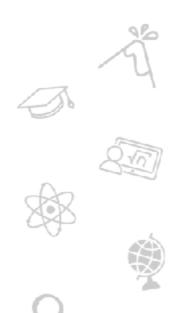
Tesis Doctoral



Papel de la octopamina en procesos de memoria y agresión en el cangrejo Chasmagnathus granulatus

Kaczer, Laura

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.



Kaczer, Laura. (2009). Papel de la octopamina en procesos de memoria y agresión en el cangrejo Chasmagnathus granulatus. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Kaczer, Laura. "Papel de la octopamina en procesos de memoria y agresión en el cangrejo Chasmagnathus granulatus". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.





Facultad de Ciencias Exactas y Naturales





UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Papel de la octopamina en procesos de memoria y agresión en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*

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

Laura Kaczer

Director de Tesis y Consejero de estudios: Dr. Héctor Maldonado

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neurobiología de la Memoria. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. IFIByNE, CONICET

Buenos Aires, mayo de 2009

Papel de la octopamina en procesos de memoria y agresión en el cangrejo

Chasmagnathus granulatus

La octopamina (OA) es una amina biogénica estructural y funcionalmente relacionada con la noradrenalina que posee un rol fisiológico restringido a los invertebrados. En la presente Tesis nos planteamos estudiar el rol de la OA sobre dos procesos comportamentales disímiles en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*: la memoria asociativa y la agresión. Inicialmente analizamos del rol de la OA en las diferentes etapas de una memoria de tipo aversiva, centrándonos en las fases de consolidación y reconsolidación. Los resultados obtenidos demostraron que la OA tiene un efecto amnésico temporalmente acotado sobre ambas fases. Luego, en base a trabajos realizados en insectos, analizamos la posibilidad de que la OA constituyera una mediadora de estímulos apetitivos, abriendo la perspectiva para desarrollar un nuevo paradigma de aprendizaje apetitivo. Comprobamos que efectivamente la OA estaría implicada en la señalización del estímulo apetitivo en el sistema nervioso. De este modo, una misma sustancia actuaría de modo contrapuesto en dos procesos de aprendizaje de significado opuesto para el animal. Asimismo, proponemos que este sistema tendría un valor biológico en situaciones donde un individuo se enfrenta a diferentes tipos de aprendizajes.

Paralelamente, realizamos una caracterización del comportamiento agresivo del cangrejo en condiciones de laboratorio, y analizamos su modulación por la OA. A partir de enfrentamientos entre pares de animales de igual tamaño, demostramos que la OA tiende a reducir la agresividad individual. Finalmente, analizamos la influencia de un enfrentamiento agonístico sobre la memoria aversiva, demostrando que los animales subordinados tienen una mayor capacidad mnésica que los dominantes. A partir de estos datos, planteamos la hipótesis integradora de que la OA podría ser un posible vínculo fisiológico entre la memoria y la agresión.

Palabras clave: octopamina, aprendizaje, memoria, agresión, amina biogénica

Role of octopamine in memory processes and aggression in the crab Chasmagnathus granulatus

Octopamine (OA) is a biogenic amine structurally related to noradrenaline with a physiological role restricted to invertebrates. OA has been considered a key element in associative learning processes, although most of the results came from appetitive learning paradigms. Besides, OA has been implicated in the regulation of aggressive behavior in crustaceans. From these fragmentary data, we aim to study OA's role over two distinctive behaviors in the crab Chasmagnathus granulatus: the associative memory and the aggression, trying to relate both processes via OA action. Firstly, we analyzed OA role on different phases of an aversive memory, named context-signal memory, especially over its consolidation and reconsolidation. Our results suggest an amnesic effect of OA, which could come from an interference over the encoding of the aversive signal. This opened the perspective to develop of a new learning paradigm, with similar properties to the previous one, but with an appetitive reinforcement. After characterizing this new model, we demonstrated that, in fact, OA would be implicated in the appetitive signaling in the nervous system. That is, a same substance could act differently in two biologically opposite learning processes. Secondly, we characterized crab's agonistic behavior in laboratory conditions and analyze the effect of OA treatment. We performed fight encounters between size-matched pairs of crabs, and demonstrates that OA reduced the level of aggressiveness of treated animals. Finally, we analyzed the influence of an agonistic encounter over crab's memory ability, which showed that subordinate animals performed better than its respective dominants. From these data, we propose the hypothesis that OA could be the physiological link between memory and aggression.

Keywords: octopamine, learning, memory, aggression, biogenic amine

Agradecimientos

- -A Héctor, por haberme permitido trabajar junto a él, por la confianza, el entusiasmo contagioso y las ganas de siempre probar algo nuevo.
- A Eugenia, por su ayuda en los momentos clave, porque sus ideas siempre clarifican mi caos.
- A Silvia, mi compañera de escritorio, del binomio bioamina, de peleas, de docencia, de cursada, porque juntas recorrimos todos los terrenos y siempre salimos airosas. Imposible concebir este trabajo sin las miles de horas juntas acomodando los benditos frascos, armando parejas, discutiendo resultados y unos cuantos etcétera.
- -A Martín K, por haber renovado el aire del cuartito, por su buena energía, por su ayuda con el apetitivo y los muchos contextos.
- -A Luis, que aunque esté en la escuelita no logra librarse de mis preguntas, por haber puesto a punto el equipo de las cámaras y por sus salvadoras macros que me hicieron ganar minutos de vida.
- -Al Dr. Gabriel Cuadra, el Dr. Cristian Chocht, y el Dr. Mariano Boccia por su generosa colaboración con las determinaciones por HPLC.
- -A Lía, gurú en este camino de la ciencia y de tantas otras cosas, por siempre estar dispuesta a una buena conversación, a un buen consejo, y a un buen Tom Collins.
- -A Noel, por su amistad incondicional, porque sólo ella es capaz de acompañarme en las propuestas más insólitas, por tantas risas y bailes compartidos.
- A Viole, amiga multifunción, compañera de tacos mejicanos y de gustos literarios, porque siempre que necesito sabiduría concentrada tengo donde encontrarla.
- -A Yanil, carioca camuflada, por la creciente amistad, por las preguntas enriquecedoras
- -A Ramiro, porque puedo acudir a él cada vez que no sé algo de cualquier índole: o bien me lo responde (y de paso me cuenta alguna historia de Nepal), o se inventa un experimento para averiguarlo.

- -A Ángel, la parada obligada al entrar al laboratorio, por las miles de veces que me salvó de caer en la desesperación por una sombra rota o un equipo rebelde, por el alimentador, por su buena predisposición y alegría para todo y todos.
- -A todo el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria: Héctor, Arturo, Daniel, Gaby, Bea, Euge, Angel, Ale, Martín B, Rami, Lía, Noe, Viole, Emi, Fer, Juli S, Silvia, Martín K, Luis, Mariana, Martín C., Vero de la F, Sol, Sabi, Mache, Ceci, Vero C, Luis S, Leti, Damián, Juli M, Laura y Pedro, por los ritos que continúan, los almuerzos conjuntos, los viajes, las innovaciones reposteras, por haber generado una peculiar combinación de ámbito científico estimulante con el de familia numerosa.
- -Al grupo sibarita: Leo, Belu, Viole, Grego, Paul, Agus y Jime, por las veladas regadas por el buen gusto y la excelente compañía.
- -A las chicas: Vale, Anita, Debo, Lau, Mechi, Flor y Gime, porque tantos años de amistad no pueden mentir, qué bueno es tenerlas en cada etapa.
- -A mis papás y a mi hermano, porque aún estando crecidita sigo contando siempre con ellos, incondicionales, saboreando las buenas y acompañando las menos buenas.
- -A Julián, por todos los Marraquitos y por este hermoso volumen dos.

Indice

Capítulo	1:	Introducción	general
Capitulo	1.	IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	general

1.1.	Aprendizaje v memoria			
1.2.	El comportamiento agresivo			
1.3.	La octopamina (OA)			
1.4.	El estudio de la memoria en el cangrejo Chasmagnathus			
1.5.	Objetivos			
Capít	ulo 2: Materiales y Métodos Generales			
2.1.	Animales, captura, traslado y mantenimiento			
2.2.	Metodología general para experimentos de memoria			
2.3.	Paradigma aversivo (memoria contexto-EVP)			
2.4.	Paradigma apetitivo (memoria contexto-alimento			
2.5.	Experimentos de doble aprendizaje			
2.6.	Drogas y procedimiento de inyección			
2.7.				
	comportamento agonistico			
Capít	ulo 3: Papel de la octopamina en la memoria aversiva			
3.1.	Introducción			
3.2.	Resultados			
3.2.1.	Primera parte: Efecto de la OA sobre la fase de			
	consolidación de la memoria aversiva			
3.2.2	Segunda parte. Efecto de la OA sobre la			
	reconsolidación de la memoria aversiva			
3.3.	Conclusiones y Discusión			
Capít	ulo 4: Evaluación del rol de la octopamina en un nuevo			
	paradigma de aprendizaje apetitivo			
4.1.	Introducción			
4.2	Resultados			
4.2.1.	Primera parte: desarrollo de un nuevo paradigma de aprendizaje apetitivo			
4.2.2.	Segunda parte: evaluación del rol de la OA en el			
	paradigma de aprendizaje apetitivo			
4.3.	Conclusiones y Discusión			
Capít	ulo 5: La interacción entre el aprendizaje aversivo y el			
-	apetitivo. Hipótesis sobre el papel de la octopamina en			
	ambos paradigmas			
5.1.	Introducción			
5.2.	Resultados			
5.3.	Conclusiones y Discusión			

Capítulo 6: Efecto de la octopamina sobre el comportamiento agresivo de *Chasmagnathus*

6.1.	Introducción	84
6.2.	Diseño experimental	86
6.3.	Resultados	88
5.3.	Conclusiones y Discusión	92
Capítulo	7: La relación entre el comportamiento agonístico y la capacidad mnésica	
7.1.	Introducción	96
7.2.	Diseño experimental	97
7.3.	Resultados	100
7.4.	Conclusiones y Discusión	103
Capítulo	8: Discusión general	108
Bibliogra	afia	116

Capítulo 1

Introducción General

En este primer capítulo abordaremos los conceptos clave que contribuirán a comprender la formulación de las preguntas y las interpretaciones realizadas a través de esta Tesis Doctoral. Empezaremos por la presentación de los procesos bajo estudio: el aprendizaje y memoria (1.1) y la agresión (1.2). Seguidamente, brindaremos un panorama de las diferentes facetas de la octopamina, la molécula que guiará nuestro trabajo (1.3). Luego, analizaremos las principales características de la especie utilizada, así como también su uso como modelo en estudios de memoria (1.4). Por último, plantearemos los objetivos e hipótesis generales de la Tesis y las preguntas particulares de cada capítulo (1.5).

1.1 Aprendizaje y memoria

Desde una perspectiva puramente comportamental, el aprendizaje puede definirse como un proceso que se manifiesta a través de cambios adaptativos en el comportamiento individual resultantes de la experiencia (Thorpe, 1963). Si disecamos los términos fundamentales de esta definición, notamos que en primer lugar hace referencia al *cambio*: es decir que mediante el aprendizaje se flexibiliza el comportamiento de un individuo ante una determinada circunstancia. A nivel experimental, este cambio se evidencia comparando la conducta en dos momentos diferentes: durante (t₁) y después (t₂) de que el aprendizaje haya tenido lugar. En segundo lugar, el término *adaptativo* pone énfasis en el hecho de que el tipo de cambio generado representa un beneficio para el individuo, permitiéndole adaptarse a las condiciones de un ambiente cambiante y contribuyendo así a incrementar su *fitness* (Dukas, 2008). Finalmente, el aprendizaje se adquiere a través de una determinada *experiencia*, que incluye eventos de naturaleza sensorial, emocional, cognitiva o motora. Ahora bien, para que los cambios de t₁ a t₂ puedan expresarse, el aprendizaje necesariamente debe perdurar en el tiempo. Se define a la **memoria** como la retención del cambio comportamental adquirido a través del aprendizaje.

Si bien las definiciones operacionales de aprendizaje y memoria pueden resultar prácticas e intuitivas, dejan fuera aspectos fundamentales de estos procesos, como por ejemplo su sustento físico. Desde una perspectiva neurobiológica, consideramos a la memoria como una representación interna de una experiencia comportamental, la cual se inscribe en el sistema nervioso del individuo generando un trazo mnésico (Maldonado, 2008). Lo que la diferencia de otros tipos de representaciones internas es que la memoria es duradera (dura más que el presente perceptivo o cognitivo) y que es generada por un proceso de aprendizaje. La búsqueda de esta representación ha constituido la esencia de la

investigación en el campo de la neurobiología de la memoria. En la actualidad, se asume que las representaciones internas están codificadas espacio-temporalmente en los circuitos neuronales, y que implican cambios en las propiedades reactivas de las neuronas que los integran (Dudai, 2002a). Llegado este punto, podemos redefinir al aprendizaje, aludiendo a sus mecanismos, como el proceso a través del cual una experiencia se codifica en circuitos neuronales, expresándose en un cambio del comportamiento. Resulta evidente que el aprendizaje y la memoria están unidos indisolublemente, y en ocasiones se utiliza el término "aprendizaje" para referirse a aprendizaje seguido de memoria, y el de "memoria" trae implícito que vino precedida por un aprendizaje.

