, 2002).

Recientemente, se ha documentado la existencia de un cuarto neuropilo de similares características (recibe axones no cruzados de la médula) en dos crustáceos, el isópodo *Ligia occidentalis* y el camarón *Palaeomonetes pugio* (Sinakevitch y col., 2003).

En preparados de Bodian de *Chasmagnathus granulatus* y de *Hemigrapsus sanguineus*, ambos crustáceos decápodos, pudimos identificar un neuropilo semejante a la *lobula plate* (Fig. 18). Este neuropilo se halla ubicado en la zona anteromedial del lóbulo óptico, adyacente a la lóbula y por debajo de la glándula del seno.

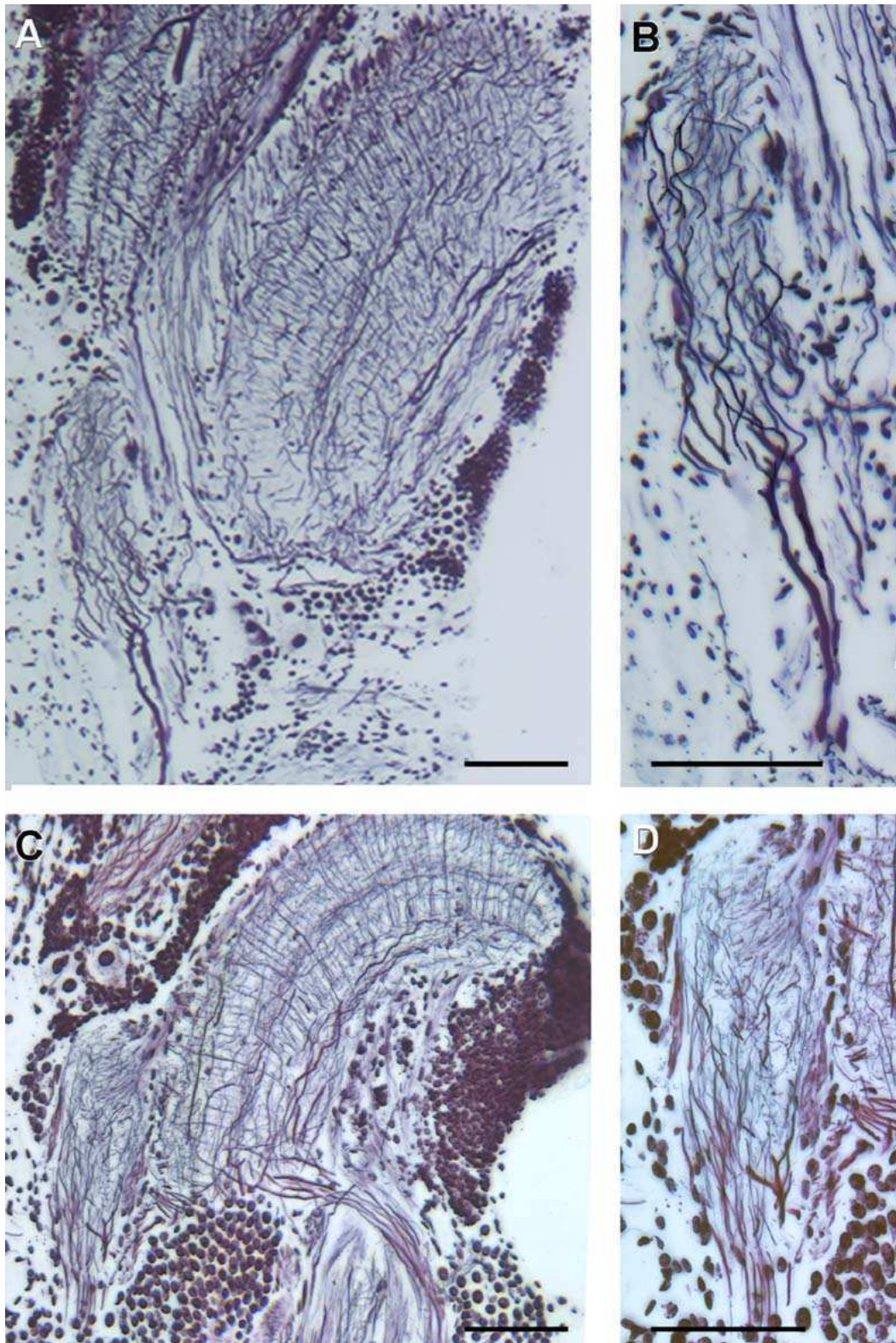


Figura 18: La lobula plate de los cangrejos. Sección transversal de la lóbula y lobula plate, la última es un neuropilo que recibe información de la médula por medio de axones no cruzados y que posee neuronas tangenciales de gran tamaño cuyos axones proyectan hacia el cerebro medio. A) y B): *Chasmagnathus granulatus*. C) y D): *Hemigrapsus sanguineus*. Secciones de 12 μm de espesor teñidas con 5 gr Cu/100 ml. Escala 100 μm en A y B; 50 μm en C y D.

Discusión:

Neuroarquitectura de los neuropilos ópticos

La presente descripción de los neuropilos ópticos de los cangrejos basada en el estudio de tejidos teñidos con la técnica de Bodian, confirma datos de estudios histológicos previos realizados mayormente con la técnica de Golgi (Hanström, 1928, Nässel, 1975, 1977; Strausfeld y Nässel, 1980). Este estudio, sin embargo, constituye una descripción sin precedentes acerca de la organización neuroanatómica del sistema visual de los crustáceos y de la identificación de varios de sus elementos neuronales. Además, el análisis detallado de cortes ortogonales revela que en los neuropilos ópticos la organización de los estratos tangenciales a lo largo del eje longitudinal y transversal es distinta. Estas diferencias surgen del hecho de que en cada estrato las células poseen sus procesos tangenciales orientados en una única dirección. Este es el caso de muchas neuronas tangenciales grandes presentes en los tres neuropilos ópticos, pero también de otras neuronas más pequeñas como las Tan 1 de la lámina y elementos columnares como las transmedulares tipo Y. Este tipo de organización espacial otorga a cada neuropilo un arreglo ortogonal de dendritas y terminales. La descripción de los neuropilos ópticos en estratos definidos sirve ahora como guía para organizar y comprender mejor la información neuroanatómica proveniente de otras técnicas (tinciones intracelulares, inmunohistoquímicas, etc.) con la que se cuenta hasta el momento, así como la que se obtendrá en el futuro.

Cabe destacar aquí que la técnica de Bodian no aporta información sobre las estructuras más finas de neuronas individuales. A estos fines la técnica más adecuada es el método de impregnación estocástica de plata (Golgi). Esta técnica permite resolver de modo detallado la complicada morfología de neuronas pequeñas, que resultan imposibles de teñir intracelularmente o de identificar en los preparados teñidos con Bodian. Más aún, permite el reconocimiento de estructuras celulares pre y post-sinápticas, posibilitando así la determinación de la polaridad de las neuronas. Para completar la información neuroanatómica obtenida hasta el momento, actualmente estamos trabajando en la puesta a punto de la técnica de Golgi en *Chasmagnathus*. A

modo de ilustración, en la figura 19 se observa el tipo de información que es posible obtener con esta técnica.

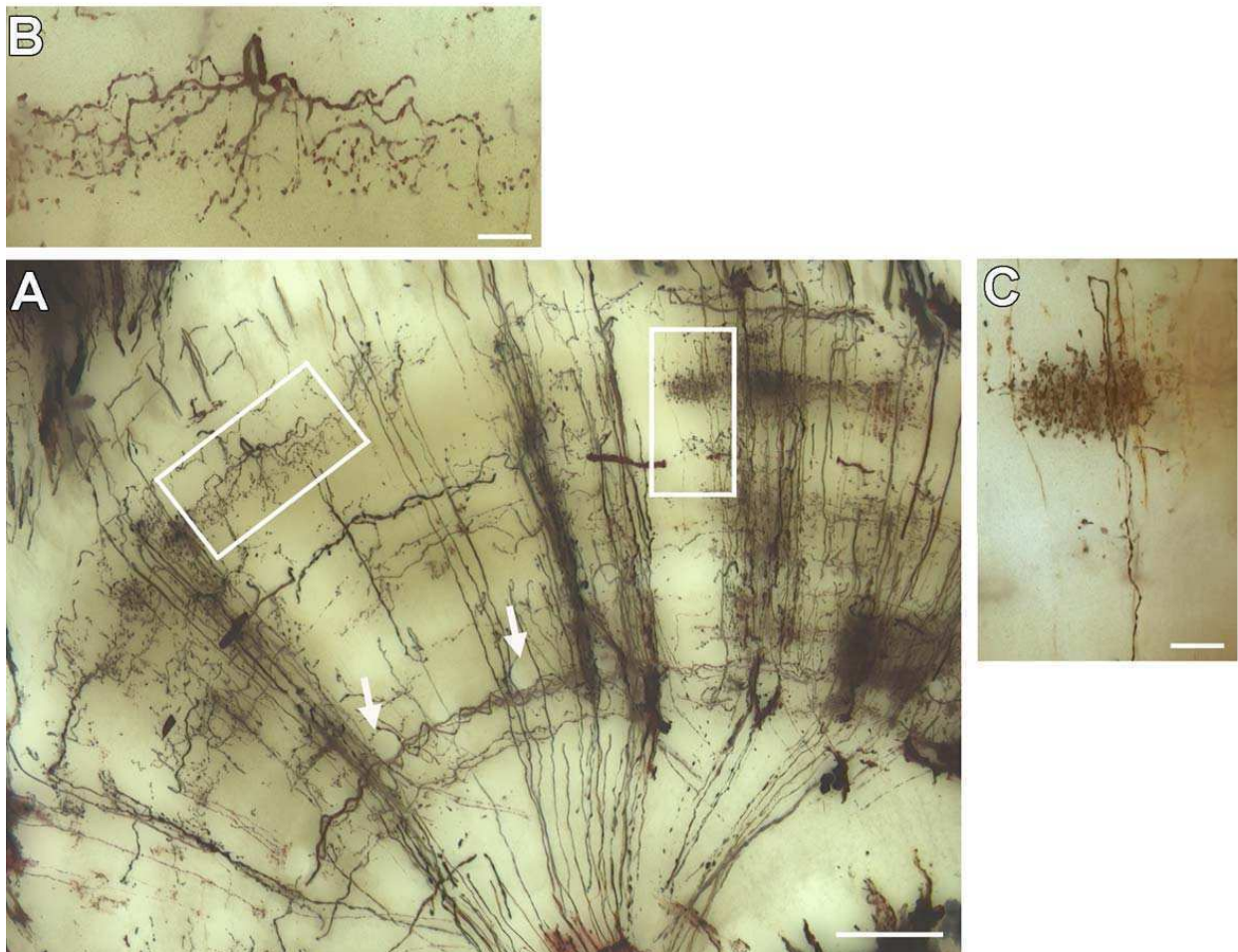


Figura 19: Ejemplo de tinción de Golgi en *Chasmagnathus*. A) Sección transversal de 50 µm de espesor de la lóbula. Se pueden ver procesos columnares de pequeño diámetro y también algunos procesos tangenciales. Para dar una idea de los tamaños comparados, las flechas blancas señalan dos perfiles de las neuritas principales de las M-NDM, cortadas perpendicularmente, que se adivinan definidas por la trayectoria de los finos elementos teñidos. Se observan recuadradas y ampliadas, a la izquierda (B) una célula local amácrina y a la derecha (C) el árbol dendrítico de una neurona columnar. Escala: 50 µm en A; 10 µm en B y C.

Características anatómicas del sistema de detectores de movimiento de la lóbula

Las Neuronas Detectoras Movimiento (NDM) de *Chasmagnathus* fueron denominadas así porque responden preferencialmente a estímulos visuales en movimiento. Si bien las NDM comparten muchas características fisiológicas, fue reconocido tempranamente que este grupo era heterogéneo. No obstante, las tinciones intracelulares demostraron que todas poseen una arborización extensa en la lóbula y que proyectan hacia el protocerebro lateral. El patrón de arborización de las dendritas en la lóbula refleja al menos dos morfologías bien distinguibles, una monoestratificada y la otra biestratificada (Berón de Astrada y Tomsic, 2002).

Como se muestra aquí ambos subtipos pueden ser reconocidos en los preparados teñidos con la técnica de Bodian. Pese a que aún no existe una diferencia fisiológica establecida que permita distinguir ambos grupos éstos son claramente distintos en su morfología, por lo cual en la presente descripción los hemos denominados M-NDM y B-NDM.

El análisis de los preparados teñidos con plata reducida reveló que la población de las M-NDM está compuesta solamente por 14 neuronas gigantes cuyas neuritas primarias se hallan distribuidas isomórficamente a lo largo del mosaico de la lóbula. Cada uno de los procesos primarios se extiende a lo largo del eje anteroposterior y da lugar a una serie de procesos secundarios que se extienden ortogonalmente siguiendo por lo tanto el eje lateromedial. Estos procesos secundarios se ubican adyacentes y paralelos a los procesos tangenciales de las B-NDM. La tinción intracelular de una M-NDM generalmente muestra el gran soma teñido rodeado de otros 13 que presentan una marca más tenue (Fig. 17A). La tinción de una B-NDM también puede resultar en una marca tenue de los procesos primarios de varias M-NDM (Fig. 16B). Todo esto sugiere la existencia de un acoplamiento eléctrico, por un lado, entre las M-NDM y por el otro, entre ambos subtipos. En ciertas ocasiones al registrar la actividad de una NDM se observa más de un tamaño de potenciales de acción (Berón de Astrada y Tomsic, 2002), este fenómeno también podría ser explicado por la existencia de un acople eléctrico entre unidades.

El hecho de que las B-NDM y las M-NDM no hayan sido distinguidas aún por sus propiedades fisiológicas no implica que estas diferencias no existan. Actualmente en nuestro laboratorio se está utilizando una amplia variedad de estímulos visuales generados por computadora que se presentan en distintos campos visuales para

caracterizar más detalladamente las NDM. Este estudio muestra dos grupos funcionales de NDM, unas que poseen un campo receptivo restringido y cierta preferencia a una dirección de movimiento y otras de campo receptivo más amplio y que no muestran preferencias de dirección (Medan y col., 2004). Esta clasificación fisiológica parecería coincidir con la separación morfológica en M-NDM y B-NDM. Sin embargo, parecen existir más subtipos en los que pueden ser separadas las NDM en cuanto a sus parámetros fisiológicos y aún morfológicos. Por lo tanto es necesario continuar con este estudio para llegar a una clasificación más exacta.

Un nuevo neuropilo visual en crustáceos: la *lobula plate*

Las descripciones tradicionales del sistema visual de los crustáceos malacostracos refieren a la presencia de tres neuropilos ópticos: la lámina, la médula externa (médula) y la médula interna (lóbula). Sin embargo, recientemente se documentó en una especie de isópodo y en un decápodo la presencia de un cuarto neuropilo que recibe información retinotópica de la médula a través de axones no cruzados y que se plantea homólogo a la *lobula plate* de insectos (Sinakevitch y col., 2003). Tanto en *Chasmagnathus* como en *Hemigrapsus* encontramos un neuropilo con estas mismas características que se ubica anteromedial a la lóbula por debajo de la glándula del seno. Las tinciones de plata reducida revelan en este neuropilo la existencia de neuronas con largos procesos tangenciales y gruesos axones que proyectan directamente hacia el cerebro medio (Fig. 18B,D).

La presencia de esta *lobula plate* en crustáceos apoya la teoría de que existe una estrecha relación filogenética entre crustáceos, los Malacostraca en particular, y los insectos (Sinakevitch y col., 2003; Strausfeld, 2005). La proposición de que los neuropilos ópticos de insectos y malacostracos son homólogos y que, por lo tanto, constituyen una sinapomorfia de los dos grupos se fortalecería si se probara que la recientemente descrita *lobula plate* de los crustáceos se ocupa de las mismas funciones que su similar en insectos. Como se comentó previamente, en insectos la *lobula plate* está involucrada en el control de las respuestas optomotoras (Hausen, 1984; Borst y Haag, 2002) mientras que en crustáceos su rol es desconocido por ahora. El sistema optomotor es el encargado de percibir el flujo visual generado por los movimientos del propio individuo y, en la mayoría de los animales, se encuentra separado del sistema

que le informa al animal acerca del movimiento de los objetos en su entorno. Así, el primer sistema le indica al animal cuándo y cómo él se está desplazando mientras que el segundo le indica sobre algo que se mueve a su alrededor. Como es de esperar para un sistema optomotor, las grandes neuronas tangenciales de la *lobula plate* de los insectos muestran una respuesta sostenida ante estímulos panorámicos en continuo movimiento (como un amplio patrón visual de barras en movimiento, un típico estímulo optomotor). En *Chasmagnathus* la respuesta optomotora es fácil de evocar y medir (Tomsic y Maldonado, 1990). Hasta el momento, las neuronas detectoras de movimiento que han sido registradas en la lóbula no han respondido ante estímulos optomotores. En efecto, si bien algunas responden en forma transitoria al patrón de barras en movimiento, muestran una respuesta mucho mayor ante una única barra en movimiento (Medan y col., 2004). Además la respuesta de estas neuronas cae rápidamente ante la estimulación repetida. Estos resultados sugieren que las neuronas detectoras de movimiento de la lóbula de *Chasmagnathus* no están involucradas en el control de la respuesta optomotora, sino que más bien se comportan como detectores de objetos en movimiento con características particulares (*feature detectors*). Por lo anterior, hipotetizamos que el control de las respuestas optomotoras en crustáceos también está, como en insectos, mediado por el cuarto neuropilo. Contando ahora con una buena descripción de la ubicación y forma de la *lobula plate* de los decápodos y sabiendo que contiene neuronas tangenciales de considerables dimensiones, es posible pensar en registrar y teñir estas neuronas con el fin de evaluar la hipótesis planteada, la que de confirmarse, se constituiría en un argumento de gran peso en el renovado debate sobre las relaciones filogenéticas entre crustáceos e insectos (Harzsch, 2002; Sinakevitch y col., 2003).

Análisis comparativo

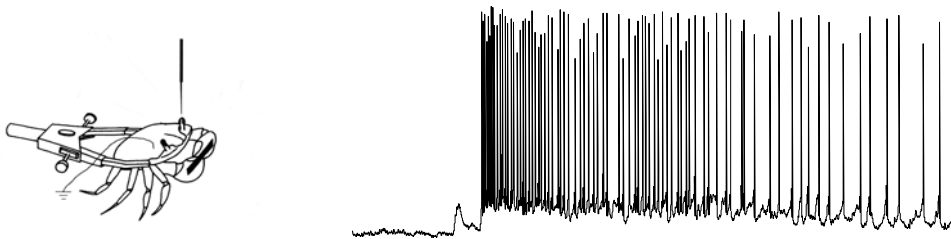
Los decápodos como los *crayfish*, camarones pelágicos y cangrejos semiterrestres como *Chasmagnathus* ocupan nichos ecológicos muy distintos y poseen hábitos de vida diferentes. Como ya había sido advertido por Wiersma (Wiersma y Yamaguchi, 1967b) los cangrejos terrestres poseen una mayor reactividad que el *crayfish* ante estímulos visuales. El ojo compuesto de *Chasmagnathus* tiene aproximadamente 7000 omatidias, casi tres veces más que el número de omatidias reportado para un *crayfish* adulto. Además, en el *crayfish* los ojos están orientados

horizontalmente a los lados del cefalotórax por lo cual el campo de superposición binocular es muy pequeño. Por el contrario, los ojos de los cangrejos semiterrestres se hallan montados en pedúnculos oculares que cuando se hallan verticalmente orientados (en la posición normal de observación) permiten una visión panorámica y por lo tanto una gran superposición binocular (Sztarker y Tomsic, 2004). Estas diferencias en el repertorio de comportamientos evocados por estímulos visuales y en el diseño de los ojos de las distintas especies, ¿tendrán aparejados cambios en la organización celular de los neuropilos ópticos? La información disponible en la literatura se refiere mayormente al análisis del primer neuropilo óptico, la lámina. Estos estudios indican que sin importar el nicho ecológico del animal, las láminas descritas poseen los mismos tipos celulares (Strausfeld y Nässel, 1980; Elofsson y Hagberg, 1986).

Estudios previos en *Chasmagnathus* (Berón de Astrada y col., 2001) demostraron la presencia de neuronas con respuesta muy similar a las neuronas *sustaining* y *dimming* de la médula del *crayfish* (Kirk y col., 1983a,b; Glantz y McIsaac, 1998; Glantz y Miller, 2002). Las presentes observaciones de los preparados de plata reducida en combinación con tinciones intracelulares previas (Berón de Astrada, 2005) sugieren que las neuronas *sustaining* y *dimming* de *Chasmagnathus* son morfológicamente similares a las del *crayfish*. Estos resultados demuestran que más allá de obvias diferencias en los hábitos de vida, nichos ecológicos y estructura fina de los ojos, ciertos aspectos de la organización de la médula pueden ser similares a lo largo del taxón de los decápodos. Esto parece razonable si se tiene en cuenta el hecho de que la lámina y la médula se encargan de procesos visuales fundamentales como ser la determinación del nivel de iluminación y la adaptación sensorial, eliminación del ruido fotónico, etapas tempranas de la detección de movimiento (Glantz, 1994, 1996, 1998) y segregación de canales cromáticos y acromáticos. Dado que estas habilidades son comunes a la mayoría de las especies de malacostracos, parece razonable que todos estos animales compartan tipos de neuronas y arreglos morfológicos que hayan sido conservados. En contraste, la lóbula parece estar relacionada con funciones perceptuales más complejas al igual que con funciones cognitivas (Tomsic y col., 2003). En la naturaleza, las claves visuales que resultan cruciales para la supervivencia varían ampliamente entre las distintas especies y es probable que los sistemas de reconocimiento de dichas claves muestren una morfología taxón-específica, como ocurre en el caso de los insectos (Buschbeck y Strausfeld, 1997). En efecto, los parámetros temporales y espaciales de los estímulos visuales que son relevantes para el

comportamiento dependen del tipo de vida de cada especie. Los individuos de *Chasmagnathus granulatus* viven en grandes colonias con gran interacción social y al menos durante alguna etapa de su vida, son víctimas de predación aérea. Por lo tanto requieren neuronas detectoras de características específicas que respondan a una combinación de estímulos visuales muy distintos a los que pueden evocar, por ejemplo, la respuesta de escape de un camarón pelágico. Comparaciones de la lóbula entre distintos crustáceos sugieren la existencia de variaciones taxonómicas (Strausfeld y Nässel, 1980; Sinakevitch y col., 2003). La cuestión de si los comportamientos evocados por estímulos visuales en los cangrejos semiterrestres son el resultado de modificaciones de linajes neuronales existentes o de la evolución de nuevos tipos de neuronas detectoras de movimiento es un tema que requiere comparaciones anatómicas y fisiológicas entre *Chasmagnathus* y otras especies que difieran simpátrica y ecológicamente. El haber podido identificar fácilmente con las tinciones de Bodian las mismas 14 M-NDM en otra especie de cangrejo filogenéticamente relacionado, *Hemigrapsus sanguineus* (Fig. 17B), alienta la posibilidad de registrar intracelularmente estas neuronas y observar su función en distintos grupos de cangrejos que habiten ambientes distintos y que por lo tanto posean requerimientos comportamentales diferentes.

Sección 2



Neuroetología

Sección 2: Estudios neuroetológicos en *Chasmagnathus*

Los crustáceos han sido modelos tradicionales para el estudio de los controles neurales del comportamiento que han permitido establecer principios funcionales de interés muy general entre los que cabe destacar conceptos tales como los de detectores de coincidencia, generadores centrales de patrones y neuronas comando. Las neuronas comando, descritas por primera vez por Wiersma hace más de 50 años en el *crayfish*, son neuronas gigantes capaces de disparar respuestas de escape. En el *crayfish*, el circuito neural que incluye a estas neuronas es uno de los más estudiados y el mejor entendido del reino animal (Carew, 2000). Si bien controla un comportamiento particular en un animal relativamente simple, este circuito ha brindado valiosa información acerca de principios de funcionamiento neural involucrados en la toma de decisiones, las bases celulares del aprendizaje, la computación neuronal subcelular, la transmisión en sinapsis eléctricas disparadas por voltaje y en la modificación de la eficiencia sináptica como consecuencia de la experiencia social (revisado en Edwards y col., 1999). El trabajo en las neuronas comando del *crayfish* ilustra el valor de estudiar circuitos de moderada complejidad, aunque abordables, que poseen una conocida función en la conducta de un animal. En esta sección analizaremos distintos aspectos del comportamiento de *Chasmagnathus* ante estímulos visuales y la relación de cada uno de estos aspectos con grupos de interneuronas identificadas en el cerebro del animal.