1.1.1. Estudio comportamental del aprendizaje y la memoria

Para abordar experimentalmente los procesos de aprendizaje y memoria se requiere simplificar el tipo de experiencia que recibe el sujeto experimental de modo tal de controlar las condiciones y estímulos que se le presentan. Desde comienzos del siglo XX el estudio del aprendizaje se benefició en gran medida del uso de modelos animales, a partir de los trabajos de científicos como Thorndike y Pavlov (Rosenzweig, 1998). Posteriormente, estos modelos abrieron la posibilidad de realizar intervenciones en el sistema nervioso, lo cual permitió adentrarse en un análisis mecanístico de los procesos.

A grandes rasgos, podemos distinguir entre aprendizajes de tipo no asociativo y de tipo asociativo.

Dentro de la categoría de aprendizajes no asociativos encontramos a los procesos de habituación y sensibilización. En estos se considera que el individuo aprende únicamente sobre la presencia de un estímulo determinado. La sensibilización causa un aumento inespecífico en los niveles de respuesta luego de la exposición a un primer estímulo intenso o nocivo. Por el contrario, la habituación se logra mediante una presentación repetida de un estímulo relevante, de modo tal que las respuestas del individuo ante el mismo van haciéndose cada vez menos intensas. El decremento está específicamente relacionado con el estímulo original, y es posible reinstalar la respuesta ante la presentación de un estímulo diferente (Carew, 2000). Ciertos autores (Whitlow & Wagner, 1984) consideran a la habituación como un caso de aprendizaje asociativo porque numerosos resultados demuestran que el individuo realiza inevitablemente una asociación entre el estímulo y otros parámetros como el contexto donde fue recibido.

La capacidad de asociar dos o más eventos inicialmente inconexos constituye el fundamento básico de los aprendizajes de tipo asociativo y le permite a un animal extraer las características relevantes del ambiente que lo rodea, posibilitándole hacer predicciones acerca de los estímulos y sus potenciales consecuencias.

En el condicionamiento clásico se presentan de modo pareado dos estímulos diferentes: uno de valor neutro (estímulo condicionado, EC) y otro de valor significativo para el individuo (estímulo incondicionado, EI) que genera una respuesta espontánea (respuesta incondicionada, RI). Mediante este procedimiento se logra una asociación entre los dos estímulos, adquiriendo el EC un valor predictivo de la llegada del EI, de tal modo que la sola presentación del EC logra generar una respuesta en el individuo (la respuesta condicionada, RC). Por ejemplo, en un condicionamiento contextual de miedo en ratas, se coloca al animal en un contexto (EC) donde recibe una descarga eléctrica en las patas (EI) que le provoca una respuesta de salto y temblor (RI). Luego de un intervalo en otro recipiente, al volver a colocar a la rata en el contexto original, se observa una respuesta de congelamiento (RC) sin necesidad de presentarle el EI.

Otro tipo de condicionamiento, llamado *instrumental u operante*, implica la asociación entre un determinado comportamiento con un estímulo incondicionado, siendo en este caso el individuo el que detecta la contingencia entre ambos. Por ejemplo, un ratón al explorar la arena experimental (EC) presiona por casualidad una palanca (RI), tras lo cual recibe una ración de alimento (EI). La repetición de esta secuencia lleva a descubrir que su acción (la de apretar la palanca) trae aparejada una consecuencia (la comida).

A partir de una gran cantidad de evidencias provenientes de diferentes modelos, se establecieron una serie de "leyes" o principios generales del aprendizaje asociativo (Maldonado, 2008), entre los que podemos destacar: *a*) Cuanto más fuerte sea la contingencia entre el EC y el EI (i.e., mayor la probabilidad de que si ocurre el primero, ocurrirá el segundo), mayor será la fuerza de la asociación; *b*) Es necesaria una proximidad espacio-temporal entre el EC y el EI para generar la asociación entre ambos; *c*) La fuerza de la asociación entre el EC y el EI será mayor cuanto mayor sea el EI; *d*) Es posible generalizar la respuesta condicionada a estímulos de características similares al EC; *e*) El intervalo entre los ensayos de aprendizaje (donde se presentan apareados el EC y el EI) es un factor determinante en el condicionamiento, siendo más eficiente un espaciamiento de los mismos que un intervalo muy pequeño o nulo. Si bien existen excepciones, se han demostrado estos principios en especies tan diversas como la babosa de mar *Aplysia*, la abeja *Apis*, o el mono *Rhesus*, conduciéndonos a pensar que existiría cierta universalidad en

los fenómenos de aprendizaje asociativo. Evidentemente, esto no implica que todas las especies puedan formar las mismas asociaciones pues existen restricciones biológicas del aprendizaje que implican cierta predisposición del sistema nervioso de las diferentes especies a formar algunas asociaciones y no otras (Menzel, 2007)

1.1.2. Las fases de la memoria

Vimos anteriormente que la memoria es generada a través del aprendizaje. Pero la construcción de esta memoria no ocurre instantáneamente, sino a través de un proceso con una determinada dinámica temporal. El aprendizaje constituye el primer paso del proceso, llamado fase de adquisición, donde se produce la codificación de los estímulos sensoriales a representaciones neuroquímicas. El segundo paso, denominado fase de consolidación, constituye un período de estabilización post-adquisición que permite a la memoria subsistir en el tiempo (Dudai, 2004). Se demostró que las memorias de formación reciente son susceptibles a la interferencia ante ciertos agentes como distractores o tratamientos farmacológicos, considerados amnésicos, los cuales dejan de ser efectivos una vez estabilizada la traza mnésica. Ya consolidada la memoria, se requiere "recuperar" la información almacenada en el momento apropiado, lo cual ocurre durante la fase de evocación, a través de la que somos capaces de evidenciar la existencia misma de la memoria (Sara, 2000b).

Actualmente el término "consolidación" se usa para referirse a dos procesos diferentes: uno que ocurre dentro de los primeros minutos a horas siguientes a la adquisición y otro que lleva semanas, meses o incluso años hasta completarse (Dudai, 2002a). Al primero se lo denomina consolidación sináptica, y es a través de la cual la información almacenada en las sinapsis y neuronas de los circuitos involucrados en la representación de la memoria se estabiliza con el tiempo. En este período, la activación de las cascadas intracelulares de transducción provoca una modulación de la expresión génica y culmina en la síntesis de nuevas proteínas (Davis & Squire, 1984). Éstas sirven a las modificaciones de largo término en las propiedades funcionales de las sinapsis, incluyendo modificaciones morfológicas (Bailey et al., 1996; Bailey et al., 2004). Esta fase puede ser bloqueada por inhibidores de la síntesis de proteínas o de ARN (Abel & Kandel, 1998; Davis & Squire, 1984; Flood et al., 1973; Goelet et al., 1986), aunque una vez que la modulación de la expresión génica se ha desencadenado, el proceso se hace inmune a estos factores. Por otro lado, la denominada consolidación sistémica implicaría la reorganización

a través del tiempo de circuitos neuronales y áreas cerebrales de procesamiento y almacenamiento de la información (Dudai, 2002b). En este caso, la forma de evidenciar el proceso es a través de lesiones o de aplicación de agentes inhibitorios en ciertas áreas específicas, como la formación hipocampal o la neocorteza en el caso de los mamíferos, o los cuerpos pedunculados en el caso de los insectos.

La concepción original de la consolidación de la memoria postulaba que luego de la adquisición se producía un pasaje irreversible de una fase lábil a una fase estable, insensible a los agentes amnésicos (Davis & Squire, 1984; Hebb, 1949). Sin embargo, esta concepción rígida sobre la memoria consolidada viene siendo objeto de críticas. El planteo de algunos trabajos de los años '60 (Misanin *et al.*, 1968) fue retomado recientemente (Nader *et al.*, 2000; Sara, 2000a) y desde entonces un gran número de estudios han demostrado que las memorias de largo término al ser evocadas se reactivan y se tornan nuevamente vulnerables a agentes amnésicos, lo cual involucraría un re-almacenamiento de la información. A esta etapa se la denominó labilización-reconsolidación, y su estudio generó en estos últimos años un intenso debate en el campo de la neurobiología de la memoria (Dudai, 2006), con preguntas como: ¿recapitula la consolidación?, ¿comparte sus mecanismos?, ¿cuáles son las condiciones en las que se desencadena?, ¿cuál es su valor funcional? Estos interrogantes son materia de debate, pero más allá de las diferentes versiones es evidente que ha ido emergiendo una visión más dinámica sobre el proceso de consolidación de la memoria.

1.1.3. Modulación de la memoria

No todas las memorias son igualmente fuertes: determinados eventos generan memorias intensas que pueden durar toda la vida, mientras que otros producen memorias que se pierden a las pocas horas. De este modo, el cerebro desarrolló mecanismos de modulación que reflejan hasta qué punto es valioso el almacenamiento de determinada información (Cahill & McGaugh, 1998). Se considera que el sistema de modulación es extrínseco a la formación del trazo mnésico, es decir, no representa una condición sine qua non para generar la memoria, aunque en algunos casos posea un papel determinante en su almacenamiento (Krasne, 1978; Mishkin, 1982). La etapa de consolidación constituye el período crítico en el cual el sistema extrínseco puede influir en la formación del trazo mnésico. Se han encontrado numerosas evidencias de que las memorias recientemente

formadas son susceptibles a influencias post-entrenamiento, como inyecciones de drogas, o estimulación eléctrica cerebral, las cuales pueden tener un efecto potenciador o bien deteriorar la capacidad mnésica (Cahill & McGaugh, 1998; McGaugh & Izquierdo, 2000). Una de las principales características de estos sistemas es su efecto limitado en el tiempo. Ciertos autores (Gold *et al.*, 1975) plantearon que la consolidación es ventajosa debido a que permite a los procesos endógenos modular la *fuerza* de la memoria resultante.

Se considera que las catecolaminas noradrenalina (NA) y adrenalina (AD) pueden actuar como moduladoras endógenas de la memoria de eventos que inducen su liberación (Cahill & McGaugh, 1998). Estas sustancias están entre las primeras moléculas que se liberan frente a una situación de estrés y son cruciales en la reacción generada ante la percepción de un peligro (Dudai, 2002a). En ciertos paradigmas de memorias aversivas en vertebrados se demostró que las condiciones no emocionales de entrenamiento, que producen mínimas variaciones en los niveles plasmáticos de AD y NA, provocan una retención débil de la memoria, la cual puede ser incrementada mediante una inyección sistémica de las aminas post-entrenamiento (Gold & van Buskirk, 1976; Introini-Collison et al., 1996; McGaugh & Roozendaal, 2002). Estos resultados se aprecian únicamente cuando las invecciones se aplican a tiempos cercanos al entrenamiento, coincidentemente con la liberación endógena producida por el estímulo aversivo utilizado en el protocolo de entrenamiento. En otros casos se encontró una tendencia opuesta, evidenciándose un efecto deletéreo sobre la memoria ante situaciones que implican una gran concentración de NA (Kim & Diamond, 2002; McEwen & Sapolski, 1995). Esto tendría relación con los efectos duales del stress sobre la memoria: si bien las experiencias estresantes, y especialmente las que resultan traumáticas, producen memorias intensas y que perduran a largo término, también es evidente que el estrés dificulta la atención y la memoria subsiguiente al evento, y que incluso puede inducir una amnesia profunda (Kim & Diamond, 2002; McEwen & Sapolski, 1995; McGaugh, 2006).

1.2. El comportamiento agresivo

El comportamiento agresivo u agonístico entre dos individuos de una misma especie puede encontrarse en todo el reino animal adquiriendo manifestaciones muy diversas, que van desde despliegues sin un contacto físico hasta luchas intensas capaces de ocasionar heridas o incluso la muerte del individuo. Las interacciones agonísticas suelen

generarse en el marco de la adquisición o defensa de recursos vitales y determinantes del fitness individual, como el alimento, el refugio o el acceso a una pareja (Arnott & Elwood, 2009). La biología evolutiva utiliza el abordaje de los modelos de optimización (teoría de juegos) para analizar las estrategias adoptadas por los individuos ante un conflicto determinado, donde se considera la capacidad de pelea de los contrincantes (o resource holding potencial, RHP, Parker, 1974), y el valor del recurso en juego (Krebs & Davies, 1993). Dentro de los atributos individuales que pueden modificar la capacidad de pelea, el más determinante es el tamaño o peso corporal, y también influyen la edad, las reservas energéticas y la experiencia agonística previa, entre otros (Dugatkin & Earley, 2004; Kemp & Wiklund, 2004; Earley & Dugatkin, 2006; Nelson, 2006). Estos factores, además de afectar el resultado de la pelea, pueden alterar la duración de la misma. Dentro de los modelos teóricos formulados está el conocido como "evaluación mutua" (Enquist & Leimar, 1983), el cual plantea que los individuos evalúan su RHP en relación al de su rival, lo que implica que cuanto menores sean las diferencias entre los contrincantes, mayor será la intensidad de la lucha (Arnott & Elwood, 2009). En ciertos animales que viven en grupos se suelen evitar los riesgos de constantes enfrentamientos y el consecuente desgaste energético mediante el establecimiento de relaciones de dominancia, las cuales pueden incluso formar parte de una jerarquía social (Chase et al., 2002). En estos casos, las peleas subsecuentes entre los mismos animales se hacen cada vez más cortas y llega un momento donde suele evitarse por completo el enfrentamiento mediante el retroceso del subordinado ante el avance del dominante (Issa et al., 1999). Es decir que la pelea genera un estatus agonístico que es mantenido en el tiempo, ya sea por algún mecanismo de reconocimiento individual o de reconocimiento del estatus del oponente, los cuales pueden estar basados en una comunicación química o visual entre ambos (Bergman & Moore, 2005; Zulandt Schneider et al., 2001).

Desde una perspectiva complementaria, también podemos estudiar a la agresión en relación a sus mecanismos fisiológicos subyacentes. Dentro de las moléculas que juegan un papel importante en la regulación de este comportamiento encontramos a neuropéptidos como la arginina y la vasopresina (Ferris et al., 1997), a hormonas esteroides como la testosterona y el cortisol (Fox et al., 1997; Virgin & Sapolsky, 1997; White et al., 1995), y a aminas biogénicas como la serotonina y la octopamina (Huber et al., 1997). Resulta complejo extraer conclusiones universales sobre el papel de cada una de estas sustancias, pues suelen confundirse sus efectos específicos sobre la agresión con otros relacionados al

estatus, el estrés y la motivación del animal. Asimismo, existen grandes diferencias dependientes de la especie y del tipo de comportamiento analizado.

Los crustáceos decápodos han sido ampliamente utilizados como modelo de estudio de la agresión (Kravitz & Huber, 2003), debido a que suelen presentar un comportamiento agonístico fácilmente evocable y altamente estructurado y cuantificable, junto con la ventaja de que permiten acceder con relativa facilidad al estudio de sus bases neurofisiológicas (Dingle, 1983). Se caracterizaron diversos aspectos del comportamiento agonístico de las langostas de río *Astacus astacus* (Goessmann *et al.*, 2000) y *Procambarus clarkii* (Copp, 1986) y de la langosta marina *Homarus americanus* (Karavanich & Atema, 1998), entre otras especies. En una pelea típica entre un par de individuos de igual tamaño que se encuentran por primera vez, generalmente se intercambian despliegues ritualizados que van escalando el nivel de agresión, hasta que eventualmente uno de los contrincantes retrocede, quedando así definida la pelea y estableciéndose un individuo dominante y otro subordinado (Issa *et al.*, 1999). Una amplia serie de evidencias apuntan a la serotonina y a la octopamina como las reguladoras fundamentales del comportamiento agonístico y de la dominancia en crustáceos (Edwards *et al.*, 2003; Edwards & Kravitz, 1997).

1.3. La octopamina (OA)

Las aminas biogénicas constituyen un amplio grupo de moléculas de señalización de alta relevancia funcional dentro del que se incluyen neurotransmisores como la dopamina, la noradrenalina y la serotonina. La octopamina (OA) es una integrante menos renombrada de este grupo de sustancias y tiene la particularidad de que su rol fisiológico está restringido a los invertebrados, donde constituye una de las aminas más abundantes del sistema nervioso (Roeder, 1999; Roeder et al., 2003). En los vertebrados la OA está considerada una amina traza (con concentraciones por debajo del rango de acción biológica) y por otro lado en los invertebrados la noradrenalina no tendría un papel fisiológico. Estos datos, en conjunción con una notable similitud estructural (Figura 1.1.) y funcional entre ambas sustancias llevaron a la especulación de que la OA en invertebrados cumpliría un rol comparable al de la noradrenalina en vertebrados (Roeder, 2005). La descripción inicial de la OA se realizó en las glándulas salivales del pulpo *Octopus vulgaris*, de donde deriva su nombre (Erspamer, 1952). Posteriormente, se detectó su presencia en todas las especies de invertebrados protostomados analizadas hasta el momento, en linajes tan variados como

moluscos, anélidos, nematodos y artrópodos, siendo este último grupo el más caracterizado y sobre el que se basan la gran mayoría de los estudios (Pflüger & Stevenson, 2005).

OH — CH-CH
$$_2$$
-NH $_2$ OH — CH-CH $_2$ -NH $_2$ OH OH

Figura 1.1. Estructura química de la octopamina y la noradrenalina

1.3.1. Síntesis, degradación y recaptación

La síntesis de la OA se realiza a partir del aminoácido aromático tirosina, mediante una descarboxilación llevada a cabo por la enzima tirosina-descarboxilasa, conduciendo a la formación de la tiramina, molécula precursora directa de la OA que adicionalmente poseería un rol fisiológico *per se* (Roeder, 2005; Lange, 2008). El segundo y último paso de la ruta biosintética implica una hidroxilación realizada por la enzima tiramina-β-hidroxilasa (ΤβΗ).

La inactivación de la señal de la OA se produce principalmente a través de un sistema de recaptación mediante transportadores proteicos específicos localizados presinápticamente (Scavone et al., 1994; Caveney et al., 2006). Resulta interesante el hecho de que ciertos insecticidas naturales actúan inhibiendo este sistema de recaptación, lo que produce una hiperactividad y subsecuente alejamiento de los insectos que se encuentran sobre la planta (Nathanson et al., 1993; Wierenga & Hollingworth, 1990). Por otro lado, la degradación enzimática de la OA se realiza por enzimas N-acetil-transferasas o bien por N-metil-transferasas (Hayassi S, 1977; Isaac et al., 1990; Wierenga & Hollingworth, 1990). La enzima monoaminooxidasa (MAO), principal enzima de degradación para aminas biogénicas de mamíferos, tiene una importancia funcional menor en este caso (Roeder, 2005).

1.3.2. Receptores de OA

La mayor parte de los receptores de aminas biogénicas pertenece a la familia de receptores asociados a proteína-G, caracterizados por poseer siete dominios transmembrana con residuos aminoacídicos altamente conservados (Osborne, 1996). La primera clasificación de receptores de OA (OAR) en diferentes subtipos se estableció en base a diferencias en su perfil farmacológico y fisiológico, a partir de estudios realizados en una preparación de músculo extensor de tibia de la langosta *Locusta migratoria* (Evans, 1981). Se utilizó este modelo debido a que posee una contracción autónoma regulada por un pequeño número de fibras marcapasos que reciben inervación octopaminérgica. Se consideraron dos clases de receptores: los tipo 1 modulaban el ritmo de la contracción y los tipo 2 modulaban la transmisión neuromuscular y la fuerza de contracción del músculo (Evans & Robb, 1993). Estos últimos se subdividieron a su vez en tres clases: 2A, localizados en terminales presinápticas de las motoneuronas, 2B, ubicados en las terminales post-sinápticas del músculo, y 2C, presentes en el sistema nervioso, cuya clasificación proviene de un estudio posterior realizado en el cerebro de *Locusta* (*Roeder*, 1995).

Posteriormente, se clonaron una serie de genes que codificarían para receptores de OA en diferentes especies de insectos (Arakawa et al., 1990; Balfanz et al., 2005; Bischof & Enan, 2004; Dacks et al., 2006). Sugestivamente, se encontró que los OAR comparten similitudes estructurales y de señalización con los receptores adrenérgicos de vertebrados para adrenalina y noradrenalina, lo que condujo a un nuevo tipo de clasificación (Evans & Maqueira, 2005). Se propusieron los siguientes grupos: OARα (presenta similitudes con los receptores α-adrenérgicos de vertebrados), OARβ (presenta similitudes con los receptores β-adrenérgicos) y OA/Tyr (presenta más afinidad por la tiramina que por la OA). A partir de la expresión de los receptores clonados en cultivos celulares de mamíferos se analizaron los mecanismos de transducción implicados en la acción de la OA (Farooqui, 2007). En líneas generales, se vio que los OARα inducen un aumento tanto en los niveles de calcio como en los de AMPc, a través de la activación de las vías de la fosfolipasa C/inositol trifosfato y de la quinasa PKA. Por otro lado, los OARβ generan sólo un aumento de AMPc, a través de la activación de la PKA. Finalmente, los OA/Tyr generan una disminución en los niveles de AMPc a través de la asociación con la proteína G inhibitoria.

Un análisis de la distribución de los receptores de OA en el sistema nervioso de la abeja *Apis* y la langosta *Locusta* (Degen *et al.*, 2000) reveló que la mayor densidad de OARs se encuentra en los cuerpos pedunculados (o *mushroom bodies*) un neuropilo de alta relevancia en procesos mnésicos (Heisenberg *et al.*, 1985) y en los lóbulos ópticos, mientras que la menor densidad corresponde a los ganglios torácicos y abdominales. Asimismo, un análisis realizado en el sistema nervioso de la mosca *Drosophila* coincidió con el anterior en el hallazgo de una expresión enriquecida de OARs en los cuerpos pedunculados (Han *et al.*, 1998), lo que llevó a la especulación de que estos receptores podrían estar implicados en procesos de plasticidad sináptica.

1.3.3. Características de los sistemas octopaminérgicos

Una propiedad ventajosa del sistema nervioso de los invertebrados es que presenta determinadas neuronas con localizaciones, formas y proyecciones características. Consecuentemente, es posible reconocer neuronas específicas en diferentes individuos de una misma especie y también de una especie a otra (Harzsch et al., 2005). Mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas usando anticuerpos contra OA, se demostró que los sistemas octopaminérgicos de diferentes especies son generalmente similares, constituidos de un número relativamente pequeño de neuronas (entre 40 y 100, en diferentes especies) con extensas arborizaciones, el cual representa un diseño que permitiría la transferencia global de información (Sinakevitch et al., 2005; Sinakevitch & Strausfeld, 2006; Dacks et al., 2005). En la mayor parte de las áreas analizadas en diferentes especies de insectos, se encontró un solapamiento en la distribución de la OA con la de sus receptores, a excepción de ciertas zonas de los cuerpos pedunculados, donde se obtuvo una inmunoreactividad muy débil para OA, en contraste con la hallada para sus receptores (Farooqui, 2007).

En insectos, uno de los hallazgos más relevantes fue que algunas de las neuronas conocidas como DUM y VUM (dorsal/ventral unpaired median) contienen y liberan OA (Braunig, 1995; Eckert et al., 1992; Evans & Siegler, 1982; Howell & Evans, 1998). Estas neuronas son de gran tamaño, no-bilaterales, y se sitúan en la línea media dorsal o ventral del cordón nervioso torácico-abdominal, con una densidad de aproximadamente 15 a 20 por ganglio (Braunig, 1995). La mayor parte de la OA hemolinfática proviene de este grupo neuronal, que suple al músculo del vuelo, de las patas y el oviducto, entre otros.

Además, proyectan al sistema nervioso central, inervando a los cuerpos pedunculados y a los lóbulos ópticos, donde se realiza gran parte del procesamiento de la información visual.

En crustáceos, un mapeo de neuronas octopaminérgicas en el sistema nervioso de la langosta marina *Homarus americanus* permitió encontrar un total de 86, incluyendo cerebro, ganglios torácicos y abdominales (Schneider *et al.*, 1993) y en otra especie de langosta, *Munida quiadrispina*, el número hallado fue de 48 (Antonsen & Paul, 2001), con una distribución comparable a la de *Homarus*. Si bien en los crustáceos no se identificaron neuronas como las DUM/VUM de insectos, se identificó un grupo neuronal en el cordón nervioso ventral que, similarmente a las neuronas DUM, posee proyecciones que llegan hasta el cerebro y pedúnculos oculares. Adicionalmente, se identificaron neuronas octopaminérgicas en el cerebro y en los principales neuropilos sinápticos, tales como el complejo central, los lóbulos olfatorios y los lóbulos antenales.

1.3.4. Fisiología de la OA

La OA está implicada en una variada gama de procesos fisiológicos, actuando como neuromoduladora, neurohormona, y en algunos casos también como neurotransmisora (Orchard et al., 1982). Afecta a una enorme multiplicidad de blancos, como músculos esqueléticos y viscerales, tejidos de reserva energética, órganos sensoriales y células del sistema inmune, así como también a una diversidad de procesos como el control de la locomoción, del metabolismo, de comportamientos sociales y de fenómenos de memoria (Roeder, 2005; Roeder et al., 2003).

La OA tiene un papel central en la regulación de procesos de alto requerimiento energético, incluyendo el vuelo en insectos, el cual está considerado como el de mayor demanda de energía en todo el reino animal (Candy, 1978; Candy et al., 1997). Por un lado la OA tiene efectos directos sobre el músculo del vuelo, incrementando la fuerza generada y la eficiencia de la contracción (Whim & Evans, 1988). Por otro lado, la OA permite una mayor provisión de oxígeno a los tejidos mediante una acción concertada sobre la actividad cardíaca (Battelle & Kravitz, 1978; Prier et al., 1994) y la tasa ventilatoria (Bellah et al., 1984; Sombati & Hoyle, 1984). Adicionalmente, la OA permite la obtención del combustible energético necesario a través de su acción sobre el cuerpo graso de insectos, donde dispara la movilización de ácidos grasos en la primera fase del vuelo (Fields & Woodring, 1991; Wang et al., 1990).

Una serie de trabajos realizados en diferentes especies de insectos demostraron que la exposición de los animales a situaciones ambientales adversas tales como el calor excesivo, la falta de alimento o un enfrentamiento agresivo (Harris & Woodring, 1992; Chentsova et al., 2002; Hirashima et al., 2000; Adamo et al., 1997) provocaba un aumento en los niveles hemolinfáticos de OA. Estos resultados, junto con los comentados previamente sobre la acción de la OA en el vuelo de insectos, llevaron a ciertos autores a considerar a la OA como una molécula que se liberaría ante situaciones de lucha-huida que implican alta demanda de energía (Adamo et al., 1997; Davenport & Evans, 1984), de modo análogo a la noradrenalina en vertebrados.