Capítulo 1: Participación de las NDM en la respuesta de escape

El comportamiento de un animal es el producto, en gran medida, de la actividad de su sistema nervioso. Así, los patrones de conducta que pueden ser identificados en los estudios etológicos deben reflejar en cierta medida la organización subyacente del sistema nervioso (Young, 1989). Los comportamientos más simples que originalmente captaron la atención de los fundadores de la etología son los mismos que pueden ser analizados con cierta facilidad en términos de los eventos neurales subyacentes. Por ejemplo, las interacciones entre predadores y presas han sido el blanco de numerosos estudios neuroetológicos dado que los circuitos involucrados deben ser simples para ser funcionales. Cuando una decisión “de vida o muerte” debe ser tomada en fracciones de segundo no hay tiempo para que actúe un circuito nervioso demasiado elaborado. Por lo tanto existen circuitos neurales simples dedicados a una función única e importante, como por ejemplo una respuesta de escape. Las neuronas comando, cuya activación es necesaria y suficiente para que se efectúe un determinado comportamiento son un ejemplo. A medida que un sistema se vuelve más flexible en el tipo de estímulos a los que responde y está involucrado en conductas más complejas, el sistema se hace más difícil de estudiar aunque también más interesante.

La respuesta de escape (RE) de *Chasmagnathus* constituye un caso atractivo para investigar el sustrato neuronal involucrado dado que la misma constituye sólo una de las posibles respuestas por la que puede optar el cangrejo ante la presencia de un estímulo visual de peligro (ver más adelante). Por lo tanto, cuando el animal la efectúa significa que en algún lugar particular de su sistema nervioso tiene que haberse tomado esta decisión. Para encontrar las neuronas involucradas en esta toma de decisión, el primer paso es encontrar neuronas centrales que muestren una alta correlación de su respuesta con las distintas características de la respuesta de escape del animal.

Estudios previos han demostrado que las NDM del cangrejo responden preferencialmente al estímulo visual que evoca la RE del animal. El perfil de disparo de potenciales de acción de las NDM es muy similar al perfil de la RE y anticipa la conducta en 80-120 mseg aproximadamente. En otras palabras las NDM no sólo responden al mismo estímulo visual que provoca la RE sino que, además, su actividad parece estar estrechamente relacionada a la ejecución de esta respuesta. Por otra parte, estas neuronas reflejan fielmente la modificación de la RE por aprendizaje, tanto a corto

como a largo término (Tomsic y col., 2003).

En este capítulo presentamos una serie de correlaciones entre la RE de *Chasmagnathus* y la respuesta de las NDM que fortalecen la noción de que estas neuronas son parte del circuito involucrado en la decisión de ejecutar la respuesta de huida. La figura 20 recuerda cómo se adquieren y analizan, en éste y los siguientes capítulos, la RE de los cangrejos y la respuesta de las NDM ante el movimiento del EVP.

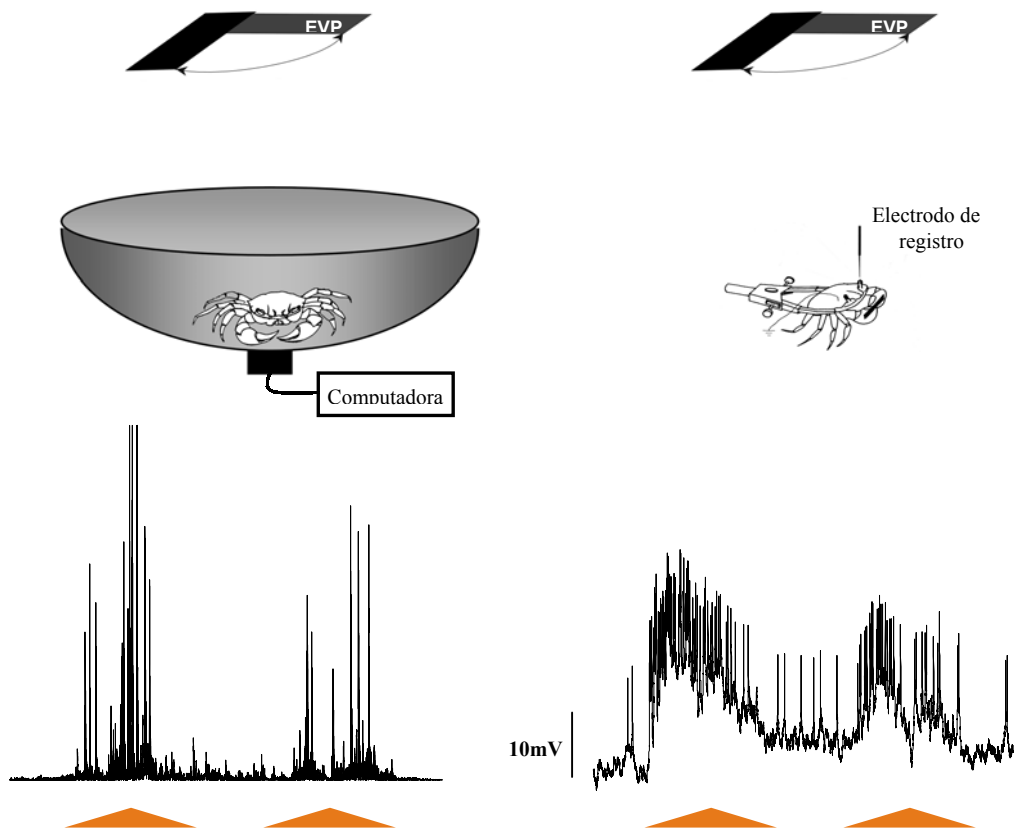


Figura 20: Dispositivos experimentales para medir la respuesta comportamental y la respuesta neuronal. En la columna de la izquierda se esquematiza el actómetro donde se registra la respuesta de escape (RE) de los animales frente al EVP. El actómetro cuenta con un piezoeléctrico que permite transducir las vibraciones del recipiente (provocadas por la RE) en señales eléctricas. Estas deflexiones en el potencial son digitalizadas y registradas por una computadora mediante el mismo equipo de adquisición que utilizamos para los registros electrofisiológicos. Debajo del actómetro se muestra el registro de la RE de un cangrejo frente a un ensayo de estimulación con el EVP (unidades arbitrarias de voltaje). El nivel de RE se calcula como la sumatoria del área de dichas deflexiones. En la columna de la derecha se muestra un esquema de la preparación para realizar registros electrofisiológicos y debajo la respuesta de una NDM frente a un ensayo de estimulación con el EVP. La respuesta de las NDM se mide como el número de potenciales de acción disparados durante el período de estimulación con el EVP. Los triángulos representan los dos ciclos de movimiento del EVP que componen cada ensayo (ver Fig. 3).

Nivel de respuesta circaanual

En casi todos los animales, con excepción tal vez de los animales típicos de laboratorio, existen cambios en determinados comportamientos durante las distintas épocas del año. La disponibilidad de alimento, presencia de predadores, época reproductiva y temperatura ambiental entre otros, son factores que influyen en dichos cambios. En el sapo por ejemplo, existen variaciones estacionales en el comportamiento de captura de presas. Durante el verano los estímulos más efectivos para disparar este comportamiento son objetos cuadrados blancos moviéndose en un fondo oscuro. En cambio durante el otoño y el invierno, los estímulos negros moviéndose sobre un fondo blanco son más efectivos. Además el nivel de la actividad de caza se ve reducido durante el invierno en comparación con el verano y se ha observado que estos cambios conductuales correlacionan con cambios estacionales en el nivel de respuesta de ciertas neuronas (las T5 del tectum óptico) que participan en el reconocimiento de los estímulos visuales con características de presa (Ewert, 1980).

En *Chasmagnathus* se han descrito variaciones estacionales en el comportamiento de escape (Pereyra y col., 1999). De las tres estrategias defensivas que el cangrejo puede adoptar frente a un predador: escapar, permanecer inmóvil de modo de pasar desapercibido o desplegar sus quelas en actitud amenazante, la estrategia más frecuente es la respuesta de escape (RE). Sin embargo, la RE resulta máxima durante los meses de verano, mientras que en el invierno aumenta la proporción de animales que optan por la inmovilidad o el despliegue de quelas. Evaluamos entonces el nivel de RE ante una única presentación del EVP en registros obtenidos de una base de datos de experimentos conductuales realizados a lo largo de los años 2002, 2003, 2004 y 2005 por varios de los miembros del laboratorio. En este caso la respuesta comportamental fue medida en un equipo que cuenta con 40 actómetros en los que puede registrarse en forma simultánea la actividad locomotora de 40 cangrejos. Los datos fueron reunidos en dos grupos: aquellos obtenidos durante los meses de mayor temperatura (octubre a marzo) y los obtenidos durante los meses de menor temperatura (abril a septiembre). Estudiamos también, mediante registros intracelulares realizados en el animal intacto (ver materiales y métodos), la variación en el nivel de la respuesta de las NDM ante una única presentación del EVP durante los mismos períodos.

En la figura 21 se muestran los resultados obtenidos. Existe una reducción significativa de la RE durante los meses más fríos que se observa también en la respuesta de las NDM.

Durante el invierno la tasa metabólica medida como consumo de oxígeno alcanza un mínimo, los lípidos reemplazan al glucógeno como fuente de energía y los cangrejos tienden a pasar más tiempo en sus cuevas (Rosas y col., 1992). Todos los cambios observados tienden a reducir a un mínimo el gasto de energía (Pereyra y col., 1999). La reducción observada en el nivel de la RE puede representar una forma más de minimizar el gasto energético durante los meses fríos. Tal como ha sido sugerido para el comportamiento de captura del sapo (Ewert, 1980), el cambio conductual del cangrejo ante estímulos visuales de peligro podría estar determinado por una disminución estacional de la sensibilidad de las neuronas que detectan estos estímulos.

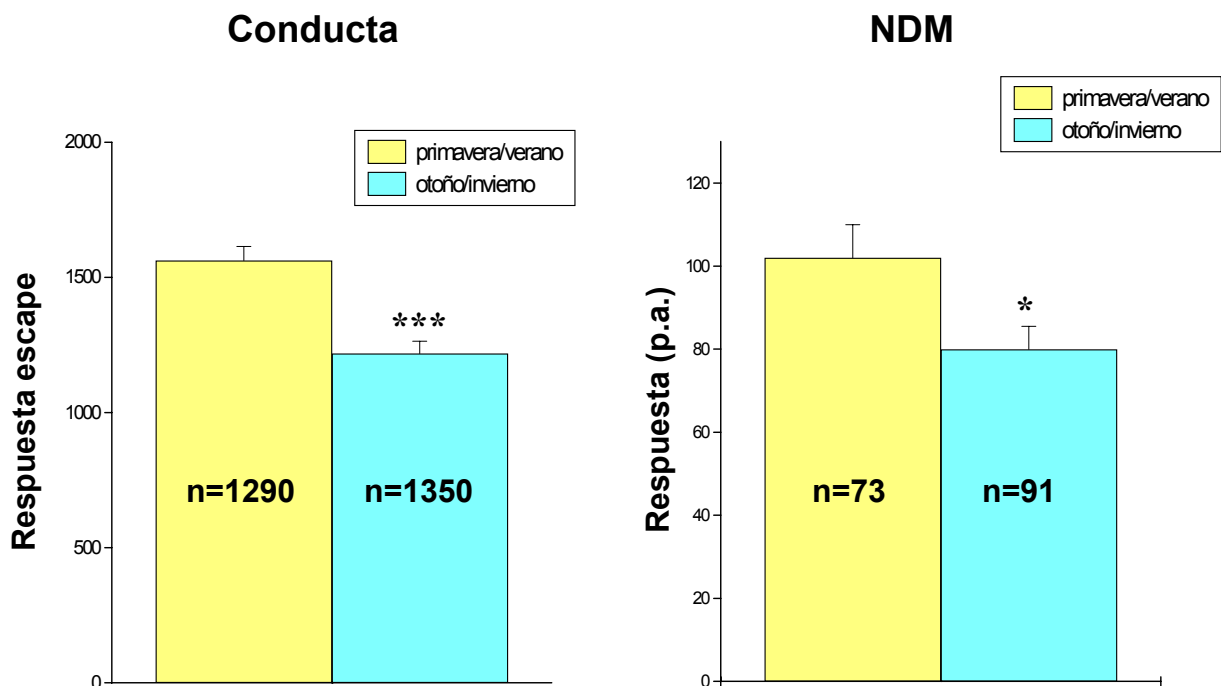


Figura 21: Comparación de la respuesta de escape y el nivel de respuesta de las NDM frente a un EVP ante variaciones climáticas anuales. Meses cálidos, primavera/verano: octubre a marzo, meses fríos, otoño/invierno: abril a septiembre. En la presente y las siguientes figuras *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$.

Respuesta diferencial ante estímulos de distinta intensidad

Lozada y colaboradores (1990) observaron que el nivel de respuesta de escape del cangrejo dependía del estímulo visual utilizado. Compararon las respuestas evocadas por el EVP clásico, el cual se desplaza tangencialmente sobre el animal, uno más grande y uno que se aproximaba al cangrejo en forma vertical. Tanto el estímulo vertical como el de mayores dimensiones representan estímulos más intensos que el EVP clásico ya que la respuesta de escape que evocan es notablemente mayor.

Estudios tendientes a evaluar cuáles son las características de los estímulos visuales que provocan la RE de los cangrejos demostraron que el tamaño angular es un parámetro importante para estos animales mientras que el tamaño absoluto no lo es (Layne y col., 1997). Investigamos entonces las respuestas evocadas por estímulos de distinta intensidad tanto a nivel conductual como en las NDM. Comparamos la respuesta obtenida ante una única presentación del EVP clásico (EVP 1) con la obtenida ante un EVP de mayor tamaño angular y presentado más cerca del animal (EVP 2). La figura 22 esquematiza la ubicación de ambos estímulos.

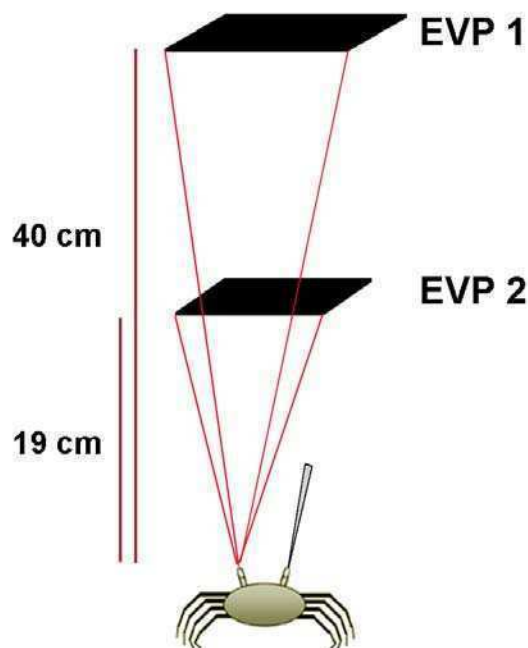


Figura 22: Esquema ilustrativo mostrando la disposición de los estímulos utilizados para medir la respuesta de escape y la respuesta de las NDM ante estímulos de distinta intensidad. El EVP 2 (de menor tamaño absoluto, 18 x 8 cm) posee un mayor tamaño angular (43°) que el EVP 1 (35°) y es presentado a una menor distancia del animal.

Los resultados de la figura 23A muestran claramente que el estímulo que evoca la RE más intensa también provoca una mayor respuesta en las NDM.

La tasa a la cual una respuesta conductual disminuye como consecuencia de un entrenamiento con presentaciones repetidas, depende tanto de la frecuencia de estimulación como de la intensidad del estímulo. En general, se observa que la respuesta decae más lentamente ante entrenamientos con estímulos más intensos (Groves y col., 1969). Para verificar la afirmación anterior en el caso de la RE de *Chasmagnathus*, realizamos entrenamientos espaciados (15 ensayos cada 3 min) utilizando como estímulos los EVP 1 y 2, y comparamos las respuestas conductuales obtenidas con aquellas registradas a nivel de las NDM. La figura 23B (panel izquierdo) muestra que la tasa de caída de la RE normalizada es menor en el caso del entrenamiento con el EVP 2 que en el caso del estímulo menos intenso, el EVP 1. Puede observarse además que el nivel asintótico que se alcanza luego del entrenamiento también varía con la intensidad siendo éste mayor en el caso del estímulo más intenso. Del mismo modo, al analizar la respuesta de las NDM (Fig. 23B, panel derecho) se observa que la misma decae más lentamente frente al EVP 2, ante el cual también alcanza un nivel asintótico mayor. Así, se ve que los perfiles de respuesta de las neuronas reflejan fielmente la respuesta conductual.

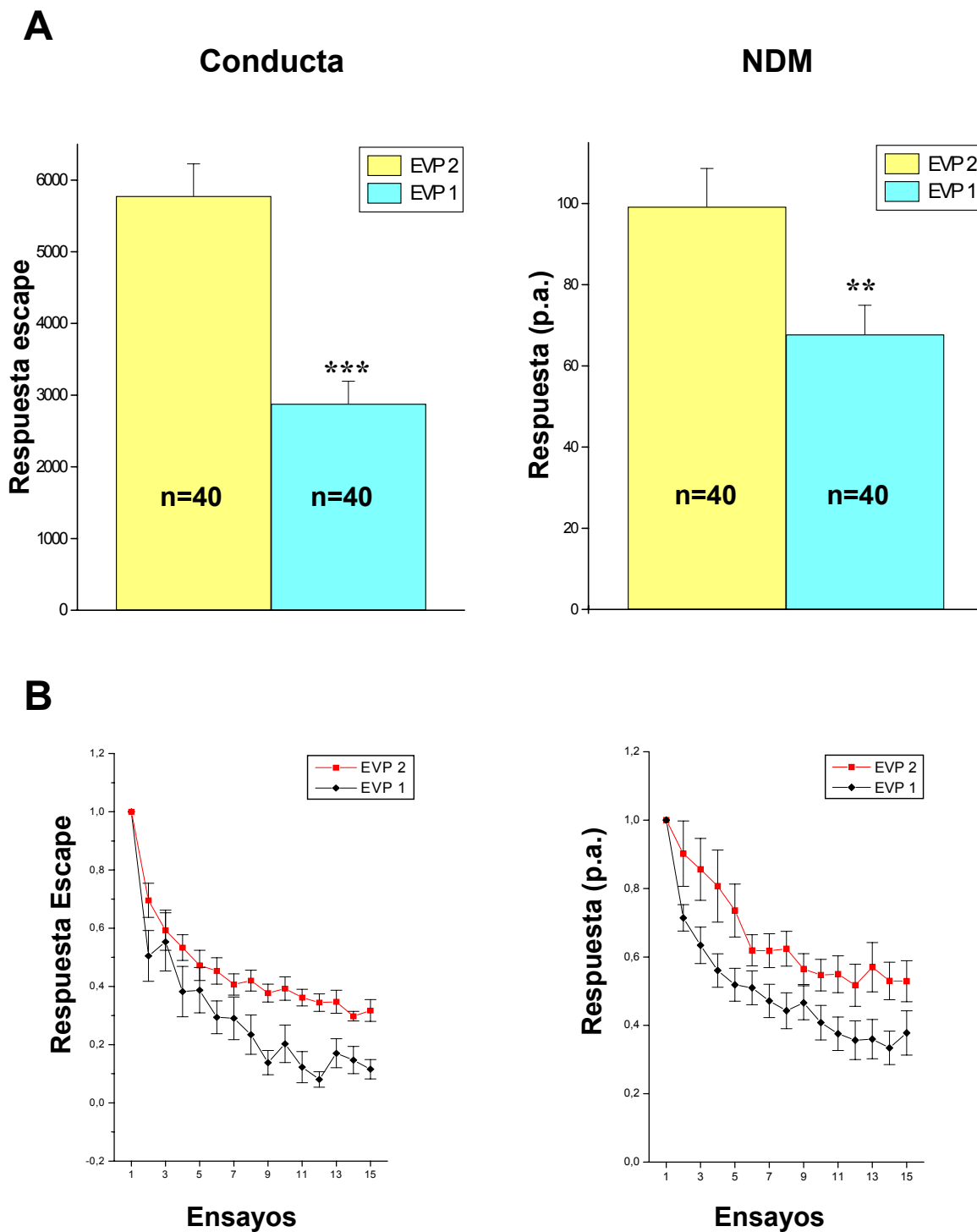


Figura 23: Comparación de la respuesta de escape y el nivel de respuesta de las NDM ante estímulos de distinta intensidad. A) Ante la primera aparición del estímulo, el EVP 2 provoca una respuesta significativamente mayor que la producida por el EVP 1. Este resultado se observa tanto en la respuesta de escape de los cangrejos como en la cantidad de potenciales de acción disparados por las NDM. B) En ambas mediciones se verifica una menor tasa de reducción de respuesta ante un entrenamiento espaciado con el estímulo de mayor intensidad. Las respuestas se grafican normalizadas al primer ensayo.

Nivel de respuesta monocular y binocular

El siguiente experimento fue realizado para investigar cómo se ve afectada la respuesta de escape y la actividad de las NDM cuando el EVP es presentado a uno sólo o a ambos ojos.

Se registró la respuesta comportamental de tres grupos experimentales: dos grupos monoculares, el primero con su ojo izquierdo cubierto con pintura acrílica negra y el segundo con el ojo derecho cubierto. El tercero fue un grupo de cangrejos controles con visión binocular. En todos los casos se evaluó la respuesta de los animales ante una presentación del EVP. Resultados previos mostraron que dicha pintura aplicada sobre los pedúnculos oculares bloquea efectivamente la visión sin perjudicar la salud de los animales (Sztarker, 2000).

Para registrar las respuestas monoculares en los experimentos electrofisiológicos se utilizó un tabique de modo de separar los campos visuales de los dos ojos. Los registros se efectuaron siempre desde el ojo derecho. En la mitad de los ensayos el ojo estimulado fue el derecho y en la otra mitad fue el izquierdo. El tabique consta de dos partes: por un lado de una cartulina negra que se adosa a la parte dorsal del caparazón del animal siguiendo la forma del cuerpo, y por el otro de una cartulina negra más gruesa que se encuentra montada en el dispositivo que sostiene los dos EVP (uno ubicado a cada lado del tabique). Al momento de ubicar al animal para realizar los registros, ambas partes se acomodaban de manera de solapar las cartulinas y así impedir la transmisión de luz entre ambos lados del cangrejo. Para registrar las respuestas binoculares el tabique fue retirado. La mitad de los ensayos fue realizada con uno de los EVP y la otra mitad con el otro (Fig. 24A).

No se observaron diferencias significativas en las respuestas de ambas condiciones monoculares, ni en la conducta ni en la respuesta neuronal, por lo tanto dichas respuestas fueron agrupadas para formar el grupo monocular. Los resultados revelan que si bien la estimulación monocular con el EVP es suficiente para disparar la RE (la actividad locomotora basal de los cangrejos, es decir sin estimulación con el EVP, es del orden de 200-300), la respuesta evocada en tales condiciones es significativamente menor a la alcanzada cuando ambos ojos pueden ver el EVP (Fig. 24B panel izquierdo). Esto implica que en los cangrejos binoculares cada uno de los ojos está contribuyendo a la respuesta final. El mismo resultado es encontrado al analizar la respuesta de las NDM (Fig. 24B panel derecho).

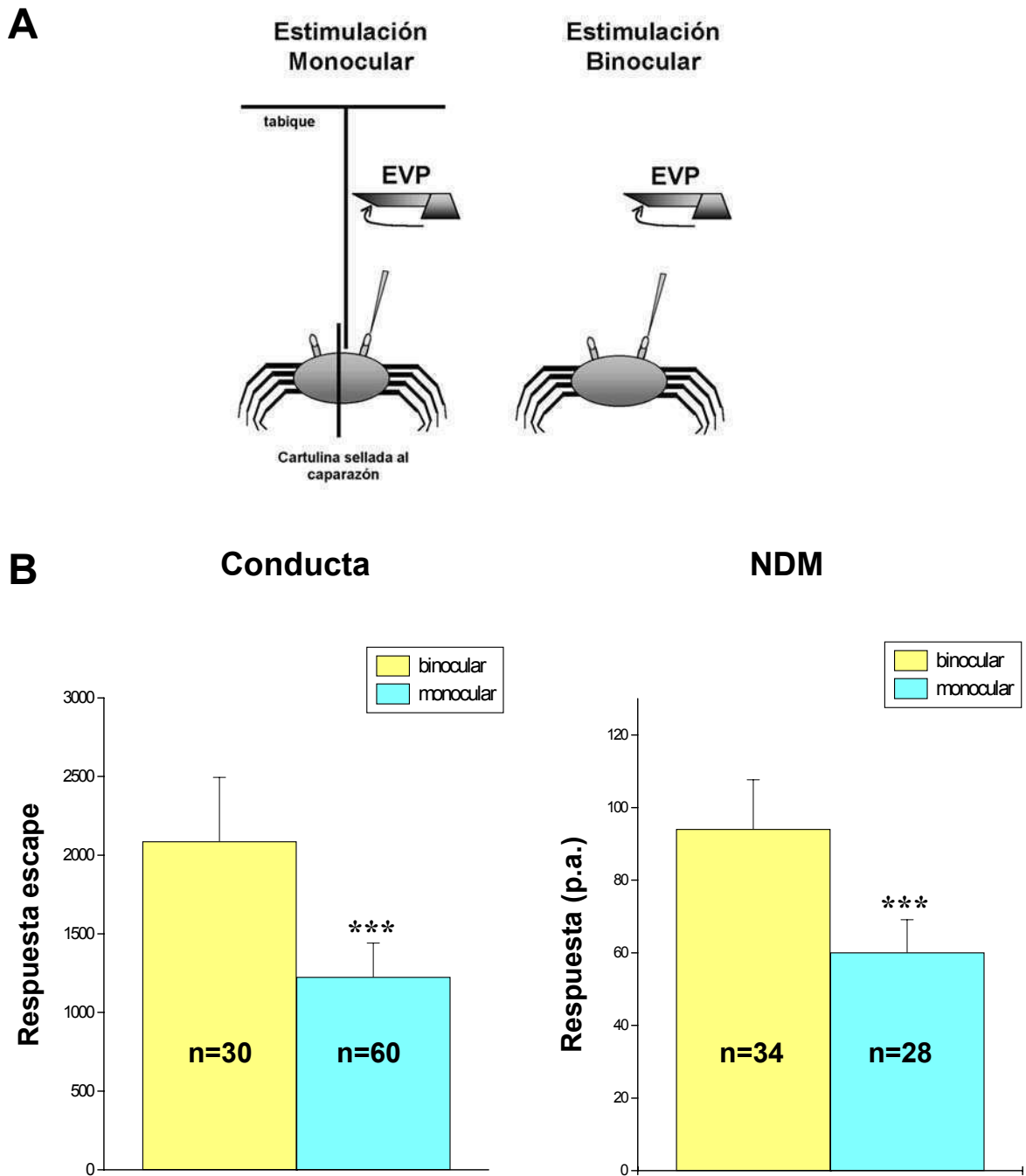


Figura 24: Comparación de la respuesta de escape y el nivel de respuesta de las NDM ante condiciones de estimulación monocular y binocular. A) Esquema mostrando el dispositivo utilizado para la toma de datos electrofisiológicos. Para registrar las respuestas monoculares se utilizó un tabique que divide los campos visuales de los dos ojos. Las respuestas binoculares se registraron sin el tabique. B) Al evaluar los resultados en su conjunto se observa que la intensidad de la respuesta conductual ante estimulación monocular es significativamente menor a la evocada en condiciones binoculares. El mismo resultado se obtiene al evaluar la respuesta de las NDM.