La OA además ejerce un efecto modulador sobre prácticamente todos los órganos sensoriales, generalmente incrementando su sensibilidad (Farooqui, 2007). Por ejemplo, en el gusano de la seda *Bombix mori*, se comprobó que la aplicación de OA aumentaba la sensibilidad de neuronas sensoriales olfatorias, específicamente hacia los componentes químicos de las feromonas (Pophof, 2002). Por otro lado, la OA está implicada en la sensibilización del sistema visual de insectos como la langosta *Locusta migratoria*. Ciertas neuronas detectoras de movimiento se habitúan ante la presentación repetida de un estímulo, y su deshabituación puede lograrse mediante la presentación repentina de un nuevo estímulo táctil o visual. Se demostró que este efecto sensibilizador es producido por neuronas octopaminérgicas identificadas, las cuales mediarían el alerta del sistema visual (Bacon *et al.*, 1995; Stern, 1999; Stern, 2009).

1.3.5. <u>Modulación de procesos comportamentales</u>

Las evidencias en insectos y crustáceos muestran que la OA está involucrada en la regulación de diversos procesos comportamentales, dentro de los que se incluyen:

Comportamientos rítmicos: los patrones motores rítmicos son esenciales en procesos tales como la alimentación, la respiración y la locomoción. En un trabajo precursor de Sombati y Hoyle (Sombati & Hoyle, 1984), se describieron diferentes ritmos en la langosta *Locusta* que podían inducirse o disminuirse por la inyección local de OA en áreas específicas de determinados ganglios. Cuando se la aplicó en una región definida del ganglio metatorácico, se logró evocar la actividad de motoneuronas flexoras de la tibia, mientras que la inyección en otras partes del ganglio permitió evocar comportamientos completos de vuelo. Por último, el ritmo de cavado y ovoposición pudo ser inhibido por inyecciones locales de OA en el ganglio abdominal terminal. En otros grupos de invertebrados, se vio que la OA posee un efecto inhibitorio sobre el ritmo bucal en el caracol (Kyriakides &

McCrohan, 1989) y que podía inducir la natación en la sanguijuela (Hashemzadeh-Gargari & Friesen, 1989).

Aprendizaje y memoria: una serie de evidencias experimentales avalan la idea de que la OA cumpliría un papel fundamental en la regulación de procesos de aprendizaje asociativo en los insectos (Giurfa, 2006). Uno de los primeros trabajos sobre este tema demostró un efecto modulador positivo de la OA sobre una memoria olfatoria en abejas, basada en la asociación de un olor con una recompensa de agua azucarada (Menzel et al., 1990). Posteriormente, en este mismo paradigma, se comprobó que una neurona de tipo VUM octopaminérgica era la responsable de transmitir al sistema nervioso la señal de la recompensa (Hammer, 1993; Hammer & Menzel, 1998). Asimismo, estudios genéticos realizados en la mosca *Drosophila* a partir de la construcción de un knock-out para una enzima clave en la ruta de síntesis de la OA, demostraron que las moscas deficientes en esta amina presentaban un impedimento en la adquisición del aprendizaje, el cual podía revertirse mediante la aplicación de OA exógena (Schwaerzel et al., 2003). Recientemente, dos trabajos realizados en grillos también revelaron un papel determinante de la OA sobre un aprendizaje asociativo de tipo visual y otro de tipo olfatorio (Unoki et al., 2005; Unoki et al., 2006).

Comportamiento agonístico: las aminas biogénicas juegan un papel clave en el control del comportamiento agresivo, tanto en vertebrados como en invertebrados (Edwards & Kravitz, 1997; Huber et al., 1997; Huber et al., 2001; Nelson, 2006; Panksepp et al., 2003). En particular, la OA está implicada en la regulación de la agresión en la mosca Drosophila melanogaster (Baier et al., 2002; Hoyer et al., 2008), el grillo Gryllus bimaculatus (Adamo et al., 1995; Stevenson et al., 2000) y en diversas especies de crustáceos decápodos, los cuales constituyen el modelo invertebrado más intensamente estudiado (Edwards et al., 2003; Edwards & Kravitz, 1997; Kravitz, 2000). En estos últimos, se encontró que la OA y otra amina biogénica, la serotonina (5HT), tienen una actividad moduladora opuesta sobre el comportamiento agonístico: inyecciones de 5HT y de OA provocaban posturas características a las de individuos dominantes y subordinados, respectivamente (Antonsen & Paul, 1997; Livingstone et al., 1980; Sosa & Baro, 2002). Además, las inyecciones podían inducir comportamientos de agresión o de sumisión, por lo que se consideró que estas aminas actuarían también sobre el sistema nervioso central, regulando estas respuestas conductuales (Antonsen & Paul, 1997). Se ha postulado asimismo que la disputa agonística

conduce a niveles diferentes diferenciales de OA y 5HT circulante en animales dominantes y subordinados (Sneddon *et al.*, 2000).

Resulta interesante analizar un ejemplo donde se interconectan dos efectos diferentes de la OA: el de la regulación metabólica del vuelo y el de la modulación de la agresión. En un trabajo realizado en grillos *Gryllus bimaculatus* (Hofmann & Stevenson, 2000), los autores demostraron que luego de que un animal resultara perdedor en una contienda, era posible restaurar su nivel de agresividad mediante una sencilla manipulación: induciendo su actividad de vuelo. Es decir que mediante la activación de un patrón motor determinado, lograban modular el comportamiento agresivo del animal. Posteriormente (Stevenson *et al.*, 2005), se determinó que la conexión entre ambos procesos ocurría a través de la OA: sus valores hemolinfáticos aumentaban luego del vuelo, y a la vez su incremento provocaba un aumento en la motivación de los animales a entablar una nueva lucha (Adamo *et al.*, 1995; Davenport & Evans, 1984). A partir de este ejemplo podemos visualizar cómo dos procesos aparentemente no relacionados pueden conectarse a través de la acción de la OA. Justamente, a lo largo de la presente Tesis nos centraremos en el efecto de la OA sobre dos procesos que *a priori* no se consideran relacionados: la **agresión** y la **memoria**.

1.4. El estudio de la memoria en el cangrejo Chasmagnathus

"el barro negro que rodeaba el agua parecía como picado de viruelas. Miles de agujeritos se apretaban en manadas unos contra otros. Unos pocos cangrejos paseaban de perfil, como huyendo de un peligro. Me pareció que el suelo debía sufrir como animal embichado". Don Segundo Sombra- Ricardo Güiraldes

Durante todo el desarrollo de la presente Tesis hemos trabajado con cangrejos de la especie *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) (**Figura 1.2 A**). Siendo el cangrejo un modelo no convencional para trabajos de laboratorio, es relevante destacar ciertas características de la biología y hábitat de la especie, que son determinantes a la hora de diseñar experimentos comportamentales.

La clasificación taxonómica de esta especie la ubica dentro del Phylum Arthropoda, subphylum Crustacea, clase Malacostraca, Orden Decapoda, familia Grapsidae, suborden Brachyura. Posee hábitos semiterrestres, pasa gran parte del tiempo fuera del agua, dentro de cuevas que cava en el barro (**Figura 1.2 B**) las cuales forman extensos "cangrejales" que

pueden ocupar cientos de hectáreas (**Figura 1.2 C**). Es una especie propia de la costa del Atlántico Sur: su distribución geográfica va desde Río de Janeiro hasta el golfo de San Matías en las costas patagónicas argentinas, ubicándose en zonas de transición de agua dulce y salada (Spivak, 1997). Su régimen alimentario es variable de acuerdo a las zonas, pero está mayormente compuesto por sedimentos con restos de pequeños invertebrados y vegetales (Alberti *et al.*, 2008; Gutierrez & Iribarne, 2004). Por otro lado, su principal predador es la gaviota cangrejera (**Figura 1.2 D**) (Berón, 2003), lo cual constituye un dato fundamental, dado que los estímulos que pasan por encima del horizonte visual son interpretados por el animal como potencialmente peligrosos (Zeil & Zanker, 1997).



Figura 1.2: La especie en estudio y su hábitat. A. Un ejemplar macho adulto de *Chasmagnathus granulatus*. B. Un animal dentro de su cueva. C. Cangrejal de San Clemente del Tuyú: la "sombra" en el barro muestra la alta densidad poblacional de cangrejos. D. Una gaviota cangrejera alimentándose.

1.4.1. -"¿Y por qué estudian la memoria en cangrejos?"

Es una pregunta que todos los integrantes del laboratorio hemos tenido que responder en más de una ocasión. Uno puede utilizar una especie determinada como un modelo para estudiar un proceso de interés. Y también puede utilizarla porque quiere estudiar el proceso en esa especie particular. En nuestro caso se aplican las dos posibilidades. El uso de especies de invertebrados como modelo constituyó una herramienta fundamental para avanzar en el estudio de los mecanismos subyacentes a procesos de aprendizaje y memoria. Algunos ejemplos de especies ampliamente estudiadas son los moluscos Aplysia y Hermissenda (Abel & Kandel, 1998; Hawkins et al., 2006; Crow, 1988), la mosca Drosophila (Tully et al., 1994), y la abeja Apis (Menzel & Giurfa, 2001). Suele atribuirse al sistema nervioso de los invertebrados la virtud de simplicidad, la cual permitiría un abordaje experimental más factible que el que ofrecen los vertebrados. Sin embargo, resulta poco apropiado referirse a estos sistemas como sencillos si consideramos que son capaces de sostener complejos repertorios comportamentales. Por ejemplo, durante el condicionamiento clásico de la retracción de la branquia en Aplysia, están activas de cientos a miles de las neuronas totales del sistema nervioso, que son aproximadamente 20.000. Resulta por lo tanto más apropiado referirnos a estos sistemas como metodológicamente más accesibles que los de vertebrados.

El advenimiento de técnicas electrofisiológicas y de biología molecular ha permitido a disecar el fenómeno de la memoria en sus componentes más básicos, en un abordaje del tipo *bottom-up* que llevó a identificar moléculas claves asociadas con la plasticidad sináptica a largo término. Habiendo trascurrido cierto tiempo desde estos hallazgos, es relevante analizar si estos componentes esenciales efectivamente están jugando un rol en procesos mnésicos de un animal "completo". Es decir, dar vuelta el enfoque hacia uno del tipo *top-down* validando así los estudios moleculares. La razón por la que suele considerarse que los hallazgos realizados sobre fenómenos de memoria en una especie podrían ser extensibles a otros animales es que especies distantes filogenéticamente comparten características funcionales básicas, como consecuencia de una herencia ancestral común. Muchos neurotransmisores, o vías de transducción de señales surgieron en una etapa temprana del proceso evolutivo y han sido conservadas a lo largo del tiempo (Bank *et al.*, 1988; Menzel & Muller, 2001; Pedreira *et al.*, 1995; Pelz *et al.*, 1997).

Por otro lado, existe una razón para estudiar procesos de memoria en el cangrejo per se: entender la variabilidad biológica, el porqué una especie es capaz de aprender algo que otra cercana no puede. El enfoque comparativo permite correlacionar ciertos comportamientos de los animales con el hábitat y el modo de vida de la especie. De este modo podemos entender a determinados fenómenos de memoria como el resultado de presiones selectivas del ambiente (Tomsic et al., 1993). Una de las ventajas de este enfoque es que brinda una visión más abarcadora y rica que la que extraeríamos si todos los estudios provinieran de una única especie modelo.

La capacidad del cangrejo Chasmagnathus de modificar su estrategia defensiva ante la presentación de un estímulo visual potencialmente peligroso es la base de un paradigma de memoria aversiva ampliamente estudiado, tanto desde un punto de vista comportamental como mecanístico (Maldonado, 2002; Maldonado et al., 1997). Este modelo se basa en la respuesta de escape provocada por la presentación de un estímulo visual de peligro (EVP), representado por una pantalla rectangular que pasa por encima del animal. Ante la presentación reiterada del EVP, la respuesta de escape del cangrejo va decreciendo (Brunner & Maldonado, 1988; Tomsic et al., 1998) y es reemplazada por una respuesta de congelamiento, la cual persiste al menos por cinco días (Pedreira et al., 1996; Pereyra et al., 1996). Esta memoria de largo término está mediada por la asociación entre las características ambientales del entrenamiento (contexto) y las propiedades del EVP (Hermitte et al., 1999) denominándose memoria contexto-EVP. Una serie de estudios sobre la consolidación de esta memoria han demostrado que es sensible a la cicloheximida (Pedreira et al., 1995); a la actinomicina D (Pedreira et al., 1996), modulada positivamente por angiotensina II (Delorenzi et al., 1996) y por el antagonista de GABA muscimol (Carbo-Tano et al., 2008); que están implicados en su formación los receptores colinérgicos muscarínicos (Beron de Astrada & Maldonado, 1999), los receptores glutamatérgicos tipo NMDA (Troncoso & Maldonado, 2002); que está mediada por la vía de transducción de señales del AMPc (Locatelli et al., 2002; Romano et al., 1996); y requiere la activación de factor de transcripción NF-KB (Freudenthal et al., 1998; Merlo et al., 2005).

1.5. Objetivos

El objetivo general de esta Tesis doctoral es estudiar el rol de la octopamina sobre los procesos de memoria y la agresión en el cangrejo *Chasmagnathus* y analizar un posible vínculo entre ambos.