Discusión:

Los resultados de este capítulo muestran nuevas correlaciones entre el comportamiento de escape de los animales y la actividad de las NDM ante la presentación de estímulos visuales de peligro.

El experimento de variación circannual demuestra que los factores estacionales involucrados en los cambios conductuales observados están afectando la actividad de las NDM. Incluso implica que los cambios producidos en el nivel de la RE podrían ser explicados directamente por un cambio único en la actividad de estas neuronas.

Asimismo, las NDM reflejan las modificaciones observadas en la RE de los cangrejos ante entrenamientos con estímulos de distinta intensidad. Ciertamente, como es observado en la conducta de los animales, las NDM muestran una mayor respuesta inicial, una menor tasa de caída y un nivel asintótico de respuesta mayor al ser confrontadas con el estímulo de mayor intensidad.

El mismo tipo de correlación se observa al comparar el nivel de respuesta producida ante la percepción del EVP en condición monocular o binocular. Efectivamente, tanto las NDM como los cangrejos responden más si el estímulo es observado simultáneamente por los dos ojos. Considerando la integración de la información visual, que la respuesta monocular de las NDM sea menor que la respuesta binocular sugiere que en estas neuronas está convergiendo la información de ambos ojos.

El hecho de que la RE a un EVP se exprese con diferente grado de intensidad de acuerdo a condiciones tales como la época del año, la intensidad del estímulo o la forma en que el objeto es percibido (bi o monocularmente), demuestra que este comportamiento no constituye una reacción refleja de tipo todo o nada en que superado un cierto umbral se dispara en su totalidad. Muy por el contrario la respuesta parece estar bajo un control gradual. Los resultados sugieren además que dicho control se expresa, al menos en parte, a nivel de las NDM.

Capítulo 2: Estímulo-especificidad y generalización

Una de las formas en que los animales aprenden es asociando señales visuales con eventos o significados importantes para después poder reconocerlos inmediatamente o incluso anticiparlos. La forma más simple de realizar esta tarea sería guardar una representación sensorial completa de la situación y en el momento indicado efectuar una comparación entre esta representación y la realidad presente. Si esta representación es muy detallada, el proceso de reconocimiento será muy exacto pero demandará mucho tiempo y además, perderá la capacidad de predecir eventos similares. Si, por el otro lado, la representación es menos minuciosa, el proceso será más rápido pero también el reconocimiento será menos específico. Ambos extremos pueden ser deseables en determinadas situaciones. Ante la primera aparición de un objeto, puede ser bueno hacer un molde grosero del mismo. Si este estímulo se repite en el tiempo y tiene alguna relevancia para el animal, dicho molde se transforma en uno más detallado y de esta forma se obtiene la estímulo-especificidad.

Sin embargo, dado un mundo continuamente cambiante es necesario que el aprendizaje no sea rígido. Es decir que de un determinado estímulo se extraigan ciertas características como las más importantes y de ahí en más todo estímulo que comparta esas características sea reconocido como similar. Esta propiedad se conoce como generalización. La generalización, por lo tanto, permite tratar a estímulos similares como equivalentes y responder ante ellos de la misma manera. Implica una economía cognitiva al permitir al animal ejecutar respuestas adaptativas ante nuevos objetos presentes en el ambiente.

Recientemente Stach y Giurfa (2005) han demostrado, en experimentos con abejas utilizando un laberinto en Y, que la representación interna de un objeto aprendido puede variar según la duración del entrenamiento. En dicho trabajo muestran que luego de un entrenamiento corto las abejas muestran una alta especificidad para el estímulo aprendido y por lo tanto parecen almacenar lo aprendido en forma de un molde que posee una coincidencia retinotópica con el objeto original. Al someter a las abejas a entrenamientos más largos (utilizando el doble de ensayos) evidencian un aumento en la capacidad de generalización dado que ahora las abejas responden ante estímulos nuevos pero que comparten ciertos aspectos de la organización espacial del estímulo de entrenamiento. Luego de entrenamientos más extensos entonces, parece guardarse una

representación simplificada del patrón que poseía el estímulo. Así, la información redundante se reduce al mínimo indispensable para la efectiva resolución de la tarea.

En aquellos aprendizajes que involucran una respuesta de escape, la generalización se evidencia por el hecho de que la modificación de la respuesta debida a la presentación de un determinado estímulo, se manifiesta también en la respuesta del animal ante un conjunto diferente de estímulos (toda vez que la fatiga motora haya sido descartada como la causa del cambio de respuesta).

Existen muy pocos estudios en crustáceos donde se haya investigado la generalización. En el crayfish, Glantz (1974a) realizó un estudio preliminar de la respuesta refleja de defensa ante estímulos visuales en aproximación monitoreando el comportamiento a través de electromiogramas de los músculos de los quelípedos. Observó la habituación de la respuesta al repetir la estimulación con distintos intervalos entre estímulos. Estudió la generalización de la habituación utilizando un entrenamiento inicial de 50 ensayos con un intervalo entre estímulos de 30 seg. Al presentar luego del entrenamiento el mismo estímulo (de 19° de ángulo subtendido) pero desplazando su posición en 3°, veía una marcada generalización de la respuesta. Atribuyó este efecto al hecho de que la mayor parte de la retina excitada por el objeto desplazado ya había sido estimulada previamente. Efectivamente, al mover el objeto 90°, de forma de estimular una zona completamente nueva de la retina, obtuvo una recuperación total de la respuesta. Glantz (1974b) complementó estos experimentos con estudios electrofisiológicos efectuando registros extracelulares en el nervio óptico donde midió la actividad de fibras detectoras de movimiento. Estas neuronas mostraron reducir su respuesta en una forma similar a lo visto en el comportamiento para los distintos entrenamientos. Sin embargo, en el trabajo se menciona una alta heterogeneidad en los patrones de respuesta de las distintas fibras registradas, posiblemente debido a la existencia de subpoblaciones (sugerido también por las variaciones de los campos receptivos). En dicho estudio, Glantz realizó también experimentos de generalización, desplazando 5 o 45° el estímulo mientras realizaba los registros electrofisiológicos. En ambos casos obtuvo una recuperación importante de la respuesta por lo cual sugirió que las detectoras de movimiento estarían involucradas en suministrar al sistema motor del reflejo de defensa, la información espacial concerniente a la habituación.

En *Chasmagnathus granulatus*, un extenso y creciente conjunto de evidencias, entre las que se incluyen las obtenidas en el capítulo anterior y otras ya descriptas (Tomsic y col., 2003), muestran que existe una fuerte correlación entre la RE evocada por un estímulo visual de peligro y la respuesta de las NDM. Por lo tanto decidimos realizar experimentos para explorar la capacidad de generalización de este cangrejo y la participación de las NDM en este aspecto del fenómeno mnésico.

En *Chasmagnathus*, existe un estudio previo (Lozada y col., 1990) donde se analizaron ciertos aspectos de la generalización en el paradigma de reducción de la respuesta de escape producida por estimulación repetida espaciada con el EVP. Los autores utilizaron como estímulos el EVP clásico que se mueve tangencialmente por encima del animal (25 x 8 cm), uno más grande (25 x 13 cm) que se movía de igual forma y uno que se movía en forma vertical acercándose y alejándose del animal. Se observó generalización de la respuesta al entrenar con el EVP clásico y evaluar con el de mayor tamaño, o viceversa, pero no hubo generalización entre los estímulos que se desplazaban en forma diferente.

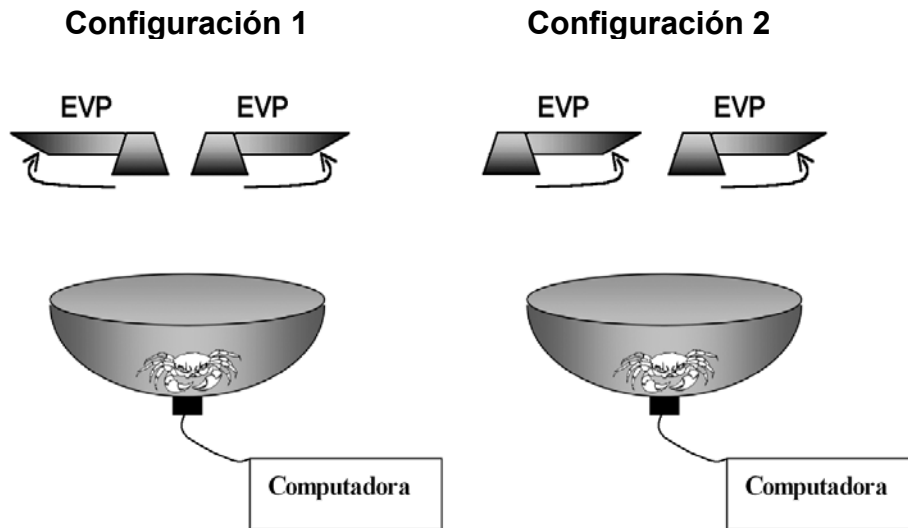
Como fue mencionado en el capítulo 1, una diferencia importante entre los estímulos presentados en los experimentos anteriores es su capacidad para evocar una RE de distinta magnitud, es decir que parecen representar distinto grado de peligrosidad. En este capítulo estudiamos la capacidad de generalización cuando se utilizan dos estímulos que no sólo comparten la forma y modo de desplazamiento, sino que también representan estímulos igualmente peligrosos. Investigamos además el fenómeno de generalización en los distintos tipos de memoria que puede adquirirse de acuerdo a la frecuencia de estimulación durante el entrenamiento (MCS y MS, ver página 10 de la introducción).

Materiales y métodos:

Para los experimentos de este capítulo se utilizaron dos configuraciones de los estímulos (Fig. 25A). En la configuración 1 los dos EVP ocupan inicialmente un campo visual similar y su movimiento comienza alejándose del cangrejo, es decir, los estímulos se mueven como imágenes especulares. En esta configuración los EVP varían tanto en las posiciones que ocupan durante sus desplazamientos como en la dirección inicial del movimiento. En la configuración 2 se utilizan dos EVP que varían únicamente en las

posiciones que ocupan durante su desplazamiento, siendo iguales sus direcciones iniciales de movimiento.

A



B

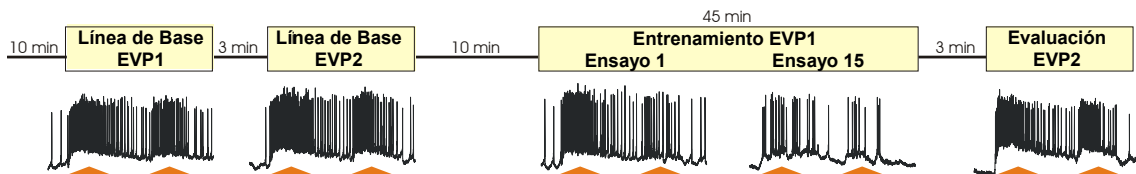


Figura 25: Diseño experimental. A) Representación de las dos configuraciones de estimulación utilizadas en el presente capítulo. En la configuración 1 los dos EVP ocupan inicialmente un campo visual similar y su movimiento relativo comienza alejándose del cangrejo. Los estímulos se mueven como imágenes especulares, variando tanto en el área que barren durante su desplazamiento como en la dirección inicial del movimiento. En la configuración 2 se utilizan dos EVP que varían únicamente en las posiciones que ocupan durante su desplazamiento, siendo iguales sus direcciones iniciales de desplazamiento. B) Curso temporal de un experimento electrofisiológico y ejemplo de respuesta de una NDM ante un protocolo de entrenamiento espaciado con un EVP (EVP 1) y evaluación con el otro EVP (EVP 2). Antes de comenzar con el entrenamiento, se registra una línea de base para cada estímulo que luego será utilizada para normalizar las respuestas subsiguientes. La duración total de un experimento completo implica 1 hora 12 min de registro intracelular.

Como antes, la respuesta de los animales se evaluó utilizando un actómetro que convierte las vibraciones producidas por el escape del cangrejo en oscilaciones eléctricas que son adquiridas en una computadora. Este actómetro fue colocado dentro del dispositivo de registro de electrofisiología, donde se hallaban los estímulos en alguna de las configuraciones mencionadas más arriba. Exactamente los mismos estímulos y protocolos fueron utilizados para medir la respuesta conductual y la respuesta de las NDM, validando así la comparación de los resultados obtenidos en ambos tipos de experimentos.

Se utilizaron dos tipos de protocolos de entrenamiento, uno de estimulación masiva que genera una memoria de muy corta duración (<10 min) y uno espaciado que provoca memorias de largo término (>24 hs).

Protocolo masivo: entrenamiento de 15 presentaciones sin intervalo entre ensayos (recordar que cada ensayo está compuesto por dos ciclos de movimiento del EVP, cada uno precedido por 2,3 seg sin estimulación, lo que significa una duración total del ensayo de 9 seg). Cada entrenamiento se realizó en su totalidad únicamente con uno u otro de los EVP. La evaluación consistió en la presentación de 1 ensayo con el segundo EVP a continuación del entrenamiento y sin discontinuidad temporal con el mismo. En algunos experimentos, de acuerdo a protocolos que serán detallados oportunamente, se modificó el número de ensayos presentados.

Protocolo espaciado: entrenamiento de 15 presentaciones con intervalo entre ensayos de 3 min utilizando únicamente uno u otro EVP. La fase de evaluación consistió en la presentación de 1 ensayo utilizando el mismo EVP del entrenamiento o el otro EVP. La respuesta conductual fue evaluada 24 hs luego del entrenamiento. En los experimentos de electrofisiología la respuesta fue evaluada 3 min después del entrenamiento, es decir, sin discontinuar el ritmo de presentación del estímulo utilizado durante el entrenamiento.

De aquí en adelante, se denomina EVP 1 al EVP con el cual se entrena a cada cangrejo (que puede ser el izquierdo o el derecho) y EVP 2 al que se utiliza en la fase de evaluación. Los experimentos fueron balanceados de manera tal que cada uno de los EVP fue utilizado para entrenar a un número semejante de animales.

Para los experimentos de electrofisiología el procedimiento fue el siguiente. Una vez identificada una neurona como NDM, lo que en general ocurre dentro de los 15

minutos de comenzada la búsqueda, se bajó la cortina del frente del dispositivo de registro y se dejó reposar al animal sin estimular durante 10 min. Luego se tomó una línea de base de la respuesta neuronal para cada EVP separadas por 3 min (las cuales se utilizan a posteriori para normalizar todas las respuestas), y luego de 10 min se comenzó con el entrenamiento (ver esquema en Fig. 25B). Es importante aclarar que el mantener un registro intracelular por la hora y cuarto necesaria para obtener cada dato aquí presentado no es trivial y que en el transcurso de la recolección de datos las condiciones de registro tuvieron que ser modificadas levemente para mejorar cada vez más la estabilidad de la preparación experimental y aumentar así las chances de terminar cada experimento. Una modificación de gran importancia fue el comenzar a sellar, una vez colocado el microelectrodo de registro, con vaselina sólida la apertura realizada en el ápice del pedúnculo ocular. De esta forma se minimiza el impacto de las pulsaciones de hemolinfa sobre el microelectrodo.

Resultados:

En primer lugar investigamos las características del aprendizaje generado por un entrenamiento masivo en cuanto a su estímulo-especificidad o capacidad de generalización. Para ello entrenamos en la configuración 1 a los cangrejos con uno de los EVP y los evaluamos luego utilizando el otro EVP.

La figura 26 ilustra los resultados del experimento realizado con 40 animales. Al cambiar de estímulo se observa una clara recuperación de la RE. En efecto, al comparar la respuesta del ensayo de evaluación con la del último ensayo del entrenamiento, se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,001$). Sin embargo, el nivel de recuperación no llega a ser comparable a la respuesta original. Se ha documentado en *Chasmagnathus* que situaciones de estrés como la provocada por la presentación repetida del EVP inducen una atenuación inespecífica de la RE (Valeggia y col., 1989). Este efecto inespecífico, que se observa solamente a tiempos cortos (menores a 90 min) luego de un entrenamiento (Romano y col., 1991), es conocido en la literatura como analgesia inducida por estrés (*stress-induced analgesia*). Al igual que en mamíferos la analgesia inducida por estrés en el cangrejo es principalmente mediada por la liberación de opiáceos endógenos (Maldonado y col., 1989; Tomsic y Maldonado, 1990; Romano y col., 1991).

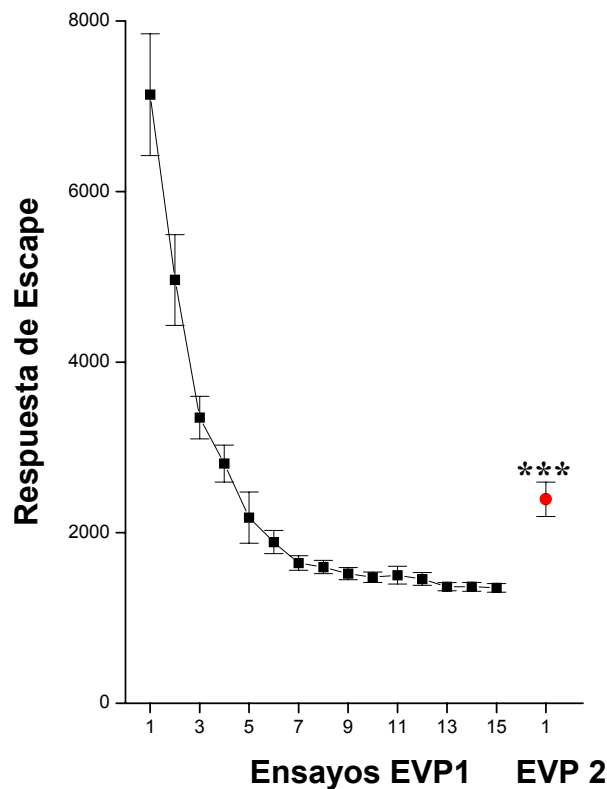


Figura 26: Estímulo-especificidad luego de un entrenamiento masivo. Resultados obtenidos al promediar la respuesta de escape de 40 animales sometidos a un entrenamiento masivo de 15 ensayos realizado en su totalidad únicamente con uno u otro de los EVP ubicados según la configuración 1. La evaluación consistió en la presentación de 1 ensayo con el segundo EVP a continuación del entrenamiento y sin discontinuidad temporal con el mismo. Dicho ensayo provoca una recuperación de la RE altamente significativa respecto al ensayo 15 del entrenamiento.

Con el fin de evaluar la participación de las NDM en el reconocimiento del estímulo aprendido realizamos luego el mismo protocolo de generalización pero esta vez midiendo la respuesta de las neuronas. La figura 27A muestra un ejemplo de la actividad de una NDM durante los ensayos 1 y 15 del entrenamiento y en la fase de evaluación. Se observa una gran caída de la respuesta (número de potenciales de acción) para el ensayo 15 del entrenamiento y una recuperación prácticamente total al cambiar de estímulo. La figura 27B ilustra el promedio de los resultados obtenidos en 10 experimentos similares.

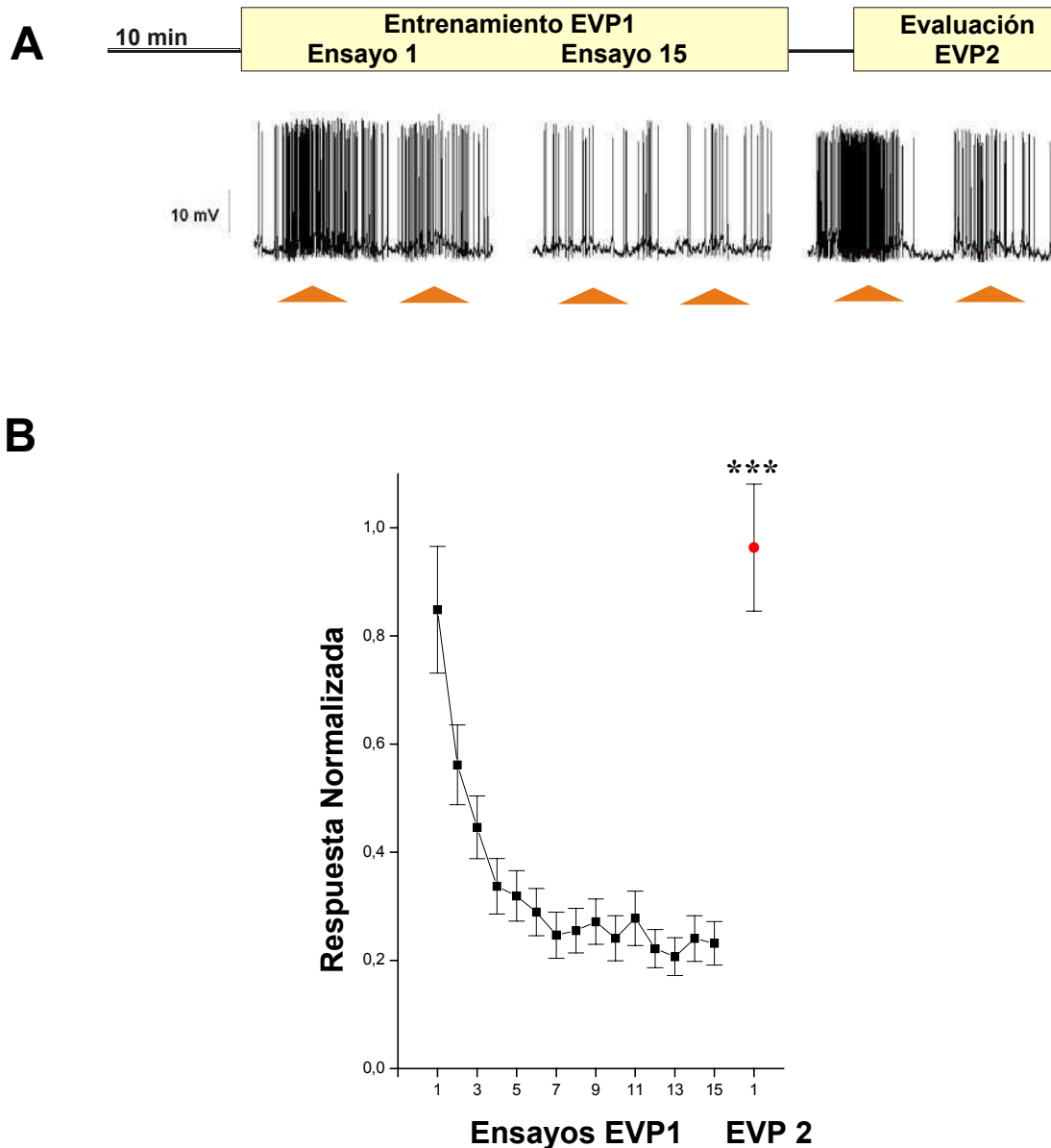


Figura 27: Estímulo-especificidad en la respuesta de las NDM luego de un entrenamiento masivo.

A) Ejemplo representativo de la actividad de una NDM durante los ensayos 1 y 15 del entrenamiento y en la fase de evaluación. Se observa una gran caída de la respuesta (número de potenciales de acción) para el ensayo 15 del entrenamiento masivo y una recuperación prácticamente total al cambiar de estímulo. B) Promedio de los resultados obtenidos en 10 experimentos similares. El entrenamiento fue realizado en su totalidad únicamente con uno u otro de los EVP ubicados según la configuración 1. La evaluación consistió en la presentación de 1 ensayo con el segundo EVP a continuación del entrenamiento y sin discontinuidad temporal con el mismo. Las respuestas están normalizadas respecto a las líneas de base tomadas antes del entrenamiento para cada EVP (igual protocolo que el ilustrado en la figura 25). La comparación entre el ensayo de evaluación y el último del entrenamiento arroja diferencias altamente significativas, mientras que no existen diferencias entre el ensayo de evaluación y el primer ensayo del entrenamiento ($p > 0,1$).

Al cambiar de estímulo la respuesta de las NDM muestra una recuperación completa. A diferencia de lo que se veía con la conducta, aquí la recuperación llega a los niveles iniciales de respuesta. En efecto, la comparación entre el ensayo de evaluación y el último de entrenamiento arroja diferencias altamente significativas ($p < 0,001$), mientras que no existen diferencias entre el ensayo de evaluación y el primer ensayo de entrenamiento ($p > 0,1$). La diferencia entre la actividad de las NDM y el comportamiento indica que el efecto decremental inespecífico mediado por opiodes que comentado más arriba, no afecta la actividad de las NDM y por lo tanto actuaría más cerca de la salida motora.

Cuando repetimos los experimentos utilizando la configuración 2 de los estímulos los resultados obtenidos fueron cualitativamente equivalentes a los expuestos anteriormente para la configuración 1.

La recuperación que se observa en el nivel de respuesta del animal al efectuar un cambio en el estímulo nos indica que la reducción de la RE producida por un entrenamiento masivo es estímulo-específica y los resultados electrofisiológicos indican que esta propiedad está reflejada a nivel de las NDM. Para que se verifique esta especificidad tiene que ocurrir un reconocimiento del estímulo. Pero, ¿cuántas presentaciones del objeto son necesarias para que el animal aprenda a identificarlo y así pueda distinguirlo de otro similar? Para responder a este interrogante realizamos una serie de experimentos en los que se sometió a los animales a distinto número de ensayos con uno de los EVP para, al cabo de 2 seg (sin discontinuar por lo tanto la frecuencia de estimulación), evaluar la respuesta evocada con el mismo o con el otro EVP. Los resultados se observan en la figura 28 donde cada columna grafica la respuesta promedio de 20 animales al ensayo cuyo número aparece debajo de la misma, utilizando el mismo estímulo que en el entrenamiento (ej: 4 es el cuarto ensayo del entrenamiento), o un estímulo nuevo (4', se estimuló 3 veces con un EVP y al cuarto se cambió al otro EVP).

Los resultados indican que la estímulo-especificidad surge entre los ensayos 5 y 7. Este punto es interesante ya que coincide con los ensayos en que la curva de aprendizaje deja de ser empinada para entrar en la asíntota de baja respuesta (ver *inset* Fig. 28).

De los resultados de esta serie de experimentos se desprende también que luego del ensayo 7, la estímulo-especificidad no parece mejorar con el agregado de más

ensayos (comparar respuesta 8-8' con 100-100'). Esto podría sugerir que una vez alcanzado el reconocimiento específico el fenómeno es de tipo todo o nada.

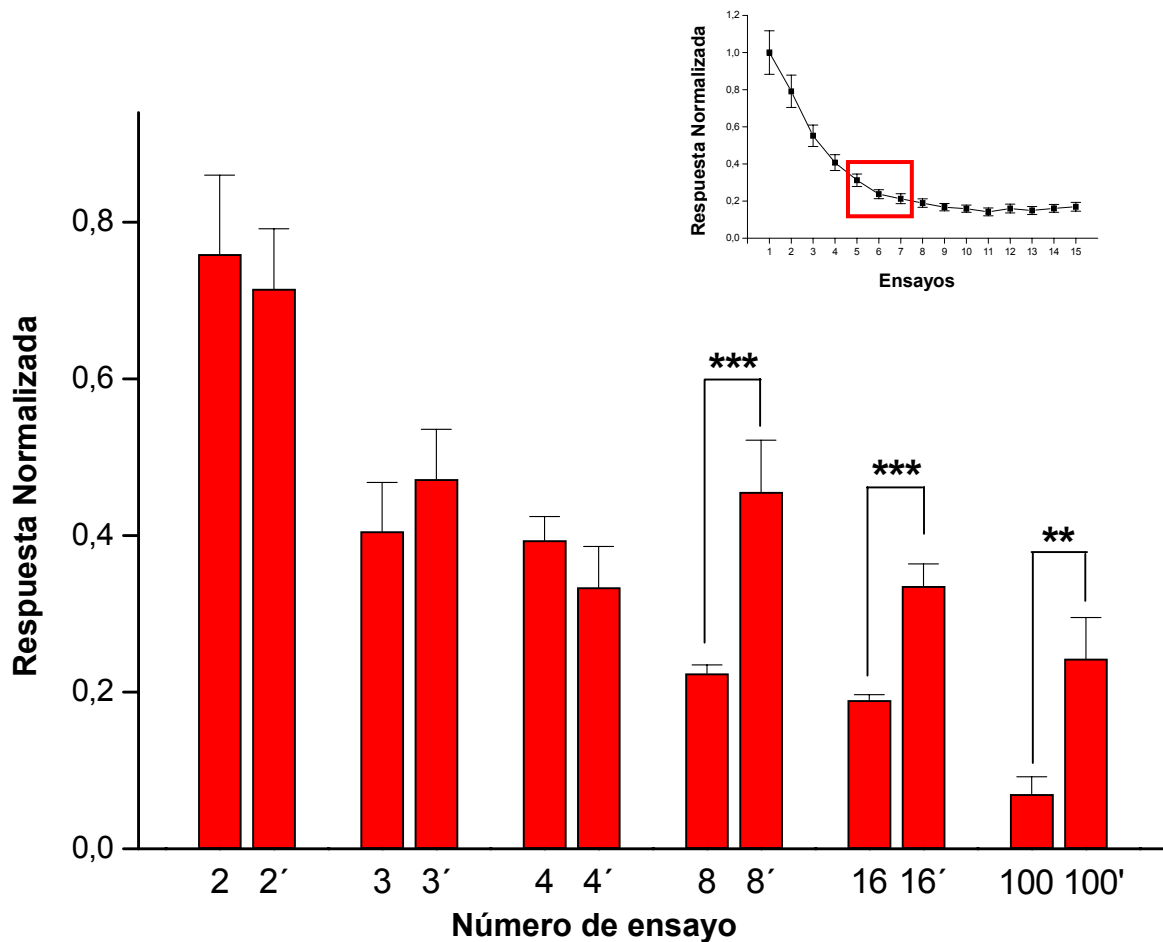


Figura 28: Reconocimiento del estímulo y número de ensayos. Se sometió a los animales a distinto número de ensayos con uno de los EVP y se evaluó la respuesta evocada con el mismo o el otro EVP. Cada columna grafica la respuesta promedio de 20 animales al ensayo cuyo número aparece debajo de la misma, utilizando el mismo estímulo que en el entrenamiento (ej: 4 es el cuarto ensayo del entrenamiento), o un estímulo nuevo (4', se estimuló 3 veces con un EVP y al cuarto se cambió al otro EVP). Las respuestas se presentan normalizadas con respecto al primer ensayo. La estímulo-especificidad parece surgir entre los ensayos 5 y 7. Estos son los ensayos donde generalmente la curva de aprendizaje deja de ser empinada para entrar en la asíntota de baja respuesta (ver *inset*).

El valor adaptativo de la estímulo-especificidad para un aprendizaje como la habituación es evidente. Permite ahorrar energía al no responder a un objeto que probó ser inofensivo mientras mantiene la capacidad de volver a responder ante un estímulo ligeramente distinto. Los resultados obtenidos con los entrenamientos masivos en

Chasmagnathus, tanto conductuales como con la respuesta de las NDM están en concordancia con un aprendizaje que es específico para el estímulo del entrenamiento. Sin embargo, la estímulo-especificidad puede depender del tipo de aprendizaje inducido. Los entrenamientos masivos hasta aquí utilizados generan una memoria no asociativa de muy breve duración (el animal aprende sólo acerca del estímulo). En contraste, los entrenamientos con mayor intervalo interestímulo, entrenamientos espaciados, inducen un aprendizaje asociativo (el animal aprende acerca del estímulo y su contexto) y generan una memoria robusta de largo término que perdura más de 5 días (ver introducción). Por lo tanto decidimos evaluar la capacidad de generalización de los cangrejos ante la configuración 1 de los estímulos (configuración especular) utilizando este tipo de entrenamiento más robusto. El experimento conductual se diseñó de la siguiente forma. El grupo entrenado recibió el día 1 un entrenamiento espaciado (intervalo entre estímulos: 3 min) de 15 ensayos con uno de los EVP (la mitad del grupo fue entrenado con un EVP y la otra mitad con el otro) mientras que el grupo control fue expuesto al contexto únicamente. En el día 2 la mitad de los animales entrenados fue evaluada con el mismo EVP del entrenamiento mientras que la otra mitad lo fue con el opuesto.

Quedaron definidos por lo tanto 3 grupos:

Día 1: EVP izquierdo; Día 2: EVP izquierdo (n=15)] igual
Día 1: EVP derecho; Día 2: EVP derecho (n=15)	
Día 1: EVP derecho; Día 2: EVP izquierdo (n=15)] distinto
Día 1: EVP izquierdo; Día 2: EVP derecho (n=15)	
Día 1: contexto; Día 2: EVP izquierdo (n=15)] control
Día 1: contexto; Día 2: EVP derecho (n=15)	

En la figura 29 se muestran los resultados obtenidos. Confirmando numerosos estudios previos, se observa que durante la fase de evaluación del día 2 la respuesta de los animales confrontados con el mismo estímulo que en el entrenamiento es significativamente menor que la del grupo control ($p < 0,05$). Por otro lado se observa que la respuesta de los animales que enfrentaron el nuevo estímulo no difiere del control

($p > 0,1$). Por lo tanto podemos concluir que bajo las condiciones ensayadas no existe generalización entre estos dos estímulos.

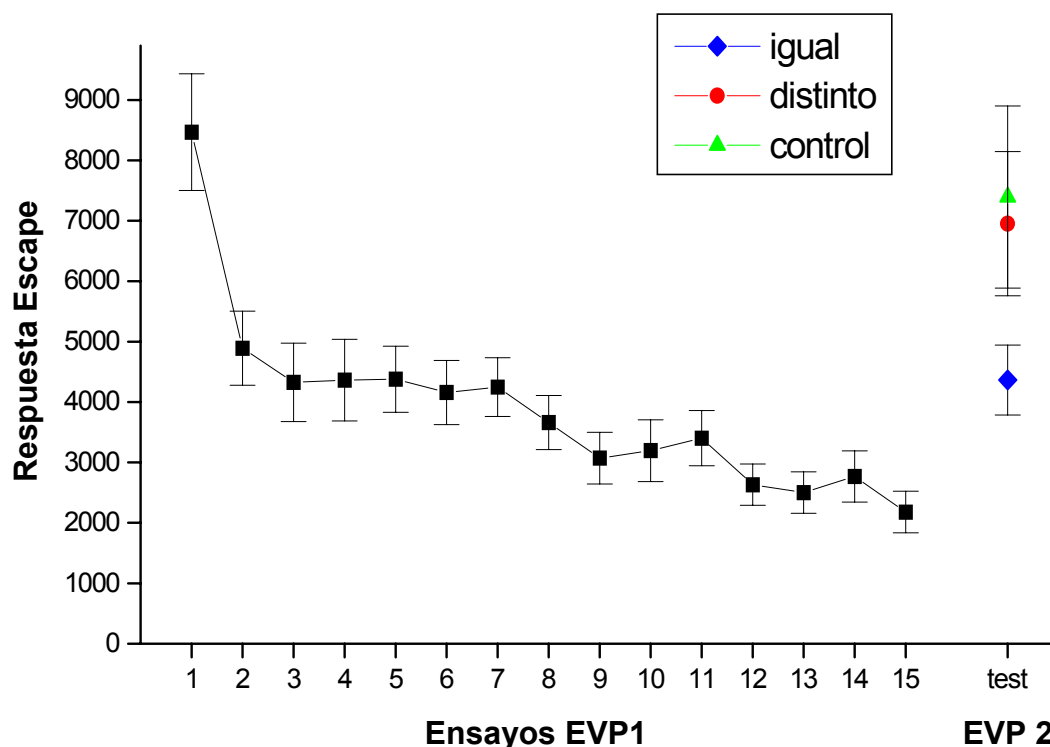


Figura 29: Evaluación de la generalización ante un entrenamiento espaciado con los estímulos en la configuración 1. Gráfico mostrando la respuesta durante el entrenamiento (grupos igual y distinto promediados) y resultados de la fase de evaluación 24 hs después ($n=30$ para cada grupo, ver detalles en el texto). **Grupo igual:** se utilizó el mismo EVP durante el entrenamiento y la evaluación. **Grupo distinto:** fueron entrenados con uno de los EVP y evaluados con el otro. **Grupo control:** expuestos únicamente al contexto el día 1, evaluados con un ensayo de EVP en el día 2. Durante la fase de evaluación del día 2, la respuesta del **grupo igual** es significativamente menor que la del **grupo control** ($p < 0,05$) mientras que la respuesta del **grupo distinto** no difiere de la del **grupo control** ($p > 0,1$). Este resultado indica que bajo las condiciones ensayadas no existe generalización entre estos dos estímulos.

En el experimento anterior los estímulos dispuestos en la configuración 1 se mueven como imágenes especulares, variando tanto en su posición como en la dirección inicial de su movimiento. Para ver cual de estos factores era el que podía estar impidiendo la generalización, repetimos la experiencia pero utilizando la configuración 2 de los estímulos donde los dos EVP varían únicamente en su posición.

Se utilizaron los mismos grupos que en el experimento anterior:

Día 1: EVP izquierdo; Día 2: EVP izquierdo (n=15)
Día 1: EVP derecho; Día 2: EVP derecho (n=15)] **igual**

Día 1: EVP derecho; Día 2: EVP izquierdo (n=15)
Día 1: EVP izquierdo; Día 2: EVP derecho (n=15)] **distinto**

Día 1: contexto; Día 2: EVP izquierdo (n=15)
Día 1: contexto; Día 2: EVP derecho (n=15)] **control**

La figura 30 muestra los resultados obtenidos en estas condiciones. Como puede notarse los resultados difieren respecto a los obtenidos con la anterior configuración de los estímulos. En este caso sí se observa un fenómeno de generalización, dado que la respuesta del **grupo distinto** es significativamente menor a la del **grupo control** ($p < 0,05$) e indistinguible de la del **grupo igual** que recibió el mismo estímulo durante la fase de evaluación ($p > 0,1$). Podemos deducir entonces que los animales son capaces de generalizar entre dos objetos que difieren en su posición toda vez que el resto de los parámetros, incluida la dirección inicial de su movimiento, sean iguales.

Sabiendo ahora cómo es el comportamiento de los animales ante cambios en determinados parámetros del estímulo, es decir, que son capaces de generalizar lo aprendido ante estímulos que varían en su posición en el espacio, pero no en otros factores, podemos volver a nuestro propósito original de analizar hasta qué punto las NDM pueden reflejar estos fenómenos. En otras palabras, ¿está presente en cada una de estas células la capacidad para determinar la generalización del estímulo? ¿O es ésta una propiedad que surge de la actividad conjunta de esta población de neuronas y su interacción con otras neuronas más centrales?

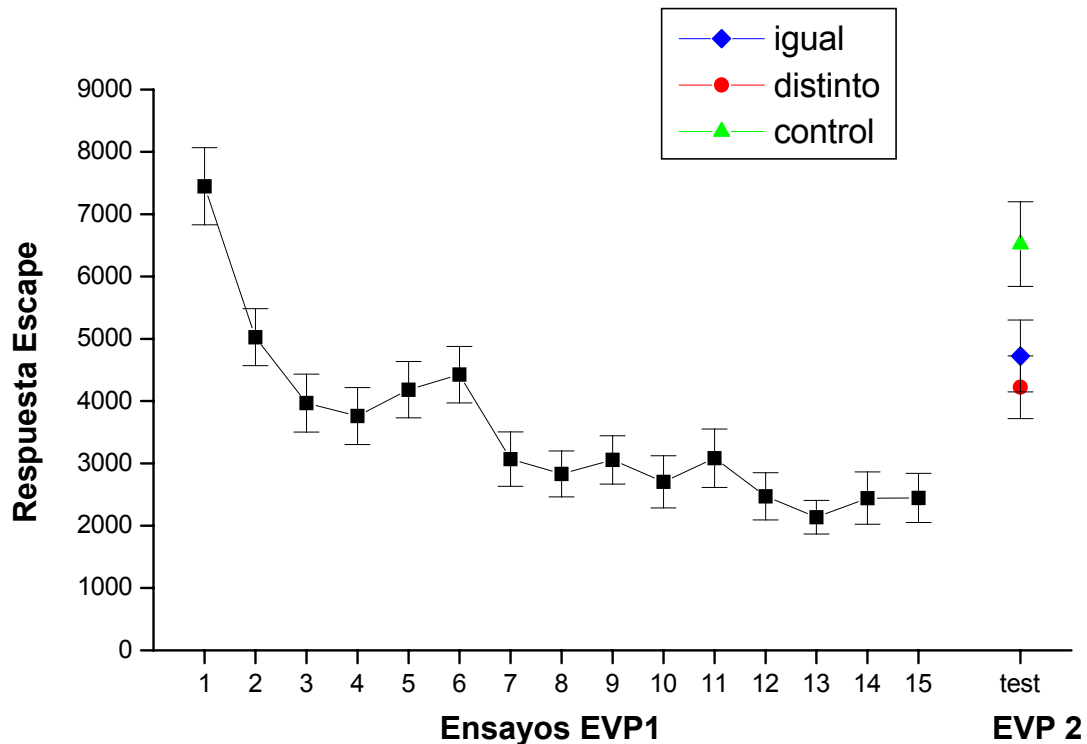


Figura 30: Evaluación de la generalización ante un entrenamiento espaciado con los estímulos en la configuración 2. Gráfico mostrando la respuesta durante el entrenamiento (grupos igual y distinto promediados) y resultados de la fase de evaluación 24 hs después (n=30 para cada grupo, ver detalles en el texto). Los grupos igual, distinto y control están definidos como fue detallado en la figura 29. Durante la fase de evaluación del día 2, la respuesta del **grupo distinto** es significativamente menor a la del **grupo control** ($p < 0,05$) y no difiere de la del **grupo igual** ($p > 0,1$). En base a estos resultados concluimos que los animales son capaces de generalizar entre dos objetos que difieren en su posición mientras el resto de los parámetros, incluida la dirección inicial de su movimiento, sean iguales.

En las figuras 31 y 32 se muestran los resultados obtenidos al registrar la actividad de las NDM mientras se aplicaron los mismos protocolos de entrenamiento espaciado que se utilizaron para estudiar la conducta. A diferencia de los experimentos comportamentales, en las neuronas la fase de evaluación se realizó 3 min luego del entrenamiento. A ese tiempo, la generalización del EVP, medida como la reducción de la RE frente a un EVP distinto, no puede ser adecuadamente evaluada a nivel conductual ya que dicha respuesta se encuentra transitoriamente deprimida de manera inespecífica. Sin embargo, la evaluación de la respuesta neuronal inmediatamente luego del entrenamiento está justificada ya que, como demostramos en la primera parte de este capítulo, el efecto de depresión inespecífica de la respuesta conductual que sigue al entrenamiento ocurre río abajo de las NDM.

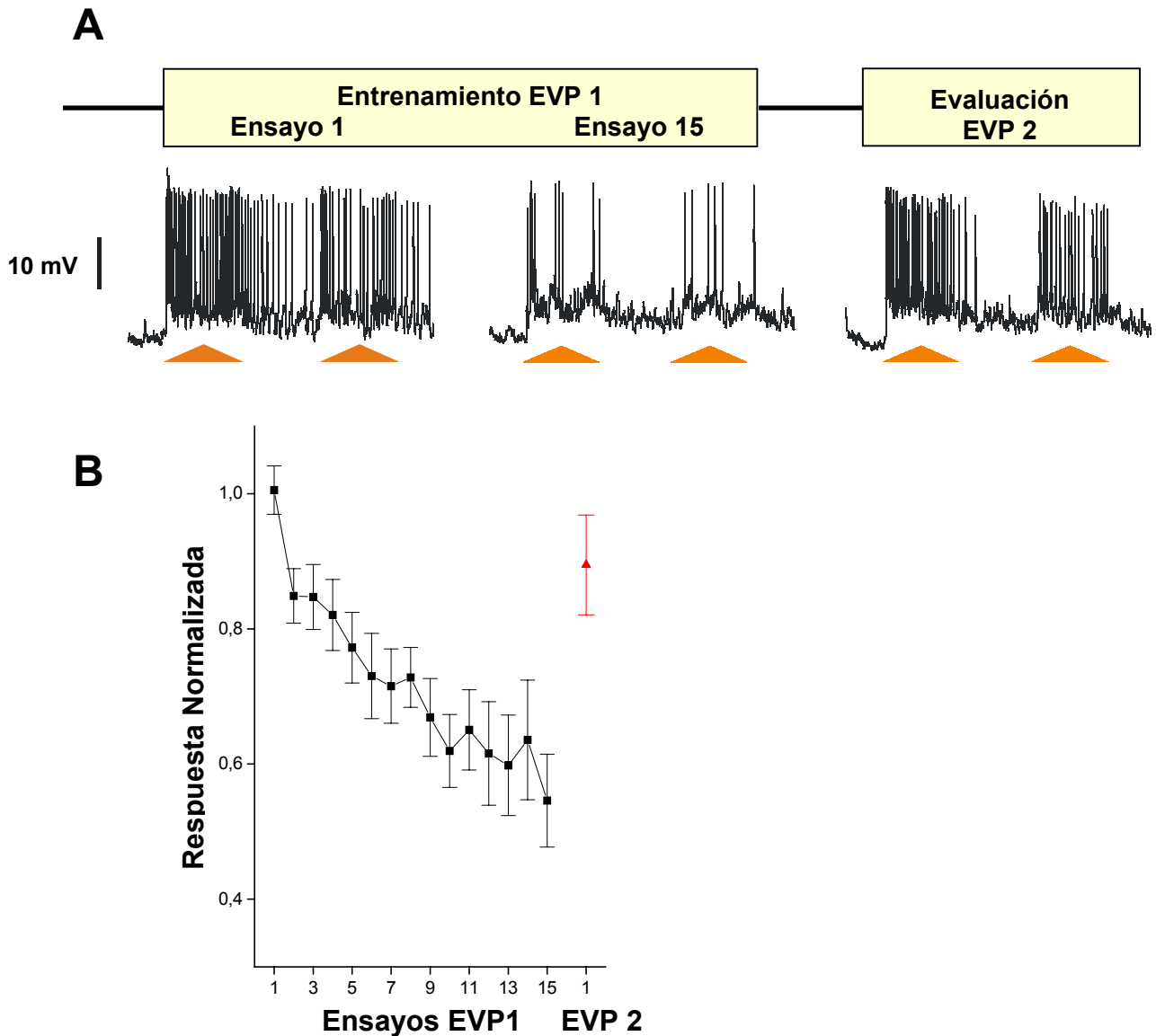


Figura 31: Evaluación de la capacidad de las NDM de reflejar la conducta ante el experimento de generalización en la configuración 1. A) Ejemplo representativo de la actividad de una NDM durante los ensayos 1 y 15 del entrenamiento y en la fase de evaluación. Se observa una importante caída en la respuesta para el ensayo 15 del entrenamiento espaciado y una recuperación prácticamente total al cambiar de estímulo. B) Promedio de los resultados obtenidos en 15 experimentos similares. El entrenamiento fue realizado con uno de los EVP ubicados según la configuración 1. La evaluación se efectuó 3 min luego del entrenamiento y consistió en la presentación de 1 ensayo con el EVP no utilizado en el entrenamiento. Las respuestas están normalizadas respecto a las líneas de base tomadas antes del entrenamiento para cada EVP (ver figura 25). La comparación entre el ensayo de evaluación y el último de entrenamiento arroja diferencias altamente significativas ($p < 0,005$), mientras que no existen diferencias entre el ensayo de evaluación y el primer ensayo de entrenamiento ($p > 0,1$).