En relación al rol de la OA sobre los procesos mnésicos, planteamos las siguientes dos hipótesis. En primer lugar, consideramos que la OA tendría un papel en la memoria aversiva de *Chasmagnathus* comparable al de la noradrenalina en los modelos de aprendizaje de vertebrados. Posteriormente, en base a una serie de trabajos realizados en insectos que demostraron un papel decisivo de la OA en aprendizajes de tipo apetitivo, planteamos la hipótesis de que la OA estaría implicada en la codificación de refuerzos apetitivos. La evaluación de la misma implicó el desarrollo de un nuevo modelo de aprendizaje apetitivo en *Chasmagnathus*.

Respecto a la implicancia de la OA sobre la agresión, basándonos en estudios realizados en otras especies de crustáceos planteamos la hipótesis de que la OA regularía el comportamiento agonístico y estaría relacionada con el estatus de subordinado.

Los **objetivos particulares** son los siguientes:

- Analizar de modo sistemático el rol de la OA sobre las diversas etapas del procesamiento mnésico de la memoria contexto-EVP, de tipo aversivo, fundamentalmente en las fases de consolidación y reconsolidación (Capítulo 3).
- Desarrollar un nuevo modelo de memoria apetitiva que permita una comparación directa con el modelo aversivo previamente establecido (Capítulo 4, primera parte).
- Analizar si el proceso de memoria apetitiva depende o se ve afectado por la acción de la OA (Capítulo 4, segunda parte).
- Estudiar la interacción entre el aprendizaje aversivo y el apetitivo y discutir la relevancia de la OA en la relación (Capítulo 5).

- -Realizar un análisis cualitativo y cuantitativo del comportamiento agonístico en *Chasmagnathus* bajo condiciones de laboratorio (Capítulo **6**, primera parte).
- -Analizar la influencia de la OA sobre el comportamiento agonístico (Capítulo 6, segunda parte).
- Analizar la relación entre capacidad mnésica y agresión y estudiar la implicancia de la OA como vínculo entre ambos (Capítulo 7).

Capítulo 2

Materiales y Métodos Generales

2.1. Animales, captura, traslado y mantenimiento

Los animales utilizados son cangrejos machos adultos de la especie *Chasmagnathus granulatus* con un ancho máximo de caparazón comprendido entre 2,7 y 3 cm, y un peso aproximado de 17 g. Los cangrejos son recolectados en aguas salobres de menos de un metro de profundidad en las rías de San Clemente del Tuyú, Argentina. Las recolecciones se realizan durante todo el año con un intervalo aproximado de 15 a 20 días. Durante la permanencia en el laboratorio, los animales son mantenidos en cubas plásticas (35 x 48 x 27 cm.) cubiertas con agua hasta 2 cm y con una densidad de 20 animales por cuba. El agua usada tanto en las cubas como en los dispositivos experimentales se prepara con sal marina para acuarios Cristalsea Marimex (Winex-Alemania), con una salinidad de 12.0% y un pH de 7.4-7.6, y se cambia día por medio. Se mantiene un ciclo luz-oscuridad de 12L: 12O (08:00-20:00 horas). Las temperaturas del cuarto de mantenimiento y del experimental, así como de las zonas de conexión entre ellos son mantenidas en un rango de 19 a 22 °C y la humedad relativa es de 90± 10%.

Los experimentos son llevados a cabo dentro de los 15 días del arribo de los animales al laboratorio y cada animal es utilizado en un único experimento. Antes de incluirlo en un grupo experimental se realiza una *prueba de selección*, en la cual se da vuelta a cada animal apoyando su zona dorsal: si tarda más de 2 segundos en restablecer la posición original no se lo utiliza porque esta lentitud estaría correlacionada con un estado general de deterioro.

2.2. <u>Metodología general para experimentos de memoria</u>

Cada experimento incluye al menos dos fases: la sesión de entrenamiento y la de evaluación (o testeo), que se hacen en días diferentes, generalmente con un intervalo de 24 o 48 h. Siempre se utiliza al menos un par de grupos, de 30 a 40 animales cada uno. Cada par incluye un grupo entrenado (TR) que recibe el estímulo incondicionado durante la sesión de entrenamiento, y un grupo control (CT) que permanece en el contexto durante la sesión sin recibir estímulo alguno. Durante el intervalo entre sesiones los cangrejos son alojados en recipientes individuales situados dentro de cajoneras con una iluminación tenue. En la sesión de evaluación todos los animales se colocan nuevamente en los mismos recipientes que estuvieron el día del entrenamiento.

En la presente Tesis se utilizan dos modelos diferentes de memoria, uno aversivo y uno apetitivo, así como también una combinación de ambos. Los dispositivos utilizados tienen en común a la arena experimental donde cada animal permanece a lo largo del entrenamiento y la evaluación (**Figura 2.1**). Consiste en un recipiente plástico tipo *bowl* con las paredes cóncavas y el piso central circular plano (23 cm. de diámetro en el extremo superior y 9 cm. en el inferior), el cual se cubre con agua marina artificial hasta 0.5 cm., y es iluminado tenuemente con una lámpara de 10 W. Un resumen de las características de cada paradigma se detalla en la **Tabla 2.1**.

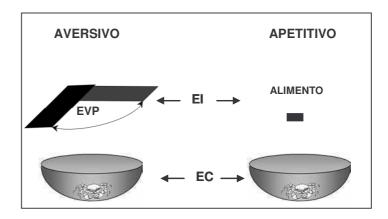


Figura 2.1: Dispositivos experimentales utilizados en el paradigma apetitivo y el aversivo

	Paradigma Aversivo	Paradigma Apetitivo
EC	Contenedor plástico	Contenedor plástico
EI	EVP (estímulo visual de peligro)	Alimento (pellet de conejo)
Respuesta inicial al El	Escape ante el EVP	Aproximación y consumo del alimento
Respuesta Condicionada	Congelamiento (decremento del escape)	Incremento en la exploración
Memoria	TR <ct< td=""><td>T R>CT</td></ct<>	T R>CT
Evaluación	24 h	48 h
Dispositivo	Vibraciones traducidas por un micrófono *	Video motion tracking

Tabla 2.1: Comparación de los diferentes parámetros correspondientes a los dos paradigmas (*: en los casos de doble aprendizaje la memoria aversiva se evalúa mediante *video motion tracking*)

2.3. Paradigma aversivo (memoria contexto-EVP)

2.3.1. <u>Dispositivo</u>

El dispositivo utilizado tanto en la sesión de entrenamiento como en la de evaluación (Figura 2.2) consiste en el recipiente cóncavo donde se coloca a los animales, por encima del cual se ubica una pantalla rectangular opaca (25 x 7.5 cm.) que representa el estímulo visual de peligro (EVP). El EVP se mueve horizontalmente por encima del animal (dos ciclos de 2,5 segundos cada uno), evocando una respuesta de escape, la cual a su vez provoca vibraciones del recipiente. Un micrófono colocado bajo la base del recipiente capta las vibraciones e induce señales eléctricas proporcionales. Estas señales son amplificadas, integradas durante el tiempo de registro y traducidas a una escala numérica arbitraria. El recinto de experimentación consta de 40 unidades aisladas unas de otros por paneles de madera. Se usa una computadora para programar las secuencias de ensayos, el intervalo entre ensayos así como para tomar registro de los eventos experimentales medidos. Cada experimento requiere más de una corrida experimental (generalmente cuatro), debido a que el número de unidades disponibles es menor al número total de animales utilizados. A su vez, en cada corrida experimental todos los grupos están igualmente representados.

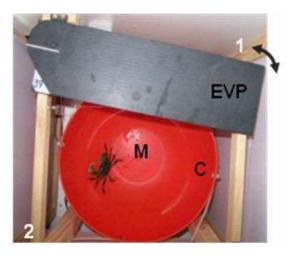


Figura 2.2: Dispositivo de entrenamiento y registro de la respuesta de escape Consiste en un recipiente plástico (C); una pantalla rectangular (EVP) y un micrófono (M), que se coloca debajo del contenedor. La pantalla rectangular realiza un ciclo de 1 a 2 (marcados en blanco), y viceversa. Un ciclo dura aprox. 2,5 seg.; un ensayo (2 ciclos más los intervalos intra-ensayos de 2 seg) aprox. 9 seg.

2.3.2. Respuesta frente al EVP

Es posible puntualizar dos características importantes de la respuesta de escape provocada ante el pasaje del EVP. En primer lugar, comienza inmediatamente después de la entrada del estímulo en el campo visual, precedida generalmente por un pequeño salto, y siempre tiene prioridad sobre la actividad previa del animal, ya sea exploración o reposo (Korn & Faber, 1996). Segundo, es una respuesta direccional, es decir, el cangrejo tiende a correr en dirección opuesta al movimiento de la pantalla (Pereyra *et al.*, 2000). A medida que avanza el entrenamiento la respuesta de escape va haciéndose cada vez menos intensa hasta ser reemplazada por una respuesta de congelamiento, la cual subsiste por largo término.

Por otro lado, el movimiento cíclico de la figura tiene un doble propósito: primero, la obtención de una respuesta conspicua mediante la acumulación de vibraciones del recipiente; segundo, el aumento de la probabilidad de que la pantalla ingrese en el campo visual del animal por lados diferentes, garantizando así la estimulación similar para cada individuo independientemente de la ubicación del mismo.

2.3.3. Protocolo experimental

Podemos clasificar básicamente dos tipos de protocolos de acuerdo a la fase de la memoria que se esté analizando: los de consolidación y los de reconsolidación, los cuales se detallan a continuación.

Experimentos de consolidación: consisten en una sesión de entrenamiento y una de evaluación, separadas por un intervalo de 24 h. Los animales se disponen en pares de grupos control (CT) o entrenados (TR).

En la sesión de entrenamiento todos los animales son colocados en los dispositivos experimentales y los grupos TR reciben un determinado número de ensayos de entrenamiento mientras que los CT permanecen en el contexto sin recibir estimulación. Un **ensayo** de entrenamiento consiste en la presentación del estímulo visual de peligro (EVP), que pasa por encima del animal de izquierda a derecha y viceversa por un total de 9 segundos. La respuesta se registra durante toda la duración el ensayo. Podemos distinguir dos tipos de entrenamiento de acuerdo al número de ensayos utilizados: los de tipo **fuerte**

incluyen 15 presentaciones del EVP (45 minutos), y los de tipo **débil** incluyen 6 presentaciones del EVP (20 minutos). En ambos casos el intervalo entre ensayos es de 3 minutos. Mientras que el entrenamiento fuerte asegura la formación de una memoria a largo término, el débil resulta insuficiente para evidenciar retención de la memoria al día siguiente. Por lo tanto, los entrenamientos fuertes son utilizados en los casos donde nos interesa analizar si un tratamiento interfiere con la memoria, mientras que los débiles se usan cuando analizamos si el tratamiento tiene un efecto potenciador de la memoria.

En la sesión de evaluación todos los animales se colocan nuevamente en el contexto de entrenamiento y luego de un período de 5 minutos de adaptación reciben una presentación del EVP. La respuesta condicionada es un nivel reducido de respuesta de escape (congelamiento).

Se considera operacionalmente que un grupo TR muestra **retención de la memoria** cuando su nivel de respuesta es significativamente menor que el de su respectivo grupo CT.

Experimentos de reconsolidación: consisten en una sesión de entrenamiento, una de reexposición y una de evaluación, realizadas en tres días consecutivos, con un intervalo de 24 h entre sesiones. Las sesiones de entrenamiento y de evaluación son iguales a las detalladas para los experimentos de consolidación. La sesión de reexposición implica la colocación de todos los animales en los contenedores donde estuvieron en la sesión de entrenamiento por un período de 5 minutos, luego de los cuales vuelven a sus recipientes dentro de las cajoneras. Se demostró que esta breve exposición de los animales al contexto del entrenamiento (recordatorio) permite reactivar la memoria original, a lo cual seguiría un proceso de labilización-reconsolidación. Se determinaron dos propiedades fundamentales que debe cumplir el recordatorio:

- a) Para que se evoque la memoria original el contexto donde se coloca a los animales debe ser el mismo que el del entrenamiento. Por lo tanto, si se utiliza otro contexto no debería reactivarse la memoria (Pedreira *et al.*, 2002).
- b) Para que se dispare la fase de labilización-reconsolidación el período de exposición no debe incluir la presentación del EVP. Es decir, si luego de los 5 minutos se presenta un EVP, se impediría la labilización de la memoria (Pedreira *et al.*, 2004).

2.3.4. Análisis de los datos

La retención de la memoria de largo término se define operacionalmente como la diferencia significativa entre los grupos CT y TR en el nivel de respuesta media durante la sesión de evaluación, de modo tal que TR<CT. Es decir, se centra el análisis de los datos en los niveles de respuesta durante la sesión de evaluación. Usamos este tipo de análisis en lugar de una comparación entrenamiento vs. evaluación, debido a que permite distinguir entre el momento de adquisición de la información y el de evaluación de la misma (Rescorla, 1988), bajo la concepción de que el comportamiento del animal puede diferir entre las dos sesiones por razones no relacionados con el aprendizaje y de esta forma acentuar o ensombrecer diferencias propias del fenómeno mnésico.

En base a una gran cantidad de experimentos realizados con este paradigma de aprendizaje, se establece una predicción básica: en todos los casos habrá una diferencia significativa entre los grupos CT y TR en la sesión de evaluación, siempre y cuando los animales hayan sido entrenados con al menos 15 ensayos. Por esta razón se recurre a la estadística de comparaciones planeadas *a priori* (Howell, 1987; Rosenthal & Rosnow, 1985). Las comparaciones incluyen dos tipos de contrastes: 1) un contraste entre los grupos no entrenados (CTs), cuyas respuestas se espera que sean similares, y 2) un contraste por cada grupo no entrenado (CT) y su respectivo grupo entrenado (TR). Estas comparaciones se realizan luego de un ANOVA de un factor que presentara diferencias significativas (p<0.05).