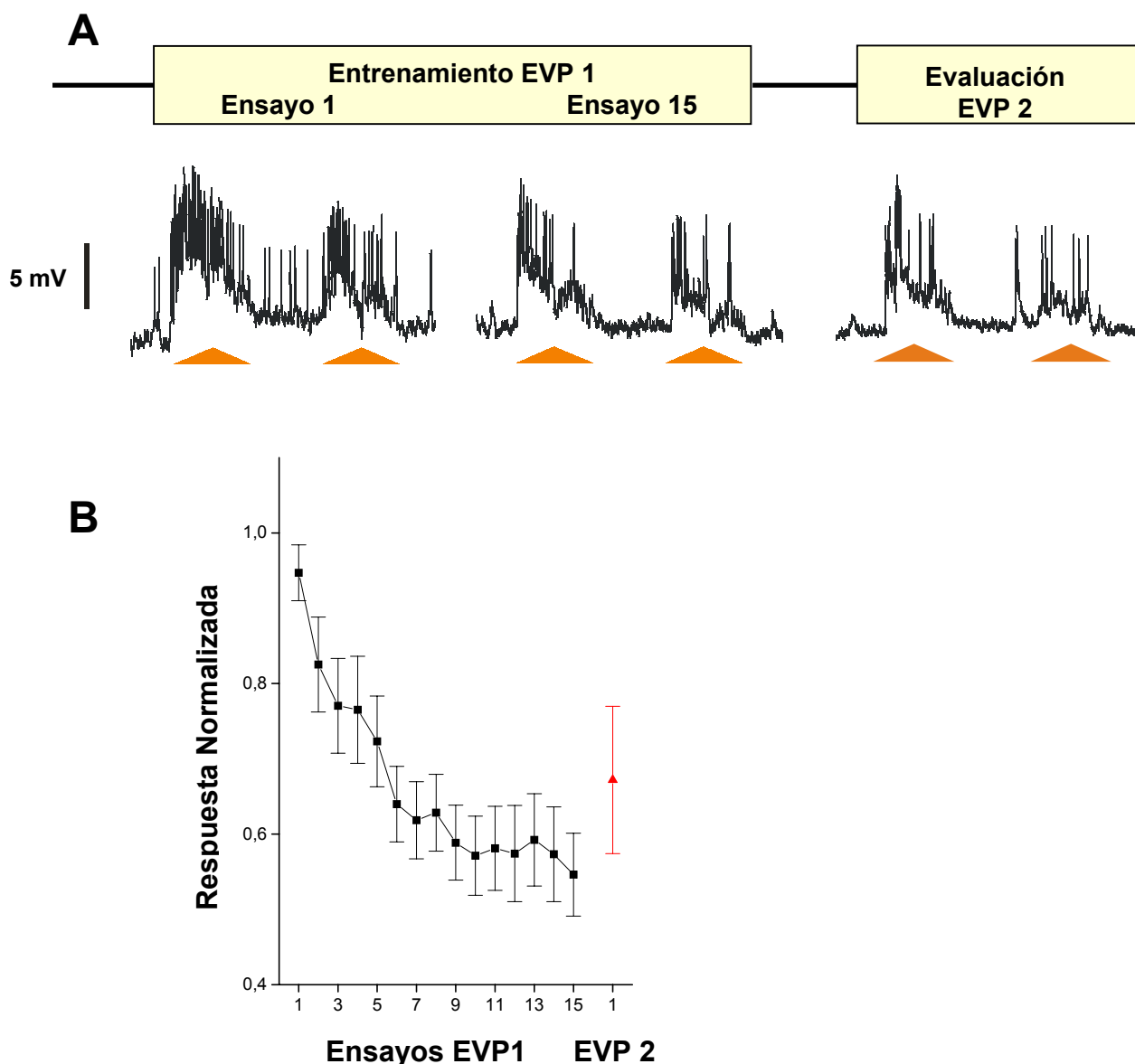


Figura 32: Evaluación de la capacidad de las NDM de reflejar la conducta ante el experimento de generalización en la configuración 2. A) Ejemplo representativo de la actividad de una NDM durante el ensayo 1 y 15 del entrenamiento y el ensayo de evaluación. Se observa una importante caída en la respuesta para el ensayo 15 del entrenamiento espaciado que se mantiene al cambiar de estímulo. B) Promedio de los resultados obtenidos en 15 experimentos similares. El entrenamiento fue realizado con uno de los EVP ubicados según la configuración 2. La evaluación se efectuó 3 min luego del entrenamiento y consistió en la presentación de 1 ensayo con el EVP no utilizado en el entrenamiento. Las respuestas están normalizadas respecto a las líneas de base tomadas antes del entrenamiento para cada EVP. Como puede observarse la respuesta se mantiene reducida cuando se estimula con el segundo EVP durante la evaluación, no siendo significativamente distinta de la obtenida para el ensayo 15 ($p > 0,1$) pero siendo significativamente menor a la obtenida al comienzo de la sesión ($p < 0,05$).

La figura 31 ilustra los resultados obtenidos con la configuración 1 de los estímulos. Se muestra un ejemplo representativo de la modificación de la respuesta de una NDM ante el protocolo utilizado y un gráfico que ilustra la respuesta promediada de 15 neuronas (una por animal). Como puede observarse, existe una recuperación total en el nivel de la respuesta neuronal al cambiar de estímulo. En efecto, la respuesta del ensayo de evaluación fue significativamente mayor que la del ensayo 15 ($p < 0,005$), a la vez que no difirió de la del primer ensayo ($p > 0,1$). Por lo tanto, frente a esta condición experimental en la respuesta de estas neuronas, al igual que en el comportamiento, no se observa generalización.

Los resultados obtenidos con la configuración 2 de los estímulos revelan un panorama distinto. La figura 32 muestra un ejemplo representativo de la actividad de las NDM bajo este protocolo de estimulación y un gráfico del promedio de la respuesta de 15 neuronas. Como puede observarse la respuesta se mantiene reducida cuando se estimula con el segundo EVP durante la evaluación, no siendo significativamente distinta de la obtenida para el ensayo 15 ($p > 0,1$) pero siendo significativamente menor a la obtenida al comienzo de la sesión ($p < 0,05$). Los resultados muestran así que estas neuronas pueden mediar las formas simples de generalización, como cambios en la posición del estímulo, que se observaron en la respuesta conductual de los cangrejos bajo las presentes condiciones de entrenamiento.

A modo de síntesis, presentamos en la figura 33 las respuestas comparadas de los animales y las NDM durante el ensayo de evaluación realizado luego de entrenamientos espaciados, bajo las dos configuraciones de estímulos empleadas.

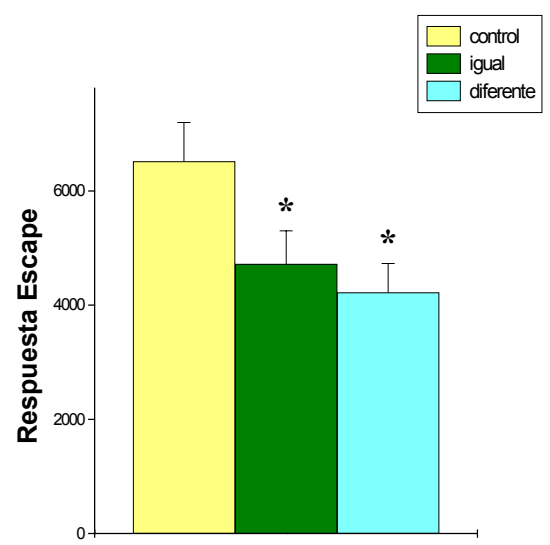
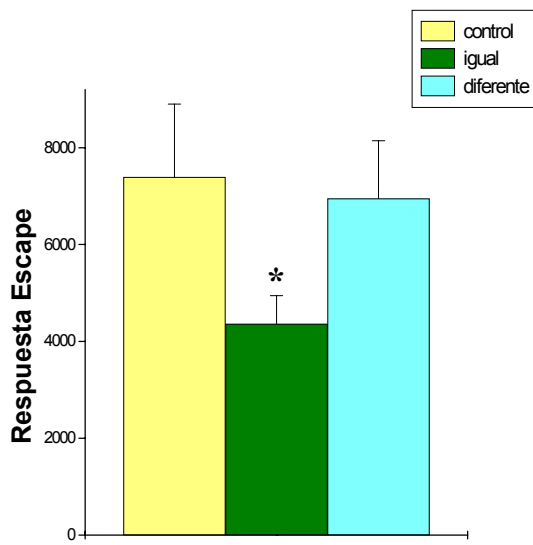
Configuración 1



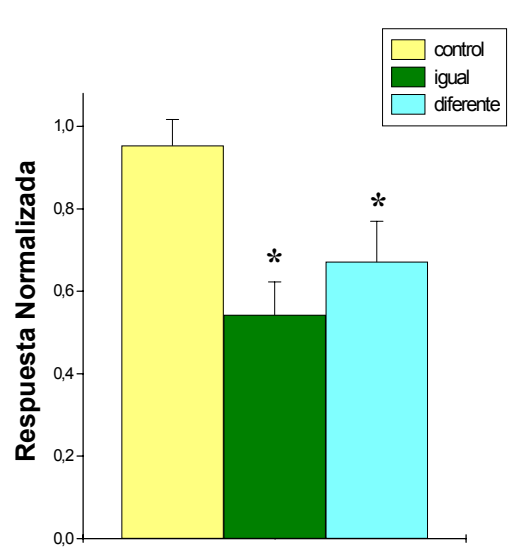
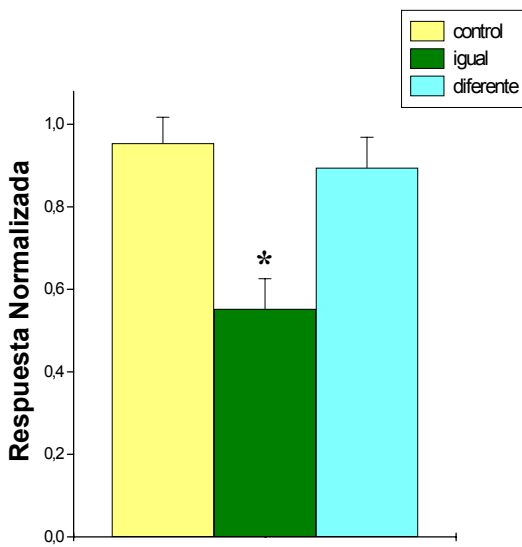
Configuración 2



Conducta



NDM



Discusión:

El aprendizaje implica tanto la capacidad de distinguir pequeñas diferencias entre estímulos (especificidad) como también la capacidad de generalizar el estímulo aprendido a distintas situaciones. En el presente capítulo estudiamos las características del aprendizaje visual de *Chasmagnathus* ante la estimulación repetida con el EVP, en cuanto a su estímulo-especificidad y capacidad de generalización. Observamos que en el caso del entrenamiento masivo, la memoria de muy corta duración que se adquiere es específica del estímulo presentado. En el caso del entrenamiento espaciado, la memoria de larga duración puede generalizarse a estímulos ubicados en otras regiones del campo visual siempre que se mantengan las otras características del estímulo como ser su modo de desplazamiento.

Un resultado destacable de este estudio es la similitud en todos los casos entre la respuesta de las NDM y la conducta. La respuesta de las NDM resulta en ciertos casos todavía un mejor predictor de la información adquirida por el animal que la conducta misma. Como fue explicado anteriormente, durante el entrenamiento existe una liberación de opiodes que genera una reducción inespecífica de la respuesta comportamental de escape a tiempos cortos luego del entrenamiento. Esta es la razón por la cual a nivel conductual no se puede evaluar generalización a tiempos cortos y tiene que ser evaluada a 24 horas cuando dichos efectos inespecíficos ya no enmascaran los resultados. Notablemente, sin embargo, encontramos que 3 minutos luego del entrenamiento la respuesta de las NDM ya representa (y por ende predice) lo que va a hacer el animal 24 horas después. Por lo tanto, los resultados de este capítulo sugieren nuevamente que estas neuronas son elementos centrales en la cadena de procesamiento de la información adquirida y que están estrechamente relacionadas con el comportamiento de escape y la memoria visual del animal.

Al igual que para la respuesta de escape, en *Chasmagnathus* dos EVP semejantes que son presentados independientemente por primera vez, provocan en cada NDM respuestas muy similares. Sin embargo, luego del entrenamiento con un determinado EVP, pequeñas diferencias en, por ejemplo, la dirección inicial de su movimiento, son factores decisivos para el reconocimiento de un objeto como diferente. El hecho de encontrar estas capacidades reflejadas a nivel de neuronas individuales identificadas, como las NDM, brinda una excelente posibilidad para el estudio de un aspecto importante de los mecanismos celulares del aprendizaje. En

breve, la hipótesis ampliamente aceptada que propone que el cambio en la conducta por aprendizaje es el resultado de cambios en las neuronas, ha sido reelaborada. La hipótesis actualizada implica que un determinado aprendizaje induciría cambios en dendritas o aún en sinapsis específicas pero no en toda la neurona. Esta última versión tiene la ventaja de que una misma neurona podría integrar distintos circuitos de aprendizaje, ofreciendo por consiguiente la posibilidad de un mayor número de modificaciones del sistema. Este es el marco funcional en que a nivel neuronal podría tener lugar el fenómeno de estímulo-especificidad. Concretamente, la estímulo-especificidad estaría representada por cambios a nivel de sinapsis particulares mientras que la generalización involucraría modificaciones que se extiendan más allá del área estimulada. Este tipo de procesos neurofisiológicos son raramente estudiados en relación a un aprendizaje real. En efecto, la hipótesis de especificidad sináptica del aprendizaje ha sido evaluada mayormente en modelos *in vitro* (e. g. rebanadas de cerebro o en células en cultivo) y generalmente bajo condiciones no fisiológicas (paradigmas de LTP, LTD). En *Chasmagnathus*, el cambio en la respuesta de escape generado por la información provista por un EVP a lo largo de un entrenamiento espaciado, induce modificaciones de larga duración en las NDM (Tomsic y col., 2003; Berón de Astrada, 2005). Los resultados presentados en este capítulo muestran que dichos cambios pueden implicar o no el reconocimiento de un segundo EVP (dependiendo de las diferencias que presenta el nuevo EVP respecto al que se utilizó durante el entrenamiento). Así, las propiedades de estímulo-generalización y estímulo-especificidad encontradas en las NDM del cangrejo, ofrecen una oportunidad para investigar, en neuronas individuales identificadas, la especificidad sináptica del aprendizaje en un animal vivo y durante un verdadero proceso de aprendizaje.

Capítulo 3: Binocularidad y Neuronas Detectoras de Movimiento

Los cangrejos pertenecientes a las familias nombradas coloquialmente como de frente amplio (como *Chasmagnathus granulatus*) poseen la mayor separación entre los ojos conocida para los artrópodos. Además la superposición de los campos visuales de sus ojos es casi completa por lo cual resulta plausible que utilicen la estereopsis como método de estimación de distancia (Zeil y col., 1986). Para que esto suceda la información que es captada por los dos ojos debe confluir hacia neuronas individuales en lugares definidos del sistema nervioso. Neuronas con respuesta binocular habían sido encontradas en el cerebro medio de crustáceos (Glantz y col., 1981) pero su existencia en los lóbulos ópticos era desconocida. Recientemente, en *Chasmagnathus* realizamos estudios tendientes a evaluar la presencia de neuronas binoculares en los lóbulos ópticos de los pedúnculos oculares, utilizando registros intracelulares (Sztarker, 2000; Sztarker y Tomsic, 2004). Para ello, separamos los campos visuales de los dos ojos utilizando un tabique (ver descripción en el capítulo 1) y realizamos registros intracelulares en uno de los pedúnculos (el derecho), de aquí en más definido como el ojo ipsilateral, mientras los estímulos podían ser presentados tanto a dicho ojo como al ojo contralateral. Registramos 130 neuronas en 65 animales y según su respuesta a un pulso de luz y/o al movimiento de un EVP fueron clasificadas en seis categorías. De los seis grupos, cinco presentaron respuesta monocular únicamente: las neuronas depolarizantes pasivas, las hiperpolarizantes pasivas, las *sustaining*, las *dimming* y las fásicas. Las neuronas pasivas depolarizantes, las pasivas hiperpolarizantes, las *sustaining* y las *dimming*, se encuentran bien descritas en el *crayfish* donde han sido identificadas en el primer y segundo neuropilo óptico. El quinto grupo de neuronas monoculares corresponde a las neuronas fásicas cuya presencia fue mencionada recientemente por primera vez en crustáceos (Berón de Astrada y col., 2001). Resultados de tinciones intracelulares indican que éste es un grupo heterogéneo formado por neuronas tanto tangenciales como columnares que se ubican entre la médula y la lóbula.

En ese estudio encontramos un único grupo de neuronas binoculares, las NDM de lo lóbula. De 54 neuronas registradas en 40 cangrejos, 53 (98%) respondían a los estímulos visuales presentados al ojo ipsilateral y contralateral separadamente, es decir que todas las NDM integran información binocular. Un hecho curioso es que a pesar de las diferencias en las respuestas observadas entre las distintas NDM, para cada una de

ellas encontramos que la respuesta evocada por la presentación del EVP al ojo ipsilateral era muy semejante a la evocada por la presentación al ojo contralateral. Esta semejanza se reflejaba en parámetros tales como el número y tamaño de los potenciales de acción y tamaño del potencial excitatorio postsináptico (PEPS).

Estos resultados constituyeron la primera evidencia de que en los crustáceos la binocularidad comienza a integrarse a nivel del tercer neuropilo óptico.

Para aprender más acerca de las vías que comunican las señales visuales que ingresan por ambos ojos, realizamos un análisis de las latencias de respuesta de las NDM ante el EVP presentado a cada ojo independientemente (n=30 neuronas). Las respuestas ante la estimulación ipsilateral resultaron ser significativamente más rápidas (25 mseg en promedio) que aquellas obtenidas por estimulación contralateral ($p < 0,05$; promedios ipsi= $89,57 \pm 7,63$ mseg; contra= $114,17 \pm 9,45$ mseg). Debe notarse sin embargo, que ésta es una medición con mucha variabilidad debido a que, como las diferentes neuronas poseen campos receptivos distintos en extensión y orientación, entonces el EVP comienza a ingresar a los campos receptivos de las diferentes neuronas a distintos tiempos. Así, el rango de latencias producido por estimulación ipsilateral oscila entre 28 y 139 mseg mientras que para la estimulación contralateral varía entre 34 y 191 mseg.

A continuación analizamos la latencia de respuesta ante un pulso de luz que, dado que afecta toda la superficie de omatidias simultáneamente, estimula todas las NDM a un mismo tiempo. Si bien existen muchas NDM que no responden a estímulos estacionarios como ser un cambio en la intensidad de la luz, aquellas que responden muestran un semejante perfil de respuesta ante la estimulación ipsi o contralateral. La medición de las latencias de 10 neuronas de distintos animales reveló que en todos los casos la latencia ante estimulación ipsilateral fue significativamente más corta (17 mseg en promedio) que la obtenida ante estimulación contralateral ($p < 0,001$; promedios ipsi= $29,69 \pm 1,34$ mseg; contra= $46,19 \pm 2,38$ mseg). Como era esperado, la variabilidad en las latencias fue mucho menor que en las mediciones para el EVP. No obstante, las latencias más rápidas obtenidas para el pulso de luz (ipsilateral=23,2 mseg, contralateral=34,2 mseg) son comparables a aquellas obtenidas por estimulación con el EVP (ipsilateral=28 mseg, contralateral=34 mseg).

En el capítulo 1 de la presente sección mostramos que la percepción binocular del EVP rinde respuestas comportamentales y neuronales que aproximadamente duplican en intensidad a las evocadas con visión monocular. Cabe preguntarse entonces si las respuestas comportamentales binoculares resultan de la suma algebraica de las estimulaciones monoculares de las NDM.

En moscas, los estudios sobre las características binoculares de interneuronas visuales se realizan utilizando dos estímulos independientes, uno presentado a cada ojo, aplicados en forma secuencial o simultánea. En estos estudios se demostró que la respuesta binocular de las neuronas CH resulta de la sumación lineal de las respuestas monoculares mientras que las neuronas HS muestran similares respuestas al ser estimuladas en forma monocular o binocular (Egelhaaf y col., 1993). Para entender mejor cómo es la integración de la información de los dos ojos en las NDM del cangrejo, decidimos comparar la respuesta de una misma NDM ante la estimulación con el EVP al ojo ipsilateral, al contralateral o a los dos ojos simultáneamente. En este último caso, el tabique sigue separando los campos visuales pero los dos ojos son estimulados al mismo tiempo con dos EVP. Esta es una estimulación bilateral pero no binocular, dado que cada ojo no ve exactamente el mismo objeto. El experimento se realizó de la siguiente manera. Una vez identificada una neurona como NDM, se bajó la cortina y se dejó al animal sin estimular por 10 min. Luego se registró la respuesta de la neurona ante las tres condiciones de estimulación separadas por 3 min. El orden en que fueron presentados los ensayos en cada experimento se eligió en forma pseudoaleatoria para minimizar así en el total de los datos el efecto de la reducción de la respuesta por los sucesivos ensayos.

La figura 34A muestra dos ejemplos representativos de las respuestas de las NDM ante estas condiciones. La primera impresión que surge al observar los registros es que la respuesta ante la estimulación bilateral no difiere de la obtenida al estimular cualquiera de los ojos por separado. Esta impresión fue confirmada analizando en forma conjunta los datos de 14 experimentos los cuales demostraron que no existían diferencias significativas en los valores medios de las tres condiciones de estimulación ni en el número de potenciales de acción evocados, ni en el tamaño de los potenciales de acción, ni en la magnitud máxima del PEPS (Fig. 34B). Sin embargo, dado que las respuestas difieren ampliamente entre las distintas NDM la desviación estándar es muy grande, por lo cual la comparación de las medias no resulta completamente informativa.

Por lo tanto la confirmación de que en una misma neurona las respuestas ante la estimulación unilateral o bilateral eran casi idénticas provino de un análisis de correlaciones. Los coeficientes de correlación para la comparación del número de potenciales de acción, tamaño de potenciales de acción y tamaño del PEPS entre la estimulación ipsilateral y bilateral (paneles izquierdos) fueron $r= 0,97$, $r= 0,93$ y $r= 0,96$, y entre la estimulación contralateral y bilateral (paneles derechos) fueron $r= 0,96$, $r= 0,98$ y $r= 0,88$, respectivamente (Fig. 35).

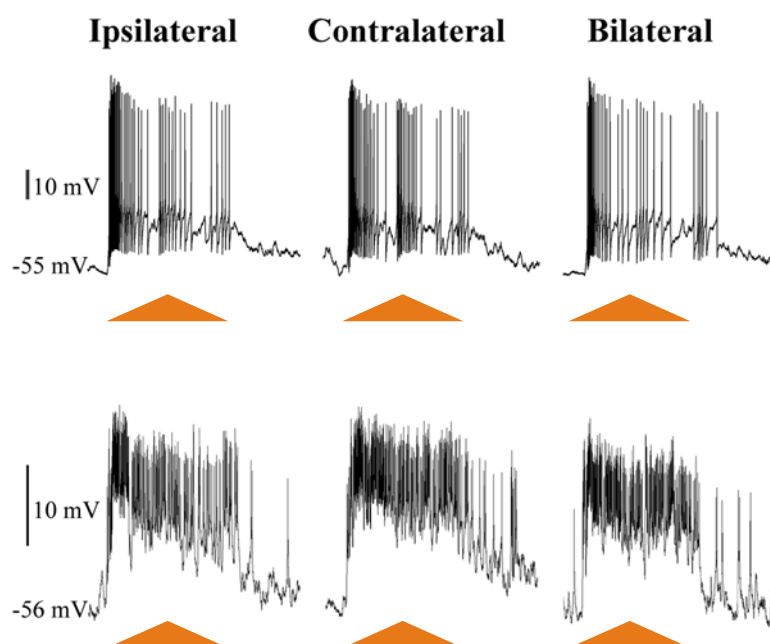
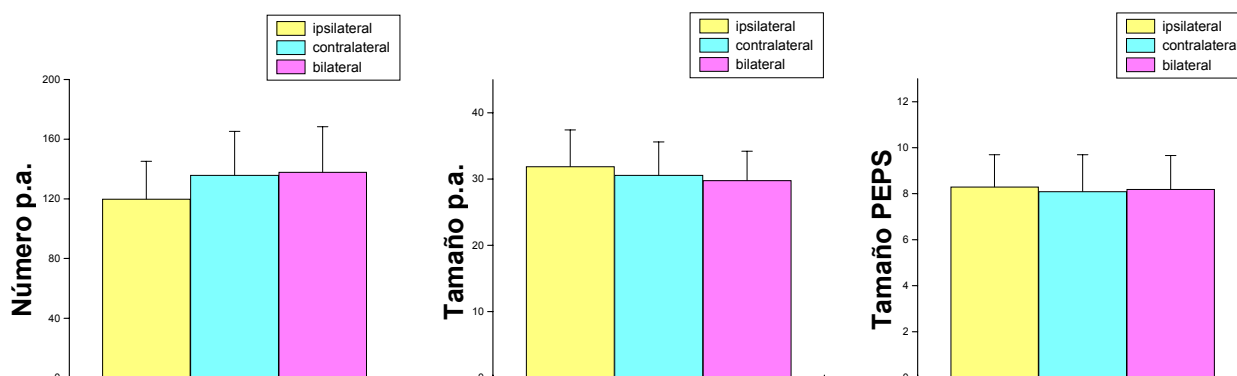
A**B**

Figura 34: Respuestas registradas en las NDM ante estimulación a cada ojo independientemente (ipsilateral o contralateral) o a ambos ojos simultáneamente (bilateral). A) Dos ejemplos representativos de la respuesta de las NDM en las tres condiciones. Cada fila ilustra las respuestas de una única neurona. Similares respuestas fueron encontradas en otras 12 neuronas. B) Al analizar en forma conjunta los datos de los 14 experimentos, se comprobó que no existen diferencias significativas en los valores medios de las tres condiciones de estimulación ni en el número de potenciales de acción evocados, ni en el tamaño de los potenciales, ni en la magnitud máxima del PEPS.

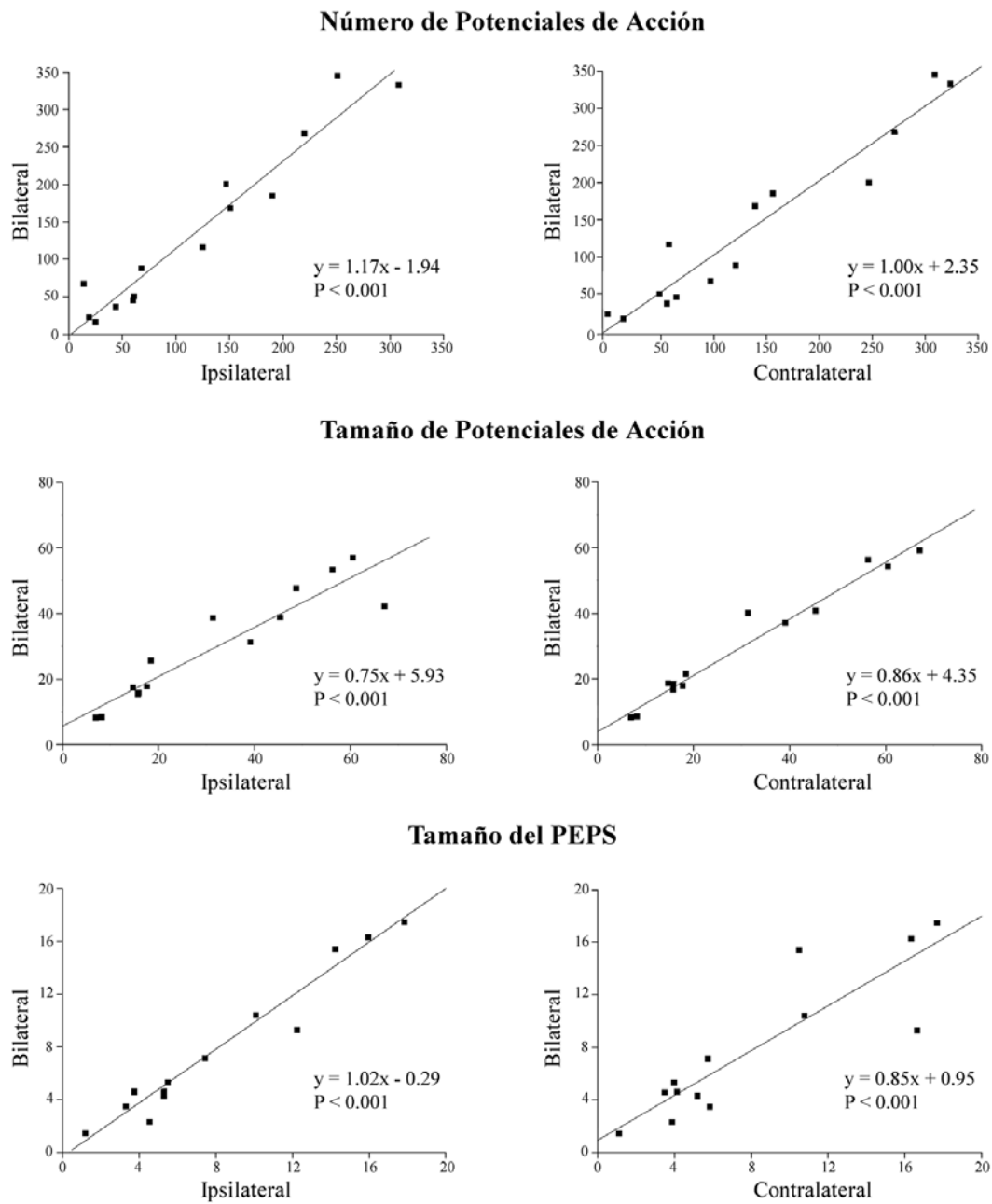


Figura 35: Análisis de correlación de las respuestas registradas en las NDM ante estimulación ipsilateral, contralateral y bilateral. Se midieron y compararon los siguientes parámetros de las respuestas: el número de potenciales de acción disparados durante la estimulación, el tamaño de los mismos y la depolarización máxima (PEPS) sobre la cual estaban montados estos potenciales. Panel izquierdo: se comparan las respuestas ipsilaterales con las bilaterales. Panel derecho: se comparan las respuestas contralaterales con las bilaterales. Los datos ajustan a regresiones lineales y en todos los casos estuvieron altamente correlacionados (ver valores en el texto).

Discusión:

Si bien ha sido reconocido tempranamente que el grupo de NDM de *Chasmagnathus* puede estar formado por diferentes subclases de células, todas comparten importantes características morfológicas y fisiológicas (Berón de Astrada y Tomsic, 2002; Tomsic y col., 2003). La capacidad de reaccionar a la estimulación visual binocular agrega una nueva distinción común a todo el grupo.

El experimento realizado en el capítulo 1 sugiere que la respuesta binocular de las NDM surge de la suma de las respuestas monoculares. No obstante, el experimento de estimulación bilateral del presente capítulo no permitió comprobar esa interpretación. Claramente, dentro de las condiciones experimentales utilizadas, la respuesta bilateral de las NDM no resulta de la sumación de las respuestas unilaterales. Este resultado, aunque no apoya la interpretación anterior, tampoco permite descartarla completamente. En efecto, al menos dos líneas argumentales podrían dar cuenta de esta situación. Por un lado, dada la gran intensidad con que cada EVP por separado estimula a las NDM, podría ser posible que la respuesta obtenida unilateralmente fuera cercana al valor máximo de la neurona. En tales condiciones, la hipotética sumación bilateral se vería enmascarada por un efecto de saturación. Sin embargo, de ser así deberíamos haber observado este mismo efecto en los resultados del capítulo 1. Por lo tanto, creemos que probablemente la diferencia en los resultados se debe a que la visión binocular (evaluada en el capítulo 1) no es equivalente a la condición de visión bilateral utilizada en el presente capítulo que, si bien resulta útil para indagar sobre la contribución relativa de cada ojo, de alguna forma es una condición poco natural. En efecto, los cangrejos poseen un campo amplio de superposición binocular y por lo tanto, el no ver los mismos estímulos con los dos ojos resulta poco frecuente. Además, parece intuitivo pensar que los campos receptivos de ambos ojos de una neurona binocular deben estar orientados para coleccionar información proveniente de un mismo sector del campo visual del animal, de tal manera que durante la visión binocular un objeto estimule de forma coherente los campos receptivos de los ojos izquierdo y derecho de la neurona. Por el contrario, en los experimentos de estimulación bilateral, las estimulaciones al ojo derecho e izquierdo, aún provocando respuestas neuronales que aparecen como muy semejantes, podrían contener información con algún grado de incoherencia debido a que son generadas por dos objetos distintos ubicados en sectores diferentes del campo

visual. En tales circunstancias, los componentes inhibitorios que se observan en algunas NDM cuando el EVP estimula cierta porción de su campo receptivo o cuando se mueve con determinada dirección (Berón de Astrada y Tomsic, 2002) podrían competir con los componentes excitatorios generados por el EVP que se encuentra estimulando el ojo opuesto, enmascarando de ese modo el efecto de sumación bilateral que podría operar en una verdadera condición de visión binocular. En definitiva, otros experimentos son necesarios para determinar si los resultados del capítulo 1 pueden ser interpretados en términos de una simple sumación de visiones monoculares.

Por otra parte, es necesario resaltar que los estímulos de movimiento que se utilizan en esta tesis consisten siempre en objetos que se presentan por sobre el cangrejo, es decir en la región visual que es utilizada para detectar la presencia de predadores aéreos. Como fue mencionado previamente, en muchos cangrejos los campos visuales de ambos ojos se superponen ampliamente brindando un área de visión binocular casi completa. Sin embargo, los estímulos visuales que se mueven en el plano azimutal al mismo nivel que el cangrejo (mayormente coespecíficos), son muy distintos a los que se mueven por encima (predadores). Por lo tanto, las necesidades de detección varían ampliamente entre las diferentes regiones del campo visual. Estas necesidades determinan la existencia de interneuronas visuales que actúen como filtros o detectores de características específicas (feature detectors) cuyas propiedades varíen de acuerdo al sector del campo visual hacia el que se orienten sus campos receptivos. Así, distintas propiedades pueden ser esperadas en neuronas binoculares que posean campos receptivos orientados hacia distintas regiones del panorama visual.

Como fue explicado anteriormente, las NDM del cangrejo arborizan en la lóbula y el protocerebro lateral y sus axones salen por el nervio óptico. Si bien realizamos numerosos intentos por develar la estructura completa de estas neuronas (utilizando Neurobiotina y dejando difundir el colorante por tiempos tan largos como 24 horas o realizando backfills desde el tracto protocerebral del pedúnculo con distintos colorantes), probablemente debido a la gran distancia existente entre el protocerebro lateral y el ganglio supraesofágico y al pronunciado afinamiento de los axones durante su proyección hacia el cerebro medio (ver Fig. 17F), dichos intentos han fallado en dilucidar la morfología de las NDM más allá del nervio óptico.

El patrón de ramificación de las NDM en la lóbula, con sus múltiples ramas atravesando de forma tangencial el arreglo retinotópico semeja la estructura de neuronas

colectoras. Por lo anterior, se pensaba que la entrada principal de información de las NDM provenía de elementos columnares ipsilaterales (Berón de Astrada y Tomsic, 2002). Sin embargo, ahora sabemos que reciben también información del ojo contralateral y que esta información parece ser tan completa como la que ingresa por el lado ipsilateral. Además cierta proporción de las NDM también responde a la estimulación mecánica indicando que estas neuronas reciben información de otras fuentes.

Para que exista una respuesta al movimiento es necesaria una computación local de los cambios temporales y espaciales en la intensidad de la luz producidos por la imagen en movimiento y una correlación cruzada de estos cambios entre unidades de muestreo (omatidias). Por lo tanto, las NDM reaccionarían a objetos en movimiento al procesar la información secuencial entregada por elementos columnares trabajando en paralelo (canales múltiples). Las respuestas obtenidas a partir de este complejo patrón de estimulaciones sinápticas no pueden ser reproducidas por una única entrada sináptica (canal único) que traiga la información del ojo contralateral. La semejanza observada entre las respuestas a estimulación ipsi y contralateral indica que cada NDM recibe señales presinápticas muy similares (en intensidad, distribución temporal y topografía) desde el ojo ipsilateral y contralateral. El hecho de que las respuestas a estimulación ipsi y contralateral muestren en ambos casos un componente de PEPS semejante y de considerable magnitud, indica que tanto las entradas sinápticas del camino ipsilateral como del contralateral se hallan cercanas a la zona de registro.

A partir de los antecedentes mencionados planteamos dos modelos alternativos de valor heurístico sobre la organización neuronal que subyace a la integración binocular en las NDM. Ambos modelos son compatibles con los resultados de las semejanzas (tamaño y número de potenciales de acción, tamaño del PEPS, etc.) así como con los de las diferencias (latencias) entre las respuestas a la estimulación ipsi y contralateral. Ambos modelos contemplan los datos neuroanatómicos discutidos en la primer sección.

En el primer modelo, los mismos elementos columnares (o equivalentes) que estimulan directamente las NDM del lado ipsilateral proyectarían y harían sinapsis en las NDM del ojo contralateral (Fig. 36A).

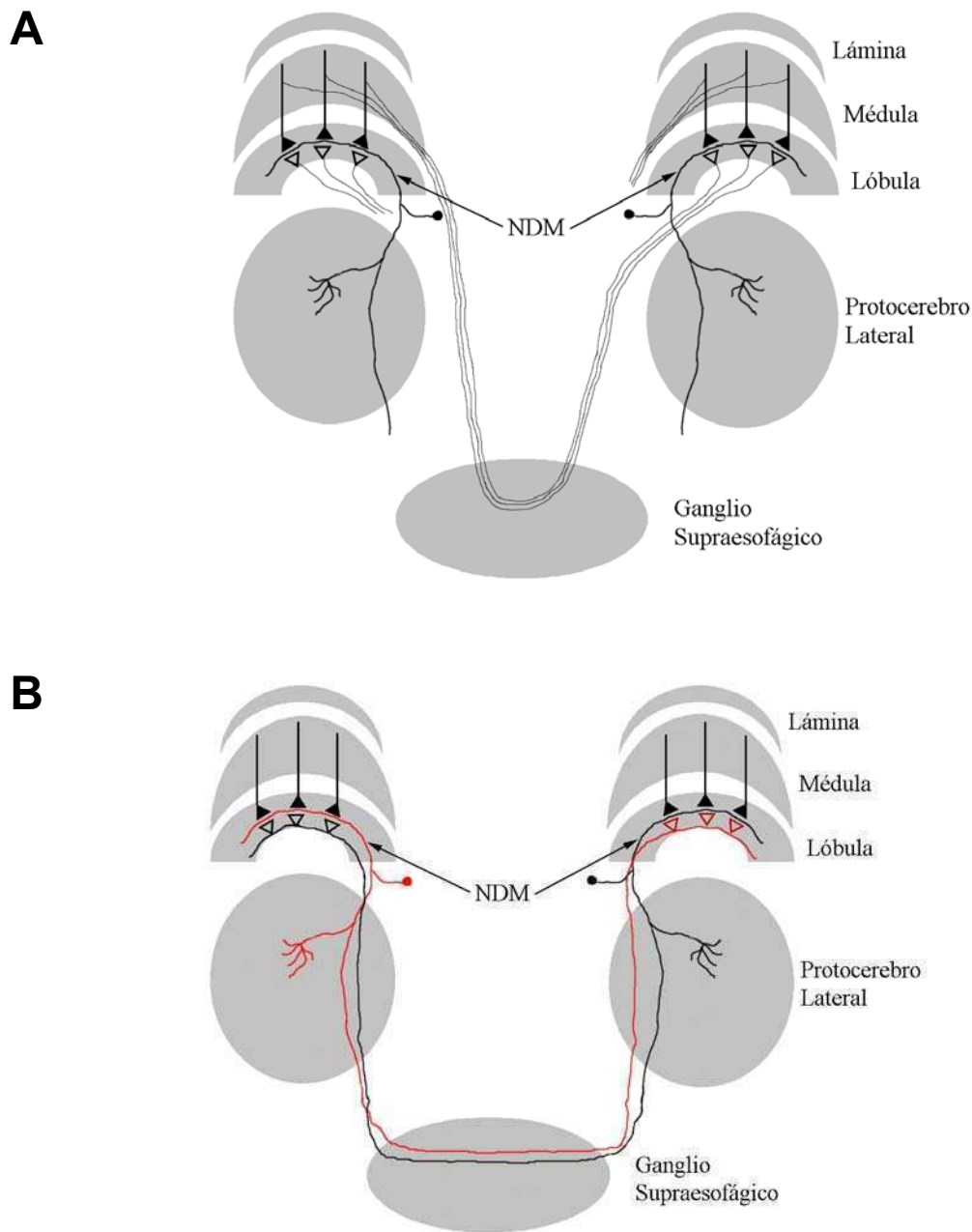


Figura 36: Dos modelos alternativos de valor heurístico sobre la organización neuronal que subyace a la integración binocular en las NDM. Ambos modelos son compatibles con los resultados de las semejanzas (tamaño y número de potenciales de acción, tamaño del PEPS, etc.) así como con los de las diferencias (latencias) entre las respuestas a la estimulación ipsi y contralateral. A) En el primer modelo, los mismos elementos columnares (o equivalentes) que estimulan directamente las NDM del lado ipsilateral proyectarían y harían sinapsis en las NDM del ojo contralateral. B) El segundo modelo contempla parejas de NDM simétricas que se conecten recíprocamente entre ambos ojos.

El segundo modelo contempla parejas de NDM simétricas que se conecten recíprocamente entre ambos ojos (Fig. 36B). En este caso la entrada sináptica ipsilateral, estaría determinada por la sumación espacial de las señales provenientes de neuronas columnares, mientras que la entrada sináptica contralateral resultaría de una sumación espacial de las descargas de las distintas sinapsis de su neurona simétrica. Este último modelo parece estar apoyado por recientes resultados de tinciones intracelulares en donde se han marcado NDM que poseen complejos patrones de ramificaciones en la lóbula con apariencia de terminales axónicas y que no poseen su soma en el pedúnculo teñido (Medan, comunicación personal).

Capítulo 4: Binocularidad, plasticidad y transferencia interocular

Como se mencionó previamente las Neuronas Detectoras de Movimiento modifican su actividad durante y luego de aprendizajes visuales y además reciben información binocular. A partir de esto, decidimos investigar si el fenómeno de plasticidad registrado en las NDM ocurría únicamente al estimular el ojo ipsilateral o si dicha plasticidad también podía ocurrir ante información entrando por el ojo contralateral. Más aún, investigamos si la memoria adquirida a través de la información recibida por un ojo, puede ser luego recobrada por la presentación del estímulo al otro ojo, es decir, si existe transferencia interocular.

Materiales y métodos:

En este capítulo se utilizaron los mismos EVP que en el capítulo 2 en la configuración 2 en la cual, como vimos en dicho capítulo, se da una generalización completa entre ambos estímulos. Separamos los campos visuales de los dos ojos utilizando un tabique (ver descripción en el capítulo 1). Realizamos registros intracelulares de NDM en el lóbulo óptico de uno de los ojos (el derecho, ojo ipsilateral) mientras los estímulos podían ser presentados separadamente tanto a dicho ojo como al ojo contralateral (ver Fig. 37). De esta manera la información ingresaba únicamente por el ojo donde se estaba realizando el registro o por el opuesto. Los protocolos de entrenamiento utilizados en este capítulo son similares a los explicados en el capítulo 2.

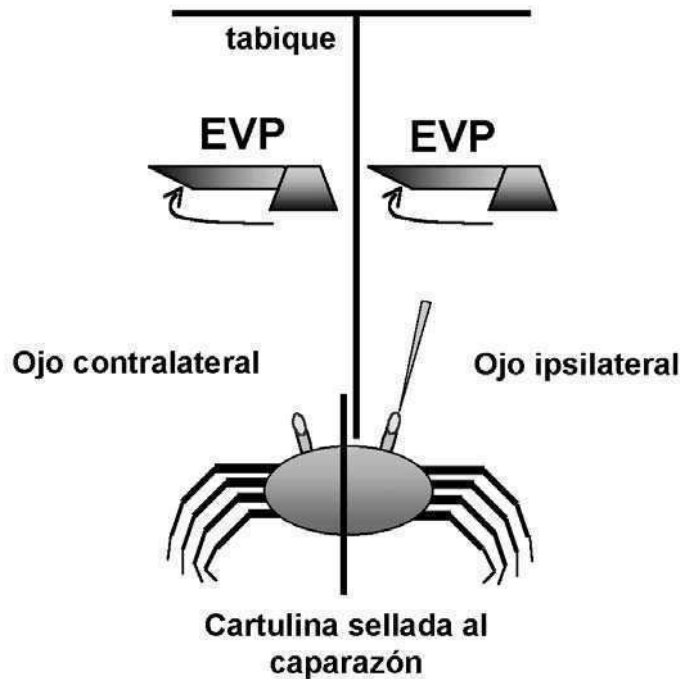
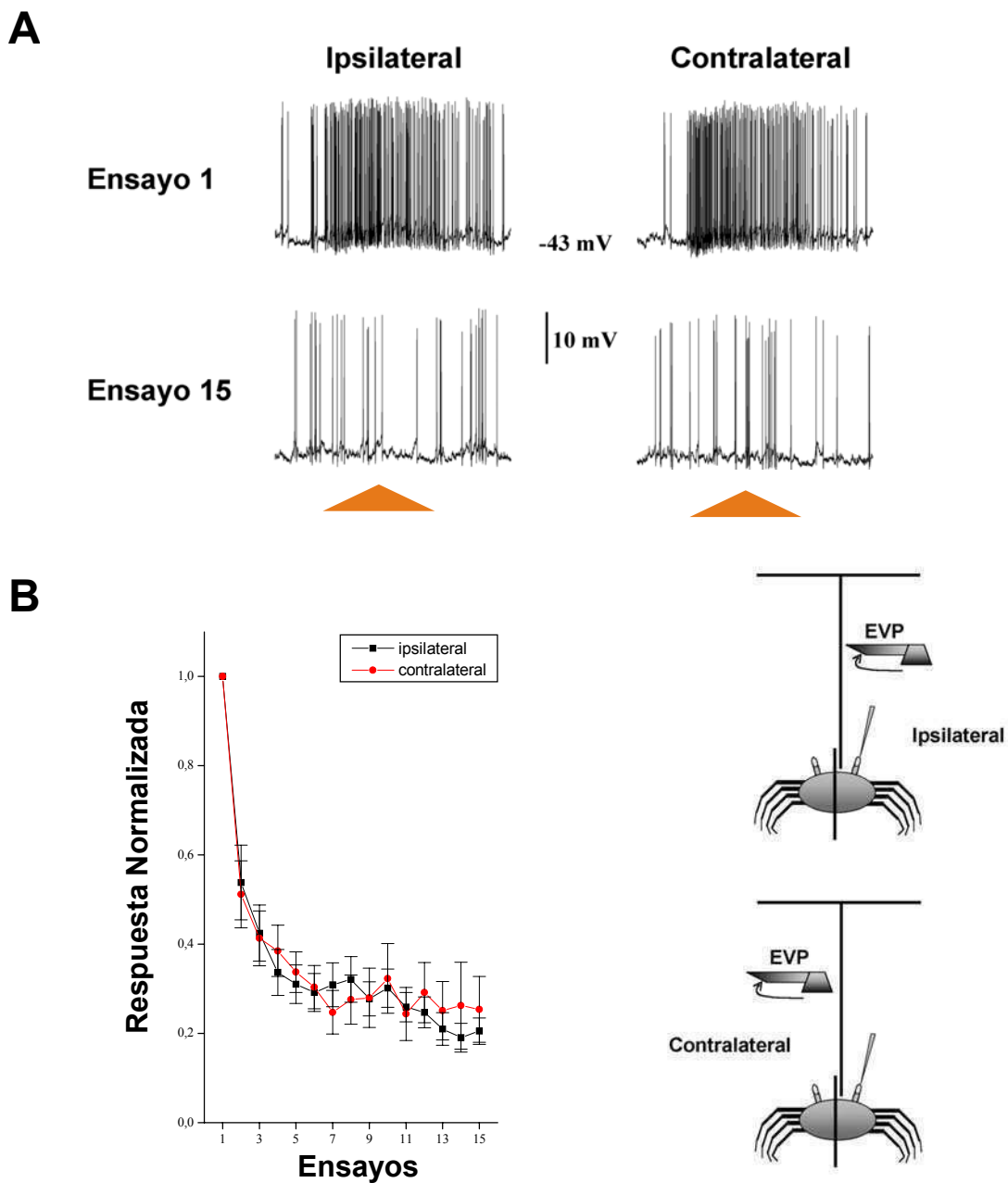


Figura 37: Esquema mostrando el dispositivo utilizado en los experimentos del presente capítulo. Separamos los campos visuales de los dos ojos utilizando un tabique semejante al utilizado en el capítulo 1. Los EVP se hallan dispuestos según la configuración 2 en la cual se da una generalización completa entre ambos estímulos. Realizamos registros intracelulares de NDM en el lóbulo óptico de uno de los ojos (el derecho, ojo ipsilateral) mientras los estímulos podían ser presentados separadamente a dicho ojo o al ojo contralateral.