Los datos de la sesión de entrenamiento se evaluaron mediante una prueba de ANOVA de medidas repetidas.

Para estandarizar las respuestas medidas a lo largo del año, cada experimento se normaliza de acuerdo a la respuesta de los grupos controles, expresando los datos como porcentajes de la respuesta del control.

2.4. Paradigma apetitivo (memoria contexto-alimento)

2.4.1. Dispositivo

En esta Tesis se presenta por primera vez un método que permite registrar el comportamiento de los cangrejos por medio de imágenes de video. El equipo y el ajuste del método de registro fueron desarrollados por Luis Pérez Cuesta y Héctor Maldonado. El

recinto experimental cuenta con 20 arenas, separadas en 5 módulos, cada uno de los cuales es registrado por una cámara de video situada a una altura de 2 metros. La señal de las 5 cámaras que componen el dispositivo es capturada por una interfaz donde es digitalizada y recortada (480x480 píxeles, 24 bits). Al finalizar cada registro se genera un archivo digital (formato AVI) correspondiente a cada cámara. El software desarrollado permite, en cada experimento, estipular independientemente para cada cámara el momento de inicio de cada registro y la tasa de captura en cada registro (hasta un máximo de 10 cuadros/seg). El comportamiento de cada cangrejo es analizado en soporte digital utilizando otro software desarrollado a tal fin, basado en el rastreo de cada animal en el espacio, a lo largo del tiempo (video motion tracking) (Fig.2.3). Para minimizar el error del método, se coloca en el caparazón de cada cangrejo una marca reducida y contrastante (gomaeva amarilla, 4x4 mm), que será el objeto a rastrear. El software de rastreo permite individualizar múltiples arenas experimentales, rastreando y localizando en cada cuadro del video la posición de cada animal (en los ejes x,y, en píxeles). Los datos son procesados en una planilla de Excel, donde se analizan distintas variables dependientes de la posición y del tiempo como la distancia total recorrida, velocidad promedio, patrones de velocidades instantáneas, patrones de distribución espacial del recorrido, etc.).

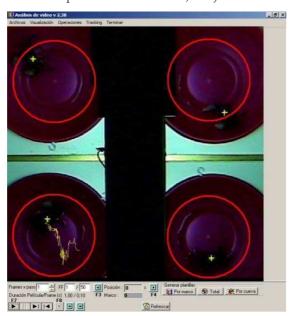


Figura 2.3: Metodología utilizada para medir la distancia recorrida por cada animal. Imagen del programa de rastreo donde se muestran las cuatro arenas experimentales registradas por la cámara de video, la delimitación del área donde se rastrea al animal (marcada por un círculo), y la posición del animal (marcada con una cruz).

En nuestro caso, de todos los parámetros posibles, elegimos utilizar la distancia total recorrida durante los 5 primeros minutos de la exposición al contexto, pues demostró ser un indicador consistente del proceso mnésico.

2.4.2. Protocolo experimental

Los experimentos incluyen una sesión de entrenamiento y una de evaluación, separadas por un intervalo de 48 h. Los animales se disponen en pares de grupos control (CT) o entrenados (TR).

En la sesión de entrenamiento los animales del grupo TR reciben una cantidad fija de alimento (pellets de conejo fraccionados, Nutrientes S.A., Argentina), ofrecida 5 minutos después de ser introducidos en los contenedores (tiempo de adaptación), mientras que los animales del grupo CT no reciben alimento. Se dejan transcurrir 30 minutos y se retira a los animales para alojarlos dentro de las cajoneras hasta la sesión de evaluación. Podemos distinguir entre los entrenamientos de tipo fuerte, que incluyen 80 mg de comida, y los de tipo débil, que incluyen 50 mg o menos. En el primer caso, la cantidad de alimento ofrecida permite la expresión de una memoria de largo término, mientras que en el segundo caso resulta insuficiente. La respuesta inicial del animal ante el alimento es la exploración del contenedor y una vez que encuentran la comida suelen consumirla inmediatamente, rompiéndola en pedacitos con sus pinzas. Como los contenedores tienen un fondo de agua, el alimento queda semi-sumergido en la misma, por lo que es probable que la detección de la comida se produzca en base a claves químicas disueltas. Luego de cada corrida experimental los contenedores se lavan asegurándose de que no queden restos de alimento en los mismos.

En la sesión de evaluación, los animales se colocan nuevamente en el contexto de entrenamiento y permanecen allí por 5 minutos, registrándose su actividad durante todo ese período. Es decir que en este caso no habría un período de adaptación, pues la evaluación comienza justo después de que los animales entran al contenedor. Si bien esto implicaría un efecto de arrastre debido al manipuleo, es un factor distribuido homogéneamente en todos los grupos.

La respuesta condicionada es un incremento en la exploración. Se considera operacionalmente que un grupo entrenado presenta retención de la memoria cuando su distancia media explorada es significativamente mayor que la del grupo control (TR>CT).

2.4.3. Análisis de los datos

El modo de análisis es igual al utilizado en el protocolo aversivo, comparando las respuestas de los grupos CT y TR durante la evaluación. En este caso, la predicción básica de los experimentos que incluyen al menos 80 mg de alimento es que habrá una diferencia significativa TR>CT en la sesión de evaluación, por lo que también se recurre a la estadística de comparaciones planeadas *a priori* luego de un ANOVA general que presente diferencias significativas (p<0.05).

2.5. Experimentos de doble aprendizaje

2.5.1. <u>Dispositivo</u>

Este tipo de experimentos implican la realización conjunta de los dos tipos de protocolos de entrenamiento descriptos previamente. El hecho de que ambos paradigmas compartan el contexto de entrenamiento permite la realización secuencial o simultánea de ambos protocolos. La metodología utilizada para medir la respuesta de los animales en ambos paradigmas fue la medición de la distancia total recorrida, mediante el dispositivo de video motion tracking. Es decir que en este caso la respuesta frente al EVP se determina a partir de registros de video, y no mediante las vibraciones traducidas por un micrófono.

2.5.2. Protocolo experimental

Los experimentos incluyen dos sesiones: la de entrenamiento y la evaluación, separadas por 24 h de intervalo. En la sesión de entrenamiento, los animales reciben los dos tipos de entrenamiento, ya sea sucesiva o simultáneamente. En la sesión de evaluación, se realiza un *test* apetitivo seguido inmediatamente por uno aversivo. El apetitivo consiste en registrar a través de las cámaras la actividad de los animales durante los 5 primeros minutos de exposición al contexto, mientras que en el *test* aversivo se registra a los animales durante un pasaje del EVP. Se determina el nivel de la respuesta de escape como la distancia total cubierta por los animales durante el ensayo de 9 seg.

2.5.3. Análisis de los datos

El tipo de análisis utilizado es coincidente con el comentado anteriormente para los protocolos aversivo y apetitivo. Se usan comparaciones planeadas entre los grupos CT y TR, luego de un ANOVA general significativo. Para la memoria aversiva se espera que la respuesta en la sesión de evaluación sea TR<CT, mientras que para la apetitiva se espera la tendencia opuesta, TR>CT.

2.6. <u>Drogas y procedimiento de invección</u>

La mayor parte de los experimentos de esta Tesis implican la administración de drogas a los animales. Para su aplicación se utiliza como vehículo 50 µl de solución salina de crustáceos (Hoeger & Florey, 1989). La inyección se realiza a través del lado derecho de la membrana cefalotorácica-abdominal, con una penetración de la aguja a 4 mm, controlada con una cánula. Se asegura de esta forma que la solución sea liberada en el centro del saco pericárdico. Debido a que los cangrejos no poseen barrera hematoencefálica (Abbott, 1970) y que la hemolinfa es distribuida a través de un extenso sistema de capilares (Sandeman, 1967), las sustancias inyectadas pueden llegar las diferentes áreas del sistema nervioso central.

Las drogas utilizadas son: octopamina (Sigma) en dosis que van de 10^{-5} M a 4.10^{-3} M (0,56 a 2,24 µg/g de animal), mianserina (Sigma) en dosis de 10^{-3} a 5.10^{-3} M (0,88 a 4,4 µg/g) y epinastina (donación de Boehringer Ingelheim Argentina) en dosis de 10^{-3} a 6.10^{-3} M (0,84 a 4,4 µg/g). Sin embargo, las concentraciones finales de las drogas en la hemolinfa son dos órdenes menores, considerando la dilución en un volumen hemolinfático de 5 ml (Gleeson & Zubkoff, 1977).

La mianserina y la epinastina están considerados antagonistas de la OA. La primera posee una estructura tetracíclica, tiene afinidad por los receptores neuronales de OA en insectos (Roedor, 1990) y ha sido utilizado como antagonista de OA en el sistema nervioso de la langosta *Locusta* (Degen *et al.*, 2000), la abeja *Apis* (Farooqui *et al.*, 2003) y la mosca *Drosophila* (Degen *et al.*, 2000; Farooqui *et al.*, 2003; Unoki *et al.*, 2005). Si bien se la utiliza generalmente como antagonista de OA, se une también a otros receptores de aminas, razón por la cual se la utiliza como antidepresivo en humanos, donde antagoniza los receptores presinápticos noradrenérgicos α1 y α2, y los serotoninérgicos 5HT2 y 5HT1C (Katz &

Sibel, 1982). Por otro lado, la epinastina está descrita como el antagonista de mayor especificidad de acción en insectos (Roeder *et al.*, 1998), aunque también constituye un antagonista histaminérgico en vertebrados (Kamei *et al.*, 1992).

2.7. <u>Protocolo experimental utilizado para el estudio del comportamiento agonístico</u>

Los animales son aislados en recipientes individuales opacos durante seis días antes de la realización experimento. Se incluye este período de aislamiento porque produciría un aumento en la motivación de los animales a iniciar una lucha (Cromarty *et al.*, 1999; Valzelli, 1973) y a su vez tendería a remover efectos de la experiencia previa (Guiasu & Dunham, 1999; Karavanich & Atema, 1998).

Se toma la medida del largo del caparazón y de la quela derecha de cada animal, y se programan enfrentamientos entre pares de igual tamaño (+/- 1 mm). Para distinguir ambos animales, dos días antes del enfrentamiento un miembro de de cada pareja se marca con un punto de Liquid Paper (BIC) en el caparazón dorsal, el cual no demostró ningún efecto deletéreo ni afectó el resultado de la pelea.

El día de la realización del experimento, cada animal es trasladado desde su contenedor individual hacia extremos opuestos de una arena de pelea, que consiste en una caja plástica opaca (12.5 x 25 x 15 cm) iluminada tenuemente desde arriba. La duración de cada encuentro es de 10 minutos. Las peleas son filmadas mediante una cámara digital Sony DCR-TRV22 colocada a una altura de 2 m, y posteriormente analizadas mediante un software diseñado a tal fin, que permite registrar el tiempo que cada animal destina a cada una de las categorías comportamentales y provee una curva temporal de la interacción. Las observaciones son realizadas de modo "ciego", sin conocer el tratamiento o la categoría de cada animal.

2.7.1. <u>Categorías de comportamiento agonístico e índices del desempeño durante</u> un enfrentamiento diádico

A partir de la observación de un gran número de enfrentamientos entre animales de igual tamaño, realizamos un etograma del comportamiento agonístico, registrando

diferentes categorías conductuales y su frecuencia. Encontramos que las siguientes categorías constituyen las más representativas de la actividad de los animales durante las peleas.

- -Aproximación: el animal camina hacia el oponente, pudiendo o no llegar al contacto físico.
- -Ataque: implica contacto físico entre los contrincantes. Puede ser mutuo, donde los dos animales se mantienen "agarrados" de las quelas, golpeándose intermitentemente, o bien de un animal hacia el otro.
- -Retroceso: implica el movimiento de un animal alejándose del otro, como consecuencia de una aproximación o un ataque.

Las aproximaciones y ataques son consideradas como actos dominantes, mientras que los retrocesos son actos sumisos. Además de estas tres categorías, también contabilizamos los comportamientos no agonísticos como la exploración y las caminatas no orientadas hacia el oponente.

Creamos los siguientes índices con el fin de evaluar el desempeño de los animales durante cada encuentro, establecer unívocamente cuál es animal dominante y el subordinado, y comparar la intensidad de los enfrentamientos.

- **Nivel de dominancia individual** (ND): es la diferencia entre el tiempo destinado a actos dominantes (aproximaciones y ataques) y el tiempo de actos sumisos (retroceso). El contrincante con el mayor ND es el dominante. A diferencia del ND, los otros índices utilizados corresponden a la pareja.
- -Tiempo total de interacción (TTI): es la suma total de todo el tiempo destinado a actos agonísticos, tanto dominantes como sumisos.