Resultados:

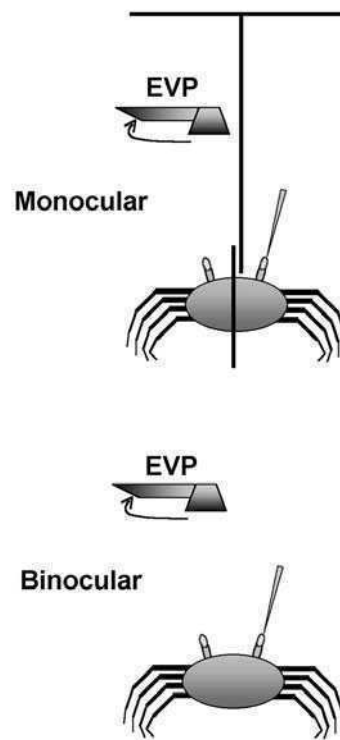
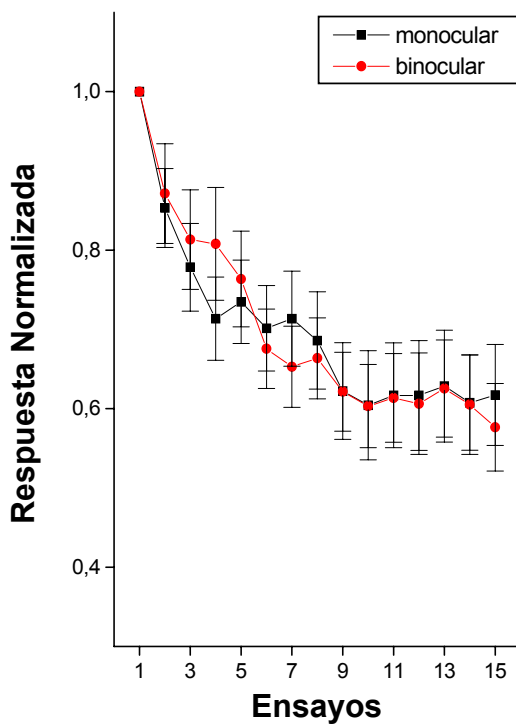
En un primer experimento comparamos las respuestas de las NDM ante entrenamientos masivos con el EVP ipsilateral o con el contralateral. Cada experimento comenzó con un entrenamiento de 15 ensayos con uno de los EVP y, 10 min luego de finalizado, se estimuló con la misma cantidad de ensayos el lado contrario. El orden en el cual los EVP fueron empleados fue elegido al azar en cada caso, quedando balanceados en el total de los experimentos. Nos basamos en estudios previos (Tomsic y col., 2003) para elegir un número de ensayos e intervalo entre entrenamientos tal que permitieran obtener una recuperación total de la respuesta luego del primer entrenamiento masivo. Dada la variabilidad en el número de potenciales de acción evocados por el EVP en diferentes NDM, las respuestas de cada neurona fueron

normalizadas al primer ensayo y estos valores fueron luego promediados entre unidades. La figura 38A ilustra un ejemplo de los resultados obtenidos en este experimento mientras que la figura 38B muestra el promedio de 14 experimentos similares. De este experimento se desprenden dos importantes resultados, primero, demuestra que la respuesta de una NDM registrada desde un ojo puede ser modificada por estimulación visual repetida al ojo contrario, segundo, la modificación parece ser equivalente ya que el perfil de cambio obtenido por estimulación ipsilateral o contralateral es idéntico.



Si en lugar de utilizar un entrenamiento masivo, se entrena en forma espaciada con el EVP ipsilateral o con el contralateral, se observan resultados equivalentes. A medida que se desarrolla el entrenamiento, se obtiene una similar reducción en la respuesta de las NDM independientemente de cual de los ojos está observando el EVP.

En el capítulo 1 observamos que la respuesta de las NDM ante estimulación monocular con el EVP era significativamente menor a la alcanzada cuando ambos ojos podían ver el estímulo. Por consiguiente, decidimos evaluar a continuación si los cambios inducidos en la respuesta de las NDM cuando los cangrejos recibían un entrenamiento espaciado en forma monocular eran similares a los inducidos ante un entrenamiento binocular. Dado que los niveles de respuesta iniciales provocados por ambas situaciones de estimulación son distintos, para poder comparar los cambios producidos a causa de la estimulación repetida, normalizamos los resultados obtenidos para cada neurona respecto a la respuesta del primer ensayo del entrenamiento. La figura 39 ilustra los resultados obtenidos. Observamos que el cambio producido en la respuesta de las NDM por estimulación monocular fue igual de efectivo que el provocado por un entrenamiento binocular.



La semejanza de los cambios inducidos en ambas condiciones puede implicar que el nivel de aprendizaje al que se llega luego de un entrenamiento monocular es básicamente el mismo que bajo un entrenamiento binocular. Ante esta hipótesis es válido preguntarse si la memoria adquirida a través del entrenamiento de un sólo ojo es transferida y por lo tanto puede ser recuperada al estimular el ojo naïve.

La transferencia interocular

Las características de respuesta de las NDM mencionadas en los capítulos anteriores, es decir, que sean completamente binoculares, que modifiquen su respuesta ante estimulación ipsi o contralateral y que luego del aprendizaje con el EVP en una cierta posición del espacio sean capaces de reflejar la generalización de esa memoria a otras posiciones del espacio, alientan la posibilidad de investigar a nivel fisiológico el fenómeno de transferencia interocular (TIO). En otras palabras, la preparación en el cangrejo posibilita medir la actividad de una NDM mientras el animal es entrenado con la presentación repetida del EVP a uno de los ojos para luego evaluar su respuesta al estimular el ojo opuesto y naïve.

Experimentos conductuales previos utilizando un entrenamiento espaciado con el EVP mostraron que *Chasmagnathus* no manifiesta transferencia interocular de esta memoria de largo término (Hermitte y col., 1995). Sin embargo, algunas explicaciones alternativas podrían dar cuenta del fallo para haber encontrado TIO en ese trabajo. Por ello y fundamentalmente debido a la extensa evidencia aportada en esta tesis sobre la existencia de una alta integración binocular en las NDM, es que decidimos investigar la posible existencia de TIO a nivel neuronal.

Para realizar este experimento utilizamos las mismas condiciones experimentales que en el apartado anterior. Si bien en la mayoría de las NDM, la respuesta inducida por la estimulación ipsi o contralateral es similar, existen variaciones en el número exacto de potenciales de acción disparados ante uno u otro estímulo en cada neurona. Por lo tanto para poder realizar una cuantificación más exacta del cambio en la respuesta de cada neurona, antes de comenzar cada entrenamiento se registró una respuesta a la estimulación de cada ojo (líneas de base, ver esquema fig. 25), las cuales son utilizadas posteriormente para normalizar las respuestas subsiguientes a cada estímulo. Diez minutos después de tomar las líneas de base se comenzó el

entrenamiento. El mismo constó de 15 presentaciones de un EVP estimulando a uno de los ojos y 3 min después se estimuló el ojo contrario con 1 ensayo con el otro EVP. En la mitad de los experimentos se entrenó primero el ojo ipsilateral y en la otra el contralateral. No se encontró ninguna evidencia de lateralidad en los resultados y por lo tanto éstos fueron agrupados ($n=20$). La figura 40 muestra los resultados obtenidos. Estos indican que, luego del entrenamiento, la respuesta se recupera totalmente al estimular el ojo no entrenado. En efecto, la comparación entre el ensayo de evaluación y el último de entrenamiento arroja diferencias altamente significativas ($p<0,001$), mientras que no existen diferencias entre el ensayo de evaluación y el primer ensayo de entrenamiento ($p>0,1$).

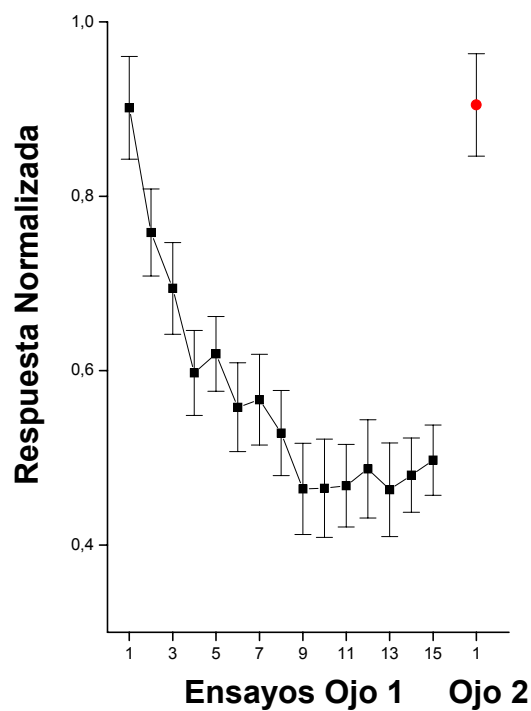


Figura 40: Estudio neurofisiológico de la transferencia interocular. El experimento constó de un entrenamiento de 15 ensayos espaciados con un EVP estimulando a uno de los ojos para 3 min después estimular al ojo contrario con 1 ensayo con el otro EVP. En la mitad de los experimentos se entrenó primero con el EVP ipsilateral y en la otra el contralateral. No se encontró ninguna evidencia de lateralidad en los resultados y por lo tanto éstos fueron agrupados ($n=20$). Las respuestas se hallan normalizadas respecto a líneas de base para los dos EVP que fueron tomadas para cada neuronas antes del entrenamiento. La respuesta se recupera totalmente al estimular el ojo no entrenado. La comparación entre el ensayo de evaluación y el último de entrenamiento arroja diferencias altamente significativas ($p<0,001$), mientras que no existen diferencias entre el ensayo de evaluación y el primer ensayo de entrenamiento ($p>0,1$).

Por lo tanto concluimos que no existe transferencia interocular de la reducción de la respuesta de las NDM.

Estos resultados son comparados en la figura 41 con los resultados conductuales obtenidos por Hermitte y col. (1995). La figura muestra las respuestas medias obtenidas durante la fase de evaluación (primer ensayo). El ensayo de evaluación consistió en aplicar el EVP al ojo previamente entrenado (**grupo igual**, n= 20) o al otro ojo (**grupo diferente**, n= 20). Las respuestas de estos grupos fueron comparadas con la respuesta monocular de animales no entrenados (**grupo control**, n= 20). La fase de evaluación en las NDM se realizó 3 min luego del entrenamiento. En el estudio comportamental de la TIO de Hermitte y col. (1995) la evaluación se realizó 24 hs luego del entrenamiento (n= 40 para cada columna).

El hecho de que los resultados neurofisiológicos estén una vez más en concordancia con los comportamentales, refuerza la convicción de que las NDM son elementos centrales en el control del comportamiento de los cangrejos ante estímulos visuales de peligro y de que participan de manera fundamental en los cambios de conducta determinados por el aprendizaje sobre el significado de esos estímulos.

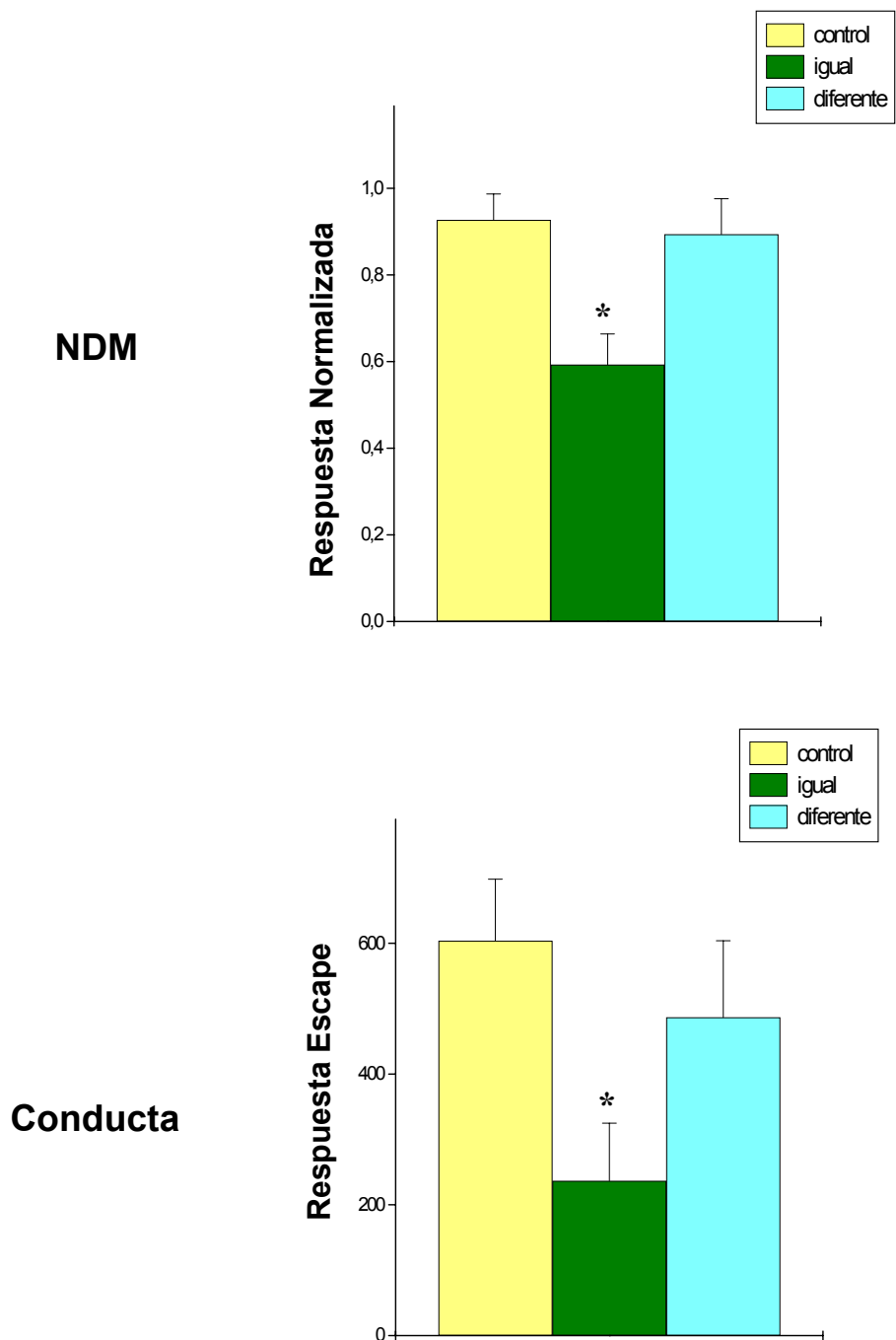


Figura 41: Respuesta de las NDM y de los animales durante el ensayo de evaluación para investigar la transferencia interocular. El ensayo de evaluación consistió en aplicar el EVP al ojo previamente entrenado (**grupo igual**, n= 20) o al otro ojo (**grupo diferente**, n= 20). Las respuestas de estos grupos fueron comparadas con la respuesta monocular de animales no entrenados (**grupo control**, n= 20). La evaluación en las NDM se realizó 3 min luego del entrenamiento. Los datos de comportamiento provienen de Hermitte y col. (1995) donde la evaluación se realizó 24 hs luego del entrenamiento (n= 40 para cada columna).

Discusión:

En este capítulo mostramos que las NDM modifican su respuesta durante el entrenamiento sin importar si éste es visto monocularmente por el ojo desde donde se realiza el registro o por el ojo opuesto. Además los cambios observados ante estas estimulaciones monoculares son similares a aquellos producidos por una estimulación binocular. No obstante ello, el entrenamiento a uno de los ojos fue incapaz de afectar la respuesta del ojo opuesto, es decir no fue observada transferencia interocular. Este resultado no puede ser explicado por el cambio en la posición del estímulo dado que en el capítulo 2 se demostró que dicho cambio es efectivamente generalizado.

Generalmente se considera que la TIO para alguna función ocurre cuando el sitio de dicha función se encuentra río abajo del lugar donde la información de los dos ojos es combinada. Por otro lado, la falta de TIO indica la presencia de cierta contribución de mecanismos monoculares periféricos a la convergencia binocular (Wehner y Müller, 1985). Nuestros resultados apoyan lo descrito por Hermitte y col. (1995) donde se mostraba que un cangrejo que observa el EVP con un ojo es incapaz de utilizar la información que fue adquirida y almacenada cuando el animal recibió entrenamiento con el otro ojo. Sabemos además que un cangrejo evaluado en forma monocular puede acceder a la información almacenada luego de un entrenamiento binocular (Hermitte y col., 1995). Estos hechos sugieren que durante un entrenamiento binocular, el cangrejo adquiere dos memorias idénticas e independientes, cada una pudiendo ser evocada solamente por el estímulo presentado al ojo correspondiente. Existirían entonces dos sistemas de almacenamiento simétricos cumpliendo el mismo rol y por lo tanto los mecanismos mnésicos serían redundantes.

Nuevamente es necesario resaltar que los estímulos de movimiento que se utilizaron en esta tesis consistieron siempre en objetos que representaban peligro y que se presentaban por sobre el cangrejo. Dado que la existencia de TIO puede depender de la tarea a desempeñar (Graves y Goodale, 1977; Ingle, 1965; Wehner y Müller, 1985), no podemos excluir la posibilidad de que al analizar otros aprendizajes o incluso al realizar entrenamientos con el EVP en otras regiones del espacio podamos encontrar TIO.

En cuanto a la fisiología neuronal, los experimentos de generalización sugieren que durante el entrenamiento se verifican cambios que se extienden más allá del área retinotópica originalmente estimulada. Es decir que probablemente los cambios inducidos en determinadas regiones del árbol dendrítico que colectan información retinotópica columnar, se extiendan a regiones aledañas. Por el otro lado, los experimentos de TIO sugieren que el entrenamiento monocular induce cambios específicos que afectan sólo a la vía previamente estimulada, es decir, serían sinapsis-específicos. Si bien, a primera vista ambos resultados podrían parecer contradictorios, se debe tener en cuenta que el amplio y complejo árbol dendrítico de las NDM podría dar lugar a ambos fenómenos. Por ejemplo, en una neurona biestratificada, los cambios producidos por el entrenamiento se podrían extender a lo largo de las diferentes ramas de uno de los estratos, dando lugar a la generalización del estímulo en el espacio, sin afectar las ramas dendríticas del otro estrato. Si la información proveniente de cada ojo llegara a un estrato distinto de la NDM, entonces ambos resultados podrían ser explicados. De ser así, se contaría con una situación atractiva para estudiar el fenómeno de especificidad sináptica del aprendizaje, el que, como comentáramos previamente, hasta el momento sólo ha podido ser analizado en modelos *in vitro*.

Si bien, los resultados del presente trabajo de tesis han permitido avanzar considerablemente el conocimiento que se tiene sobre el procesamiento binocular de información visual de los cangrejos decápodos, mucho más trabajo es necesario para precisar de que manera reciben la información binocular las grandes neuronas tangenciales de la lóbula.

Discusión

General

Las increíbles diferencias que existen entre el comportamiento humano y el de otros animales, la diversidad de danzas, la devoción hacia el arte culinario, toda la preocupación acerca de la moralidad, la compulsión hacia la creatividad, el interés por la introspección y la pasión por el pasado, han hecho creer a ciertos fisiólogos que, luego del estudio comparado del sistema nervioso, iban a aparecer diferencias que marcarían un evidente salto cualitativo en la dinámica del cerebro de los humanos con relación al de otros taxones. Sin embargo, a medida que avanza la neurociencia se descubre lo conservado que están, en el reino animal, la fisiología celular y los mecanismos moleculares del sistema nervioso (Bullock, 2003). Podría suponerse entonces que la razón que explica la habilidad creciente de los cerebros estaría en el incremento del número de neuronas que lo componen y no en las capacidades de funcionamiento *per se* de estas últimas. En efecto, entre los argumentos que se alzan para justificar el uso de los invertebrados como modelos de estudio de los mecanismos celulares de la memoria se esgrimen desde hace tiempo las semejanzas en la morfología y función que existen entre las neuronas de vertebrados e invertebrados (e.g. Kandel 1979). Creemos que la justificación de tales semejanzas, a veces repetida casi de manera dogmática, puede haber sido extrema. En efecto, aún cuando los mecanismos biofísicos que dan lugar a las propiedades eléctricas de las neuronas o los mecanismos moleculares que gobiernan los procesos de transmisión y plasticidad sináptica pueden encontrarse altamente conservados, las morfologías y las propiedades integrativas de las neuronas de vertebrados e invertebrados son claramente distintas. Vale pensar tan sólo en que las neuronas de los invertebrados son todas monopolares, hecho que determina que los fenómenos integrativos que llevan a la generación del potencial de acción tengan lugar en sitios muy alejados del cuerpo celular. Además, el enorme tamaño del árbol neurítico de muchas de estas células, el que puede a veces extenderse por todo el cerebro recibiendo y enviando información desde y hacia centros de procesamiento de diferentes modalidades, determina la existencia de más de un sitio de integración e inicio de los potenciales de acción (Combes y col., 1993; Meyrand y col., 1992). En definitiva, creemos que las importantes diferencias en la morfología y el modo de operar la información (en el sentido de unidad de procesamiento computacional) que distinguen a las neuronas de vertebrados e invertebrados, no han sido suficientemente reconocidas, posiblemente por haber quedado ensombrecidas a causa de las semejanzas halladas a nivel molecular.

Hasta hace no mucho tiempo se pensaba que los invertebrados se comportaban como seres autómatas bajo el control de programas sensomotores rígidos, con poca o nula capacidad de adaptación. Incluso algunas de estas conductas, no obstante, requieren de una importante capacidad de procesamiento de información y control. Así, no deja de sorprender que, por ejemplo, los movimientos coordinados de las siete articulaciones de cada una de las seis patas que dan lugar a la locomoción de un insecto cuyo tamaño puede no ser mayor a unos cientos de micrones, puedan ejecutarse desde un cerebro que no excede los cien micrones (el que, además, procesa información sensorial de varias modalidades y desde el que se controlan también todos los movimientos autonómicos, antenales, mandibulares, etc.). Este tipo de complejas conductas estereotipadas podrían corresponderse con el pequeño cerebro de estos animales sin necesidad de plantear la existencia de propiedades distintivas en sus neuronas. Sin embargo, los artrópodos no son sólo máquinas caminadoras automáticas. Muy por el contrario, son animales que activamente exploran diferentes ambientes, ganando experiencias que les permiten tomar decisiones y modificar sus conductas. La exploración de tales habilidades ha recibido particular atención durante los últimos años, a raíz de que se ha descubierto que algunos invertebrados (artrópodos en particular) poseen capacidades cognitivas que resultaban impensables en estos animales. Algunos ejemplos ilustrativos que fueron publicados en revistas de gran difusión son: la existencia de mapas cognitivos en hormigas (Collett y Collett, 2002; Collett y Graham, 2004; Harris y col., 2005), la estimación de la distancia entre objetos a partir de la combinación de información adquirida desde distintas modalidades sensoriales en cangrejos (Hemmi y Zeil, 2003; Zeil y col., 2006), la formación de imágenes de búsqueda a través de procesos de atención selectiva y el planeamiento anticipado de las acciones en estrategias de captura en arañas (Jackson y col., 2002a,b; Jackson y Lee, 2004; Cross y Jackson, 2005) y la existencia de conductas de defensa territorial que implican la toma criteriosa de decisiones en cangrejos (Backwell, 2004).

Aún cuando estas habilidades son obviamente insignificantes comparadas con las que poseen los humanos, no están tan alejadas de ciertas capacidades cognitivas que hasta el presente sólo habían sido efectivamente comprobadas en vertebrados con cerebros de mucho mayor tamaño como ratas y aves. Algunas de tales habilidades, como la posibilidad de transferir el concepto de igualdad o diferencia entre distintas modalidades sensoriales, sólo han sido halladas en insectos y primates (Giurfa y col., 2001). Aparece así la noción de que el tamaño cerebral no es un parámetro que se

corresponda fielmente con las capacidades cognitivas. En efecto, tal como las diferencias de capacidad intelectual entre humanos no se correlacionan con variaciones en el tamaño cerebral, el pequeño tamaño cerebral de los artrópodos tampoco parece limitar el desarrollo de algunas habilidades cognitivas. Considerando lo anterior, y teniendo en cuenta que los mecanismos moleculares involucrados en el funcionamiento neuronal y en los cambios de eficiencia sináptica (plasticidad) parecen encontrarse evolutivamente muy conservados, es justificado preguntarse ¿cuáles son y dónde radican las propiedades del cerebro de los artrópodos que les confieren a estos animales las complejas funciones cognitivas de que son capaces?

Al comienzo de esta tesis planteamos una hipótesis de índole evolutiva proponiendo que “ La estrategia de optimización de los recursos neuronales del cerebro de los artrópodos se ha diferenciado de aquella seguida en los vertebrados. En los artrópodos cada célula nerviosa central integraría y procesaría individualmente mayor diversidad (y tal vez cantidad) de información. Esto posibilitaría que, con un número comparativamente pequeño de neuronas, los minicerebros de los artrópodos sean capaces de sostener habilidades cognitivas que parecerían corresponderse con un cerebro mayor”. Por tratarse de una hipótesis de carácter evolutivo, ésta no puede ser contrastada únicamente durante el desarrollo de una tesis doctoral. Una eventual comprobación podría sobrevenir sólo después de un largo y sostenido esfuerzo analizando una amplia variedad de especies que representen a los grupos taxonómicos relevantes en la evolución del linaje Artrópoda. De todas formas, numerosos resultados obtenidos en el presente trabajo estudiando las Neuronas Detectoras de Movimiento de *Chasmagnathus* apoyan la hipótesis enunciada.

Por ejemplo, la idea anterior implica una optimización de recursos que es compatible con una centralización importante de la integración en pocos elementos. Hemos descrito aquí que uno de los subgrupos que componen las NDM del cangrejo, el grupo de las M-NDM, está formado únicamente por 14 neuronas en cada lóbulo óptico. Aunque no sabemos cuántas neuronas componen las B-NDM, su amplio árbol dendrítico, que cubre prácticamente en toda su extensión dos estratos de la lóbula, hace pensar que este grupo también estaría integrado por un número relativamente pequeño de elementos.