Capítulo 3

Papel de la octopamina en la memoria aversiva

3.1. Introducción

A partir de los datos reunidos en la introducción acerca de la multiplicidad de blancos de acción y de procesos fisiológicos regulados por la OA, resulta evidente que se trata de una molécula con un marcado carácter pleiotrópico de acción, incluso en una revisión reciente se la denomina como *la que todo modula* (Roeder, 2005). Algunos autores (Adamo, 2008; Bicker & Menzel, 1989; Sombati & Hoyle, 1984) consideraron a la OA como una orquestadora del comportamiento que permitiría una respuesta apropiada del individuo frente a situaciones de alta demanda energética, como las de lucha-huida. De este modo, la OA afectaría de modo coordinado a órganos de reserva energética, a músculos, al corazón, a órganos sensoriales y a circuitos nerviosos capaces de iniciar el comportamiento de huida. Si bien no es posible incluir dentro de este modelo a *todas* las acciones de la OA que han sido descriptas en la bibliografía, constituye una de las visiones más abarcadoras sobre la influencia de esta amina en la fisiología de los invertebrados.

En términos generales, la OA es considerada la correspondiente en los invertebrados a la catecolamina noradrenalina (NA) en vertebrados. El papel de la NA en procesos mnésicos ha sido ampliamente estudiado en diversos paradigmas de aprendizaje, fundamentalmente en condicionamientos de tipo aversivo en roedores, y se demostró que puede actuar como moduladora de la memoria de experiencias que inducen su liberación (Cahill & McGaugh, 1998; Cahill et al., 2001; Ferry et al., 1999). Ciertas memorias con componentes emocionales pueden ser facilitadas por tratamientos que provocan un aumento en los niveles de NA o que activan sus receptores; y deterioradas por tratamientos que reducen su liberación o bloquean sus receptores (McGaugh & Roozendaal, 2002; Roullet & Sara, 1998). Una de las características de sustancias moduladoras de la memoria como la NA es que su efecto dosis-respuesta no es lineal sino que adquiere una forma de "U invertida", donde las dosis bajas son inefectivas, las moderadas mejoran la retención, y las dosis altas son amnésicas (Gold, 2006). Respecto a las fases de la memoria que se ven afectadas por la señalización noradrenérgica, las evidencias no son coincidentes y dependen del paradigma de aprendizaje utilizado así como del tipo de aplicación y del área inyectada. Ciertos trabajos indican que la NA es necesaria en la fase de consolidación (Bevilaqua et al., 1997; Gallagher et al., 1977), mientras que otros estudios señalan un papel determinante de la NE sobre la evocación de la memoria (Murchison et al., 2004).

En nuestro caso, comenzamos a interrogarnos sobre la funcionalidad de la OA en la memoria aversiva (contexto-EVP) del cangrejo *Chasmagnathus*, la cual está basada en la

asociación de claves contextuales con la presentación de un estímulo visual de peligro (EVP).

<u>Objetivo</u>: estudiar de modo sistemático el papel de la OA sobre la memoria contexto-EVP, eligiendo analizar su efecto en diferentes fases del proceso mnésico: adquisición, consolidación, evocación y labilización-reconsolidación.

<u>Hipótesis</u>: la OA juega un papel en la memoria aversiva del cangrejo *Chasmagnathus* análogo al de la NA en los condicionamientos aversivos en los vertebrados. Por lo tanto, la OA constituiría una moduladora de la capacidad mnésica, capaz de potenciar o deteriorar la memoria de acuerdo a la dosis utilizada.

3.2. Resultados

3.2.1. <u>Primera parte</u>: Efecto de la OA sobre la fase de consolidación de la memoria aversiva

3.2.1.1. La administración de OA luego del entrenamiento tiene un efecto amnésico dosis-dependiente sobre la memoria aversiva

El primer paso para estudiar el posible rol de la OA en la memoria aversiva fue analizar los efectos provocados por su administración exógena.

Como primera aproximación, comenzamos utilizando dos dosis diferentes de una solución de OA: 10⁻⁴ M y 10⁻³ M. Este rango de dosis fue elegido en base a experimentos preliminares donde se encontró que no tenían ningún efecto sobre la postura ni la movilidad de los animales, tanto inmediatamente después de recibir la droga como a las 24 horas. Se utilizaron tres pares de grupos CT-TR: los TR recibieron 15 ensayos de entrenamiento y los CT permanecieron durante toda la sesión en los contenedores. Uno de los pares fue inyectado con una solución salina (par SAL), el segundo con una solución de OA en una dosis de 10⁻⁴ M (par 10⁻⁴) y el tercero con una solución de OA en una dosis de 10⁻³ M (par 10⁻³). En todos los casos las inyecciones fueron aplicadas inmediatamente después del entrenamiento. Al día siguiente se evaluó la retención de la memoria mediante la exposición de todos los animales al contexto de entrenamiento y el análisis de su

respuesta frente al pasaje del EVP. Los resultados de la sesión de evaluación se muestran en la **Figura 3.1.** Las comparaciones planeadas, realizadas luego del ANOVA general [F_{5,214}=3.183, p<0.01] revelan una diferencia significativa entre CT-SAL vs. TR-SAL (p<0.05) y CT-10⁻⁴ vs. TR-10⁻⁴ (p<0.05), pero no entre CT-10⁻³ vs. TR-10⁻³ (p=0.54). Es decir que una inyección de OA en una dosis de 10⁻³ M tendría un efecto amnésico sobre la memoria aversiva, y no así una de de 10⁻⁴ M.

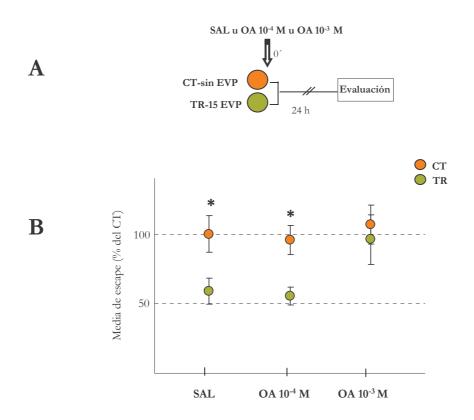


Figura 3.1: La **OA** tiene un efecto amnésico dosis dependiente sobre la memoria contexto-**EVP**. **A**) Esquema del diseño experimental utilizado. Sesión de entrenamiento: el círculo anaranjado representa al grupo CT y el verde al grupo TR. Se usaron tres pares de grupos CT-TR: SAL (N=35 por grupo), OA 10⁻⁴ (N=35 por grupo) y OA 10⁻³ (N=35 por grupo) inyectados inmediatamente después del entrenamiento (flecha). A las 24 h se realizó la sesión de evaluación, indicada por un rectángulo blanco. **B**) Resultado de la sesión de evaluación. Respuesta media de escape y error estándar (ES) normalizada respecto a la respuesta del grupo CT-SAL. Los círculos naranjas indican los grupos CT y los verdes los grupos TR. *:p<0.05

Adicionalmente, este experimento permite comparar la respuesta del grupo CT-SAL con la de los grupos CT inyectados con OA, y de este modo descartar un posible efecto inespecífico de la OA sobre la reactividad de los animales, el cual se evidenciaría tanto en grupos controles como entrenados. Los resultados muestran que los grupos CT-

10⁻⁴ y CT-10⁻³ no difieren significativamente del CT-SAL (p=0.8 y p=0.7, respectivamente), lo cual nos da la pauta de que la OA no está afectando la respuesta de los animales de modo generalizado.

A partir de estos resultados, se evidencia que la OA posee un efecto deletéreo dosis dependiente sobre la memoria contexto-EVP. Considerando que la inyección es aplicada después del entrenamiento, es probable que la droga esté afectando al proceso de consolidación de la memoria, aunque este punto va a ser analizado más específicamente en las siguientes secciones.

3.2.1.2. La administración de OA interfiere con la consolidación de la memoria dentro de una ventana temporal acotada

Habiendo encontrado un efecto amnésico de la OA aplicada inmediatamente después del entrenamiento, quisimos determinar la ventana temporal de efecto de la droga, la cual permite delinear qué etapas del proceso mnésico están viéndose afectadas por la acción de la droga. Además, el hallazgo de esta ventana temporal nos permite determinar si la droga actúa efectivamente sobre la formación de la memoria, o si en cambio provoca un efecto inespecífico de trazo más grueso que afectaría el desempeño de los animales en la evaluación.

En esta serie de experimentos se administró OA a distintos tiempos respecto de la finalización del entrenamiento: -15 minutos (pre-entrenamiento), 0 horas (inmediatamente después), 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas después. En todos los casos se usaron dos pares de grupos CT-TR, uno inyectado con solución salina (par SAL) y el otro con OA 10⁻³ M (par OA). La inclusión de un par-SAL por cada par-OA se debe a que estos experimentos no fueron realizados simultáneamente y que provienen de poblaciones con distintos niveles de actividad, por lo que en cada caso es necesario constatar la retención de la memoria en el grupo entrenado inyectado con SAL. En la **Figura 3.2** se muestran las respuestas en la sesión de evaluación para cada uno de los tiempos y en la **Tabla 3.1** se presentan los resultados correspondientes al análisis estadístico de los experimentos. Los resultados obtenidos muestran que la OA no afecta la retención de la memoria al aplicarla 15 minutos pre-entrenamiento, ni tampoco en un período de 1 a 4 horas después de finalizado el mismo. El efecto amnésico de la OA se aprecia únicamente al inyectarla 0 h y 30 minutos post-entrenamiento. Si tomamos en cuenta, a partir de datos obtenidos con inhibidores de la traducción, la transcripción, y de la quinasa PKA, que la consolidación de

la memoria contexto-EVP comienza habiendo transcurrido un número aproximado de 5-6 ensayos, y que continúa hasta aproximadamente 4-6 horas después (Locatelli *et al.*, 2002; Pedreira *et al.*, 1996), este resultado nos da la pauta de que la acción de la OA está restringida a una etapa temprana del proceso de consolidación.

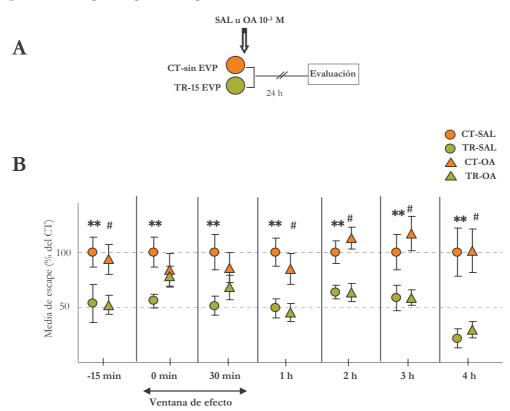


Figura 3.2: La OA tiene efecto amnésico en una ventana temporal acotada. A) Esquema del diseño experimental utilizado en 7 experimentos, donde se aplicó SAL u OA 10⁻³ M a -15 min, 0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h post-entrenamiento. Símbolos como en Fig 3.1. B) Resultado de la sesión de evaluación. Respuesta media y error estándar (ES) normalizada respecto a la respuesta del grupo CT-SAL. Los círculos indican los grupos inyectados con SAL y los triángulos con OA. La flecha demarca la ventana de efecto. **(p<0.01) para comparaciones entre CT y TR del par SAL y # (p<0.01) para comparaciones CT-TR del par OA. Ordenadas como en Fig 3.1

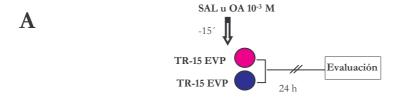
Tiempo	ANOVA general	CT-SAL vs. TR-SAL	CT-OA vs.TR-OA
-15 min	$F_{3, 156} = 2.995$ p = 0.032	p<0.05 (N=40)	p<0.05 (N=40)
0 h	$F_{3,152}$ = 3.355 p=0.021	p<0.005 (N=39)	p=0.37 (N=40) amnesia
30 min	F _{3,156} = 2.37 p=0.07	p<0.05 (N=40)	p=0.3 (N=40) amnesia
1 h	F _{3,156} = 6.67 p=0.0003	p<0.005 (N=40)	p<0.005 (N=40)
2 h	$F_{3,136} = 6.48$ $p = 0.0004$	p<0.05 (N=35)	p<0.005 (N=35)
3 h	F _{3, 156} =4.46 p=0.004	p<0.05 (N=40)	p<0.005 (N=40)
4 h	$F_{3,156} = 5.58$ p = 0.0011	p<0.05 (N=40)	p<0.005 (N=40)

Tabla 3.1: Estadística correspondiente a los experimentos presentados en la Figura 3.2

3.2.1.3. La OA no interfiere con la adquisición de la memoria contexto-EVP

En la serie de experimentos recién comentados se comprobó que una inyección de OA en una dosis de 10⁻³ M aplicada previamente al entrenamiento no afectaba la retención de la memoria. Sin embargo, al estar presente la droga en el sistema durante el entrenamiento, podría ocurrir que se vea alterada de algún modo la adquisición, por ejemplo mediante un cambio en la reactividad de los animales frente al pasaje de la figura. Considerando los datos bibliográficos que vinculan a la OA con la sensibilización del sistema visual (Stern, 2009; Bacon *et al.*, 1995) y con la modulación de músculos periféricos (Evans & Siegler, 1982), resulta apropiado cuestionarse sobre los efectos que podría tener sobre el proceso de adquisición de la memoria.

Se evaluaron las respuestas frente al EVP durante los 15 ensayos de entrenamiento de animales inyectados con solución salina o con la dosis de 10⁻³ M de OA.