Resultados anteriores de nuestro grupo de trabajo muestran que las NDM reciben información multimodal. Muchas NDM, además de responder a estímulos visuales, responden también a estímulos mecánicos (Berón de Astrada y Tomsic, 2002), integran información binocular y reflejan de manera notable distintos aspectos de la respuesta de escape de los cangrejos ante estímulos visuales de peligro. Además, las NDM han probado ser elementos centrales a la formación de memorias visuales de corto y largo término (Tomsic y col., 2003; Berón de Astrada, 2005). En el presente trabajo encontramos nuevas correlaciones entre la RE y la respuesta de las NDM evocada ante el movimiento de un EVP. Observamos, en ambos niveles, similares cambios estacionales, modificaciones en la respuesta ante la percepción monocular o binocular del estímulo y variaciones en el nivel de la respuesta según la intensidad del estímulo.

Un resultado destacado de esta tesis es que pudimos evaluar por primera vez aspectos complejos de la conducta, como la generalización entre estímulos y la transferencia interocular, en neuronas individuales registradas en un animal mientras aprende. Así probamos que estas neuronas poseen la capacidad de mediar formas simples de generalización. Esto nos indica que la detección del EVP en las NDM no se basa en un simple reconocimiento retinotópico, sino que en estas neuronas debe ocurrir un fenómeno de plasticidad tal que permita el reconocimiento del estímulo en otras regiones del espacio. Vemos, en definitiva, que estos elementos están procesando información muy variada y central para el animal.

Los experimentos de generalización sugieren que durante el entrenamiento se verifican cambios que se extienden más allá del área originalmente estimulada. Por lo tanto, los cambios inducidos en determinadas regiones del árbol dendrítico que colectan información retinotópica columnar parecen extenderse a regiones aledañas. Por otro lado, los experimentos de transferencia interocular sugieren que el entrenamiento monocular induce cambios específicos que afectan sólo a la vía previamente estimulada, es decir, podrían ser sinapsis-específicos. En base a estos resultados planteamos que el amplio y complejo árbol dendrítico de las NDM podría dar lugar a ambos fenómenos al poseer zonas relativamente independientes donde se procesa la información proveniente de las distintas vías. La existencia de microdominios funcionales en las enormes neuronas de artrópodos también se encuentra apoyada por el hecho de que se han encontrado en moscas cambios específicos inducidos por un

aprendizaje asociativo (formación del trazo mnésico) en únicamente una de las dos ramas neuríticas de una neurona (Yu y col., 2005). En el caso de *Chasmagnathus*, considerando como ejemplo una NDM biestratificada, los cambios producidos por el entrenamiento se podrían extender a lo largo de las diferentes ramas de uno de los estratos, dando lugar a la generalización del estímulo en el espacio, sin afectar las ramas dendríticas del otro estrato en las cuales se procesarían las señales provenientes del otro ojo. De esta manera, demostramos nuevamente que estas neuronas gigantes pueden integrar información de notable complejidad y que su estructura les permitiría jugar distintos roles en los diferentes aspectos del aprendizaje.

Acerca de la modularidad en el cerebro de los crustáceos, los resultados obtenidos con los experimentos de generalización indican que por lo menos la información acerca del estímulo y los datos necesarios para reconocer a dicho estímulo en otra posición del espacio pueden ser procesados en un mismo módulo cerebral (i.e. las NDM). Por supuesto, no podemos decir, sólo tomando en cuenta este resultado, que no existe una organización modular en estos cerebros. Para completar esta investigación es necesario extender el estudio de estas neuronas en relación a otras tareas. Como antecedente, se ha documentado en muchos casos que la información sobre el contexto es procesada independientemente de la información del estímulo propiamente dicho (Liu y col., 1999; Mizunami y col., 1998; Menzel, 2001). Por lo tanto, y dado que la presentación repetida del EVP en forma espaciada genera una memoria asociativa contexto-dependiente, actualmente estamos tratando de evaluar si la información sobre el contexto está confluyendo también hacia las NDM o si es procesada en un módulo independiente del sistema nervioso. Así, esperamos seguir avanzando en la comprensión de cómo y dónde es procesada y almacenada la información en estos notablemente complejos pequeños cerebros.

Bibliografia

_Backwell P.R.Y., Jennions M.D. Animal behaviour: Coalition among male fiddler crabs *Nature* 430: 417 (2004)

_Berón de Astrada M., Sztarker J., Tomsic D. Visual interneurons of the crab *Chasmagnathus* studied by intracellular recordings *in vivo*. *J Comp Physiol A* 187: 37-44 (2001)

_Berón de Astrada M., Tomsic D. Physiology and morphology of visual movement detector neurons in a crab (Decapoda: Brachyura). *J Comp Physiol A* 188: 539-551 (2002)

_Berón de Astrada M. Caracterización de interneuronas visuales y su relación con el aprendizaje en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires (2005)

_Bodian D. A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. *Anat Rec* 69: 153-162 (1937)

_Borst A, Egelhaaf M. Principles of visual motion detection. *Trends Neurosci* 12: 297-306 (1989)

_Borst A., Haag J. Neural networks in the cockpit of the fly. *J Comp Physiol A* 188: 419-437 (2002)

_Bullock T.H. Have brain dynamics evolved? Should we look for unique dynamics in the sapient species? *Neural Comput* 9: 2013-27 (2003)

_Buschbeck E.K., Strausfeld N.J. The relevance of neural architecture to visual performance: phylogenetic conservation and variation in dipteran visual systems. *J Comp Neurol* 383: 282-304 (1997)

_Carew T.J. Behavioral Neurobiology: The cellular organization of natural behavior. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts (2000)

_Collett T.S., Collett M. Memory use in insect visual navigation. *Nat Rev Neurosci* 7: 542-552 (2002)

_Collett T.S., Graham P. Animal navigation: path integration, visual landmarks and cognitive maps. *Curr Biol* 14: 475-477 (2004)

_Coltheart M. Modularity and cognition. *Trends Cognit Sci* 3: 115-120 (1999)

_Combes D., Simmers J., Nonnot L., Moulin M. Tetrodotoxin-sensitive dendritic spiking and control of axonal firing in a lobster mechanoreceptor neuron. *J Physiol (Lond)* 460: 581-602 (1993)

_Cross F.R., Jackson R.R. Spider heuristics. *Behav Processes* 69: 125-127 (2005)

_Dircksen H., Skiebe P., Abel B., Agricola H., Buchner K., Muren J.E., Nässel D.R. Structure, distribution, and biological activity of novel members of the allatostatin family in the crayfish *Orconectes limosus*. *Peptides*. 20: 695-712 (1999)

_Edwards D.H., Heitler W.J., Krasne F.B. Fifty years of a command neuron: the neurobiology of escape behavior in the crayfish. *Trends Neurosci* 4: 153-161 (1999)

_Egelhaaf M., Borst A., Warzecha A.K., Flecks S., Wildemann A. Neural circuit tuning fly visual neurons to motion of small objects II. Input organization of inhibitory circuit elements revealed by electrophysiological and optical recording techniques. *J Neurophysiol* 69: 340-351 (1993)

_Elofsson R., Hagberg M. Evolutionary aspects of the construction of the first optic neuropil (lamina) ganglionaris in Crustacea. *Zoo-Morphology* 106: 174-178 (1986)

_Ewert J.P. Neuroethology: An introduction to the neurophysiological fundamentals of behavior. Springer-Verlag (1980)

_Ewert J.P. Neural correlates of key stimulus and releasing mechanism: a case study and two concepts. *Trends Neurosci* 230: 332-339 (1997)

_Freudenthal R., Locatelli F., Hermitte G., Maldonado H., Delorenzi A., Romano A. Kappa-B like DNA binding activity is enhanced after spaced training that induces long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neurosci Lett* 242: 143-146 (1998)

_Gauck V., Egelhaaf M., Borst A. Synapse Distribution on VCH, an Inhibitory, Motion-Sensitive Interneuron in the Fly Visual System. *J Comp Neurol* 381: 489-499 (1997)

_Gauck V., Borst A. Spatial response properties of contralateral inhibited lobula plate tangential cells in the fly visual system. *J Comp Neurol* 406: 51-71 (1999)

_Giurfa M., Eichmann B., Menzel R. Symmetry perception in an insect. *Nature* 382: 458-461 (1996)

_Giurfa M., Zhang S., Jenett A., Menzel R., Srinivasan M.V. The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect. *Nature* 410: 930-933 (2001)

_Glantz R.M. The visually evoked defense reflex of the crayfish: habituation, facilitation, and the influence of picrotoxin. *J Neurobiology* 5: 263-280 (1974a)

_Glantz R.M. Habituation of the motion detectors of the crayfish optic nerve: their relationship to the visually evoked defense reflex.. *J Neurobiology* 5: 489-510 (1974b)

_Glantz R.M. Directional selectivity in nonspiking interneurons of the crayfish optic lobe: evaluation of a linear model. *J Neurophysiol* 72: 180-193 (1994)

_Glantz R.M. Polarization sensitivity in the crayfish optic lobe: peripheral contributions to opponency and directionally selective motion detection. *J Neurophysiol* 76: 3304-3414 (1996)

_Glantz R.M. Directionality and inhibition in crayfish tangential cells. *J Neurophysiol* 79: 1157-1166 (1998)

_Glantz R.M., Kirk M., Viancour T. Interneurons of the crayfish brain: the relationship between dendrite location and afferent input. *J Neurobiol* 12: 311-328 (1981)

_Glantz R.M., McIsaac A. Two-channel polarization analyzer in the sustaining fiber-dimming fiber ensemble of crayfish visual system. *J Neurophysiol* 80: 2571-83 (1998)

_Glantz R.M., Miller C.S. Signal processing in the crayfish optic lobe: contrast, motion and polarization vision. In: Wiese K editor. *The crustacean nervous system*. Berlin: Springer-Verlag. p 486-498 (2002)

_Glantz R.M., Miller C.S., Nässel D.R. Tachykinin-related peptide and GABA-mediated presynaptic inhibition of crayfish photoreceptors. *J Neurosci* 20: 1780-1790 (2000)

_Goldsmith T.H. The spectral absorption of crayfish rhabdoms: pigment, photoproduct and pH sensitivity. *Vision Res* 18: 463-473 (1978)

_Graves J.A., Goodale M.A. Failure of interocular transfer in the pigeon (*Columbia livia*). *Physiol Behav* 19: 425-428 (1977)

_Groves P.M., Lee D., Thompson R.F. Effects of stimulus frequency and intensity on habituation and sensitization in acute spinal cat. *Physiol & Behav* 4: 383-388 (1969)

_Hafner G.S. The neural organization of the lamina ganglionaris in the crayfish: a Golgi and EM study. *J Comp Neurol* 152:255-280 (1973)

_Hafner G.S. The ultrastructure of retinula cell endings in the compound eye of the crayfish. *J Neurocytol* 3:295-311 (1974)

_Hanström B. *Vergleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere*. Berlin: Springer-Verlag; pp 1-624 (1928)

_Harris R.A., Hempel de Ibarra N., Graham P., Collett T.S. Ant navigation: priming of visual route memories. *Nature* 438: 302 (2005)

_Harzsch S. The phylogenetic significance of crustacean optic neuropils and chiasmata: a re-examination. *J Comp Neurol* 453:10-21 (2002)

_Hausen K. The lobula complex of the fly: Structure, function and significance in visual behavior. In: Ali MA, editor. *Photoreception and vision in invertebrates*. New York: Plenum Press; pp 523-599 (1984)

_Hemmi J.M., Zeil J. Robust judgement of inter-object distance by an arthropod. *Nature* 421: 160-163 (2003)

_Hermitte G., Aggio J.y Maldonado H. Failure of interocular transfer in two types of learning in the crab *Chasmagnathus*. *J Comp Physiol A* 177: 371-378 (1995)

_Hermitte G., Pedreira E., Tomsic D. and Maldonado H. Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long-term habituation after spaced, but not massed training in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiology of Learning and Memory* 71: 34-49 (1999)

_Hintzman D.L. Theoretical implications of the spacing effect. In R. L. Solso (Ed.), *Theories in cognitive psychology: The Loyola Symposium*. Hillsdale, NJ: Erlbaum; pp 77-99 (1974)

_Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol (Lond.)* 116: 449-472 (1952a)

_Hodgkin, A.L., Huxley, A F. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol (Lond.)* 116: 473-496 (1952b)

_Hubel D.H., Wiesel T.N. Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *J Physiol* 148: 574-591 (1959)

_Hubel D.H., Wiesel T.N. Stereoscopic vision in macaque monkey. *Nature* 225: 41-42 (1970)

_Ingle J.D. Interocular transfer in goldfish: Color easier than pattern. *Science* 149: 1000-1002 (1965)

_Jackson R.R., Li D. One-encounter search-image formation by araneophagic spiders. *Anim Cogn* 4: 247-54 (2004)

_Jackson R.R., Pollard S.D. Predatory behavior of jumping spiders. *Annu Rev Entomol.* 41: 287-308 (1996)

_Jackson R.R., Pollard S.D., Cerveira C.M. Opportunistic use of cognitive smokescreens by araneophagic jumping spiders. *Anim Cogn* 3: 147-57 (2002a)

_Jackson R.R., Pollard S.D., Li D., Fijn N. Interpopulation variation in the risk-related decisions of *Portia labiata*, an araneophagic jumping spider (Araneae, Salticidae), during predatory sequences with spitting spiders. *Anim Cogn* 4: 215-223 (2002b)

_Kandel, E. Small systems of neurons. *Sci. Amer* 241: 66-76 (1979)

_Kandel E.R. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci Rep* 5:565-611 (2001)

_Kennedy D., Bruno M.S. The spectral sensitivity of crayfish and lobster vision. *J Gen. Physiol.* 44:1089-1102 (1961)

_Kirk M.D., Waldrop B., Glantz R.M. The crayfish sustaining fibers. I. Morphological representation of visual receptive fields in the second optic neuropil. *J Comp Physiol* 146: 419-425 (1982)

_Kirk M.D., Waldrop B., Glantz R.M. A quantitative correlation of contour sensitivity with dendritic density in an identified visual neuron. *Brian Res* 274: 231-237 (1983a)

_Kirk M.D., Waldrop B., Glantz R.M. The crayfish sustaining fibers. II. Response to illumination, membrane properties and adaptation. *J Comp Physiol* 150: 175-179 (1983b)

_Kleinlogel S., Marshall N.J., Horwood J.M., Land M.F. Neuroarchitecture of the color and polarization vision system of the stomatopod *Haptosquilla*. *J Comp Neurol* 467: 326-342 (2003)

_Kuffler S.W. y Nicholls J.G. *From Neuron to Brain: A Cellular approach to the function of the nervous system*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts (1976)

_Layne J., Land M., Zeil J. Fiddler crabs use the visual horizon to distinguish predators from conspecifics: A review of the evidence. *J mar Biol Ass UK* 77: 43-54 (1997)

_Leslie, A.M. Autism and the 'Theory of Mind' module. *Curr Dir Psychol Sci* 1: 18-21 (1992)

_Liu L., Wolf R., Ernst R, Heisenberg M. Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. *Nature* 400: 753-756 (1999)

_Lozada M., Romano A., Maldonado H. Long term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiology & Behavior*. 47: 35-41 (1990)

_Maldonado H. Crustaceans as models to investigate memory illustrated by extensive behavioral and physiological studies in *Chasmagnathus*. In: Wiese K editor. *The crustacean nervous system*. Berlin: Springer-Verlag. p 314-327 (2002)

_Maldonado H., Romano A.G., Lozada M. Opioid action on response level to a danger stimulus in the crab (*Chasmagnathus granulatus*). *Behav Neurosc* 103: 1139-1143 (1989)

_McKinzie M.E., Benton J.B, Beltz B., Mellon DeF. Parasol cells of the hemiellipsoid body in the crayfish *Procambarus clarkii*: dendritic branching patterns and functional implications. *J Comp Neurol* 462: 168-179 (2003)

_Medan V., Oliva D., Tomsic D. Preferences for direction of movement on visual neurons of a crab. *Soc Neuroethol Abstr* 7: 142 (2004)

_Menzel R. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem* 8: 53-62 (2001)

_Menzel R., Giurfa M. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends Cognit Sci* 5: 62-71 (2001)

_Menzel R., Manz G., Menzel R., Greggers U. Massed and Spaced Learning in Honeybees: The Role of CS, US, the Intertrial Interval, and the Test Interval. *Learn Mem* 8: 198-208 (2001)

_Meyrand P., Weimann J.M., Marder E. Multiple axonal spike initiation zones in a motor neuron: serotonin activation. *J Neurosci* 12: 2803–2812 (1992)

_Mizunami M., Weibrecht J.M., Strausfeld N.J. Mushroom bodies of the cockroach: their participation in place memory. *J Comp Neurol* 402: 520–537 (1998)

_Nässel D.R. The organization of the lamina ganglionaris of the prawn, *Pandalus borealis* (Kroyer). *Cell Tissue Res* 163: 445-464 (1975)

_Nässel D.R. Types and arrangements of neurons in the crayfish optic lamina. *Cell Tissue Res* 179: 45-75 (1977)

_Nässel D.R., Elofsson R., Odselius R. Neuronal connectivity patterns in the compound eyes of *Artemia salina* and *Daphnia magna* (Crustacea: Branchiopoda). *Cell Tissue Res* 190: 435-437 (1978)

_O'Carroll D. Feature-detecting neurons in dragonflies. *Nature* 362: 541-543 (1993)

_Osorio D., Bacon J.P. A good eye for arthropod evolution. *Bioassays* 16: 419-424 (1994)

_Pedreira E., Dimant B., Maldonado H. Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav.* 54: 611-617 (1996)

_Pedreira E., Dimant B., Tomsic D., Quesada-Allue L., Maldonado H. Inhibition of protein synthesis by cycloheximide affects context memory and long term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav* 52: 285-295 (1995)

_Pedreira M.E., Maldonado H. Protein Synthesis Subverts Reconsolidation or Extinction Depending on Reminder Duration. *Neuron* 38: 863-869 (2003)

_Pedreira M.E., Romano A., Tomsic D., Lozada M., Maldonado H. Massed and spaced training built up different components of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Animal Learning and Behavior*. Vol. 26: 34-45 (1998)

_Peretz I., Coltheart M. Modularity of music processing. *Nat Neurosci* 7: 688-91 (2003)

_Pereyra P., De La Iglesia, H., Maldonado H. Training to testing intervals different from 24 hours impair habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Physiology & Behavior*. 59: 19-25 (1996)

_Pereyra P., Saraco M., Maldonado H. Decreased response or alternative defensive strategies in escape: two different types of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *J Comp Physiol* 184: 301-310 (1999)

_Pfeiffer C., Glantz R.M. Cholinergic synapses and the organization of contrast detection in the crayfish optic lobe. *J Neurosci* 9: 1872-1882 (1989)

_Pfeiffer-Linn C., Glantz R.M. GABA-mediated inhibition of visual interneurons in the crayfish medulla. *J Comp Physiol* 168: 373-381 (1991)

_Rind F.C., Simmons P.J. Seeing what is coming: building collision-sensitive neurons. *Trends Neurosci* 22: 215-220 (1999)

_Romano A., Delorenzi A., Pedreira M.E., Tomsic D., Maldonado H. Acute administration of a permeant analog of cAMP and phosphodiesterase inhibitor improve long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Behav Brain Res* 75: 119-125 (1996)

_Romano A., Lozada M., Maldonado H. Nonhabituation processes affect stimulus specificity of response habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Behav Neurosci* 105: 542-552 (1991)

_Rosas C., Sanchez A., Escobar E., Soto L., Bolongaro-Crevenna A. Daily variations of oxygen consumption and glucose hemolymph level related to morphophysiological and ecological adaptations of crustacea. *Comp Biochem Physiol* 101A: 323-328 (1992)

_Sandeman D.C., Sandeman R., Derby C., Schmidt M. Morphology of the brain of crayfish, crabs and spiny lobsters: a common nomenclature for homologous structures. *Biol Bull* 183: 304-326 (1992)

_Sinakevitch I., Douglass J.K., Scholtz G., Loeser R., Strausfeld N.J. Conserved and convergent organization in the optic lobes of insects and isopods, with reference to other crustacean taxa. *J Comp Neurol* 467: 150-72 (2003)

_Somlyo A.V., Walz B. Ca^{2+} in visual transduction and adaptation in vertebrates and invertebrates. *Cell Calcium* 18: 253-255 (1995)

_Stach S., Giurfa M. The influence of training length on generalization of visual feature assemblies in honeybees. *Behav Brain Res* 161: 8-17 (2005)

_Stowe S. The retina-lamina projection in the crab *Leptograpsus variegatus*. *Cell Tiss Res* 185: 515-525 (1977)

_Stowe S., Ribi W.A., Sandeman D.C. The organization of the lamina ganglionaris of the crabs *Scylla serrata* and *Leptograpsus variegatus*. *Cell Tissue Res* 178: 517-532 (1977)

_Strausfeld N.J. Crustacean – insect relationships: the use of brain characters to derive phylogeny amongst segmented invertebrates. *Brain Behav and Evolut* 52: 186-206 (1998)

_Strausfeld N.J. Evolution of Crustacean Optic Lobes and Origins of Chiasmata. *Arthr Struct Dev* (enviado) (2005)

_Strausfeld N.J., Nässel D.R. Neuroarchitecture of brain regions that subserve the compound eyes of crustacea and insect. In Autrum (ed): Handbook of sensory Physiology, VII/6B. Vision in invertebrates. Berlin: Springer Verlag; pp: 1-32 (1980)

_Sztarker J. Interneuronas monoculares y binoculares: indicios funcionales de la organización circuital del sistema visual en el cangrejo *Chasmagnathus*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires (2000)

_Sztarker J, Tomsic D. Binocular Visual Integration in the Crustacean Nervous System. *J Comp Physiol A* 190: 951-962 (2004)

_Tomsic D., Berón de Astrada M., Sztarker J. Identification of individual neurons reflecting short- and long-term visual memory in an arthropod. *J Neurosci* 23: 8539-8546 (2003)

_Tomsic D., Dimant B. Maldonado H. Age related deficits of long-term memory in *Chasmagnathus*. *J Comp Physiol A* 178: 139-146 (1996)

_Tomsic D., Maldonado H. Central effect of morphine pretreatment on short- and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav* 36: 787-93 (1990)

_Tomsic D., Maldonado H. and Rakitin A. Morphine and GABA: effects on perception, escape response and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Research Bulletin*. 26: 699-716 (1991)

_Tomsic D., Massoni V., Maldonado H. Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs. Ontogenic, ecological and opioid correlates. *J Comp Physiol A* 173: 621-633 (1993)

_Tomsic D., Pedreira M.E., Romano A., Hermitte G., Maldonado H. Context-US association as a determinant of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Ani Learn Behav* 26: 196-209 (1998)

_Tully T., Preat T., Boynton S.C., Del Vecchio M. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79: 35-47 (1994)

_Valeggia C., Fernandez-Duque E., Maldonado H. Danger stimulus-induced analgesia in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Brain Research* 481: 304-308 (1989)

_Waldrop B., Glantz R. Nonspiking local interneurons mediate surround inhibition of crayfish sustaining fibers. *J Comp Physiol* 156: 763-774 (1985)

_Wang-Bennett L.T., Glantz R.M. The functional organization of the crayfish lamina ganglionaris. I. Nonspiking monopolar neurons. *J Comp Physiol* 161: 131-145 (1987a)

_Wang-Bennett L.T., Glantz R.M. The functional organization of the crayfish lamina ganglionaris. II. Large field spiking and nonspiking cells. *J Comp Physiol* 161: 147-160 (1987b)

_Wang-Bennett L.T., Pfeiffer C., Arnold J., Glantz R.M.. Acetylcholine in the crayfish optic lobe: concentration profile and cellular localization. *J Neurosci* 9: 1864-1871 (1989)

_Wehner R., Müller M. Does interocular transfer occur in visual navigation by ants? *Nature*, 315: 228-229 (1985)

_Wiersma C.A.G. Integration in the visual pathway of crustacea. *Symp Soc Exp Biol* 20: 151-177 (1966)

_Wiersma C.A.G., Roach J.L.M., Glantz R.M. Neural integration in the optic system. In: Sandeman D.C. and Atwood H.L. (eds) *The biology of the crustacea*, vol 4. Neural integration and Behavior. New York: Academic Press, pp 1-31 (1982)

_Wiersma C.A.G., Yamaguchi T. The integration of visual stimuli in the rock lobster. *Vision Res* 7: 197-204 (1967a)

_Wiersma C.A.G., Yamaguchi T. Integration of visual stimuli by the crayfish central nervous system. *J Exp Biol* 47: 409-431 (1967b)

_Young D. *Nerve cells and animal behavior*. Cambridge University Press (1989)

_York B., Wiersma C.A.G. Visual processing in the rock lobster (crustacea). *Progress in Neurobiol* 5: 127-166 (1975)

_Yu D., Keene A.C., Srivatsan A., Waddell S., Davis R.L. *Drosophila* DPM neurons form a delayed and branch-specific memory trace after olfactory classical conditioning. *Cell* 123: 945-957 (2005)

_Zeil J., Hemmi J.M., Backwell P.R. Fiddler crabs. *Curr Biol* 16: 40-41 (2006)

_Zeil J., Nalbach G., Nalbach H-O. Eyes, eyes stalks and the visual world of semi-terrestrial crabs. *J Comp Physiol A* 159: 801-811 (1986)