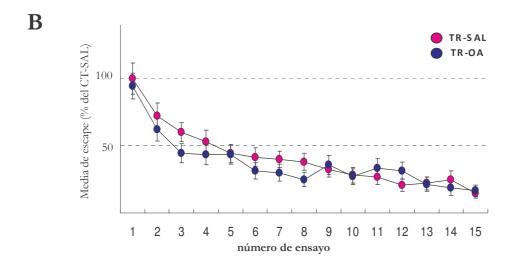


Figura 3.3: La OA no afecta la adquisición de la memoria aversiva. A) Esquema del diseño experimental utilizado. Sesión de entrenamiento: el círculo rosa representa al grupo TR-SAL y el azul al TR-OA. Se inyectó SAL u OA 10⁻³ M (N=37 por grupo), 15 minutos antes del entrenamiento (flecha). B): Resultado de la sesión de entrenamiento. Repuesta media al EVP y error estándar normalizada respecto a la respuesta media del primer ensayo de entrenamiento del grupo TR-SAL. Círculos rosas para TR-SAL y azules para TR-OA.

La **Figura 3.3** muestra que no habría diferencias entre los grupos TR-SAL y TR-OA, lo que se confirma estadísticamente con un ANOVA de medidas repetidas [$F_{1,78}$ =0.29, p=0.58 para la comparación entre grupos, $F_{14,1092}$ = 42.59, p<0.0001 para el efecto de los ensayos, y $F_{14,1092}$ =1.4, p=0.14 para la interacción ensayos × grupo]. Es decir, la inyección previa de la droga parece no alterar la respuesta de escape durante el entrenamiento.

Este resultado demuestra que la OA no produce perturbaciones motoras o sensoriales que se expresen por alteraciones durante el entrenamiento. Por lo tanto, hasta el momento los resultados obtenidos revelan un efecto únicamente sobre la fase temprana de consolidación de la memoria.

3.2.1.4. La OA no tiene efecto sobre la evocación de la memoria contexto-EVP al aplicarla media hora antes de la evocación

Si bien la fase de la evocación constituye un paso fundamental en el procesamiento mnésico, los mecanismos que la sirven resultan en gran medida una incógnita (Miller & Sweatt, 2006). Sin embargo, se sabe que es una fase altamente susceptible a ser modulada, tanto positiva como negativamente (Sara, 2000).

En nuestro caso, quisimos determinar si la OA afectaba la evocación de la memoria aversiva. Para esto, realizamos un experimento donde utilizamos dos pares de grupos CT-TR, los cuales fueron inyectados con una solución salina (par SAL) o una de OA 10⁻³ M (par OA), media hora antes de la sesión de evaluación. Se eligió este tiempo en base a resultados que demuestran un efecto deletéreo de la inyección aplicada inmediatamente antes de la evaluación. De este modo, si la OA interfiriera con la evocación, no debería expresarse retención de la memoria en el grupo TR-OA. Sin embargo, los resultados obtenidos [ANOVA F_{3,156}=2,98; p<0.05], desplegados en la **Figura 3.4**, muestran una diferencia significativa tanto para CT-SAL *vs.* TR-SAL como para CT-OA *vs.* TR-OA (p<0.05 en ambos casos).

Por lo tanto, la OA no afectaría la evocación de la memoria contexto-EVP al aplicarla media hora antes de la evaluación en una dosis de 10⁻³ M, lo cual lleva a plantear, en conjunto con los resultados previos, que su efecto amnésico no se relaciona con una inapropiada evocación de la memoria sino con un déficit en el proceso de almacenamiento durante la consolidación.

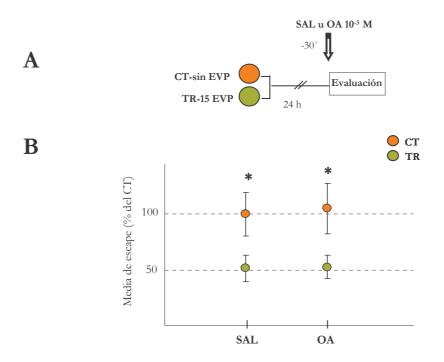


Figura 3.4: La OA no afectaría la evocación de la memoria. A): Esquema del diseño experimental utilizado. Sesión de entrenamiento. Dos pares de grupos CT-TR: SAL (N=40 por grupo) y OA (N=40 por grupo), inyectados 30′ antes de la sesión de evaluación (flecha). Símbolos como en Fig 3.1. B): Resultado de la sesión de evaluación. Respuesta media y error estándar (ES) normalizada respecto a la respuesta del grupo CT-SAL. *(p<0.05). Ordenadas y símbolos como en Fig 3.1

3.2.1.5. Los antagonistas de OA no afectan la retención de la memoria

Si bien los resultados obtenidos hasta el momento dan cuenta de un efecto deletéreo de la OA exógena sobre la memoria, cabe aún la posibilidad de que la OA endógena constituya un requerimiento en la formación de la traza mnésica aversiva. Si esto fuera efectivamente así, el efecto amnésico podría deberse a una desregulación de los niveles normales de OA que lleve a una consecuente desregulación neuroquímica del proceso de consolidación.

El objetivo del siguiente experimento es evaluar si la OA endógena constituye un requerimiento para la consolidación de la memoria aversiva. Para esto se probó la acción de dos antagonistas de OA sobre la memoria: la mianserina y la epinastina (ver Capítulo 2, Sección 2.6). Se usaron tres pares de grupos CT-TR: uno inyectado con salina (par SAL), el segundo con mianserina en una dosis de 10⁻³ M (par MIAN) y el tercero con epinastina en una dosis de 10⁻³ M (par EPI). La inyección se aplicó inmediatamente después del entrenamiento. El resultado se muestra en la **Figura 3.5**.

Las comparaciones planeadas [ANOVA, $F_{5,190}$ =5.164, p<0.0005] revelaron diferencias significativas (TR<CT) entre los tres pares de grupos CT-TR [SAL: p<0.05; MIAN: p<0.0005; EPI: p<0.05]. El resultado obtenido indica que la OA no sería una condición esencial para la formación de la memoria aversiva debido a que al bloquear sus receptores con un antagonista se puede de todos modos consolidar la memoria contexto-EVP.

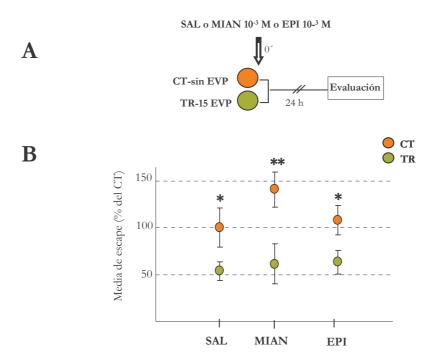


Figura 3.5. Los antagonistas de OA no inhiben la memoria aversiva. A) Esquema del diseño experimental utilizado. Sesión de entrenamiento. Tres pares de grupos CT-TR: SAL (N=30 por grupo), MIAN (N=30 por grupo) y EPI (N=38 por grupo), inyectados 0 h post-entrenamiento (flecha). Símbolos como en Fig. 3.1. B) Resultado de la sesión de evaluación. Respuesta media y error estándar (ES) normalizada respecto a la respuesta del grupo CT-SAL. Ordenadas y símbolos como en Fig 3.1

3.2.1.6. Comprobación de la especificidad de acción de la OA mediante el uso de un antagonista, la mianserina

Hasta el momento, los experimentos realizados utilizando una aplicación de OA exógena daban por sentado que la misma actúa sobre sus propios receptores en el sistema nervioso, causando un efecto biológico apreciable. Ahora bien, es necesario descartar que la acción de la OA no se deba a una acción sobre otros receptores, tal vez de aminas relacionadas, y que el efecto atribuido a la misma sea producto de una reacción cruzada. En

el siguiente experimento, el objetivo es determinar si el efecto amnésico de la OA puede revertirse mediante una co-administración de la misma con un antagonista, la mianserina. Se utilizaron 3 pares de grupos CT-TR: el primero recibió una inyección de salina (par SAL), el segundo una de OA 10⁻³ M (par OA), y el tercero una del cóctel de OA+mianserina (par OA+MIAN), con una concentración de 10⁻³ M cada uno, es decir, concentraciones equimolares. En todos los casos la aplicación se realizó inmediatamente después del entrenamiento. Los resultados se muestran en la **Figura 3.6**.

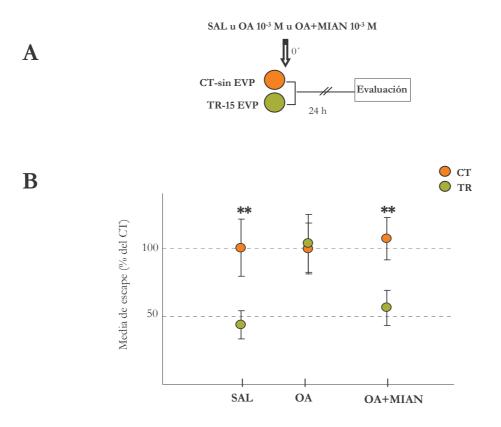


Figura 3.6. El efecto amnésico de la OA puede ser revertido por un antagonista. A): Esquema del diseño experimental utilizado Sesión de entrenamiento. Tres pares de grupos CT-TR: SAL (N=30 por grupo), OA 10-3 M (N=31 por grupo) y OA+MIAN OA 10-3 M (N=34 por grupo), inyectados 0 h post-entrenamiento (flecha). Símbolos como en Fig.3.1. B): Resultado de la sesión de evaluación. Respuesta media y error estándar (ES) normalizada respecto a la respuesta del grupo CT-SAL. Ordenadas y símbolos como en Fig 3.1

Las comparaciones planeadas luego del ANOVA general [F_{5,232}=2.46; p<0.05], revelaron diferencias significativas entre los grupos CT y TR (indicativa de retención de la memoria) para los pares SAL (p<0.005) y OA+MIAN, (p<0.05) y no significativas para el

par OA (p=0.87). Es decir que la mianserina fue capaz de revertir el efecto amnésico de la OA, por lo que se puede concluir que el antagonista utilizado bloqueó los receptores octopaminérgicos impidiendo así la unión de la OA a los mismos. La posibilidad de que la reversión de la amnesia se deba simplemente a que la mianserina causa una disminución de la respuesta resulta muy improbable, dado que el grupo CT-OA+MIAN tiene una respuesta similar al grupo inyectado con vehículo. Este resultado nos permite entonces concluir que la acción de la OA ocurriría fundamentalmente a través de la unión con sus propios receptores. Asimismo, el hecho de que la dosis del antagonista capaz de revertir el efecto amnésico coincida con la dosis de OA (10⁻³ M), indicaría que la afinidad del antagonista por su receptor es similar a la de la OA.

3.2.1.7. Ni las dosis menores de OA ni el antagonista mianserina poseen efectos facilitatorios sobre la memoria

Nuestros resultados hasta el momento demuestran un efecto amnésico de la OA en una dosis de 10⁻³ M, lo cual contrasta con la hipótesis propuesta de que la OA tendría un papel análogo al de la noradrenalina (NE), ya que una gran cantidad de estudios demostraron que la NE posee un rol facilitatorio sobre memorias de miedo (Cahill & McGaugh, 1998). Por esta razón, nos propusimos analizar:

- a) Si la OA puede facilitar la memoria contexto-EVP, utilizando dosis más bajas que las usadas en los experimentos previos. La lógica de este proceder es que las sustancias moduladoras de la capacidad mnésica pueden resultar amnésicas en dosis altas y facilitadoras en dosis bajas (Gold, 2006), con lo cual podría ocurrir que la OA tuviera un efecto dual sobre la consolidación dependiendo de su dosis.
- b) Si la aplicación de antagonistas de OA posee un papel facilitador sobre la memoria. Considerando que la OA tiene un efecto amnésico, es posible suponer que al antagonizar su acción se pueda obtener una facilitación de la memoria.

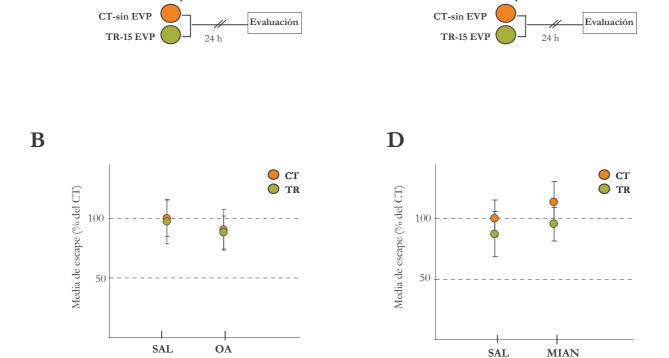
En esta serie de experimentos se utilizó un protocolo de entrenamiento débil de 6 ensayos. Como vimos en el Capítulo 2, esta cantidad de ensayos resulta insuficiente para que se exprese retención de la memoria a las 24 horas. Por lo tanto este protocolo permite evaluar la acción de agentes facilitadores.

En primer lugar, analizamos el efecto de dos dosis bajas de OA en relación a la dosis amnésica: 10⁻⁴ M y 10⁻⁵ M. La primera de estas ya había sido utilizada previamente con el protocolo de 15 ensayos (ver Figura 3.1), demostrando no poseer efectos sobre la

SAL o MIAN 10-5 M

memoria. Realizamos dos experimentos: en ambos se usaron dos grupos CT-TR, donde los animales fueron entrenados con 6 ensayos, uno de los pares recibió solución salina (par SAL), y el otro (par OA) una solución de OA en dosis bajas: 10⁻⁴ M en el primer experimento, y 10⁻⁵ M en el segundo. En todos los casos la inyección fue aplicada inmediatamente después del entrenamiento. Los resultados de ambos experimentos son coincidentes (ver **Figura 3.7A**, correspondiente a la dosis de 10⁻⁵ M). Conforme a la predicción [ANOVA: F_{3,156}=0.38; p=0.77 para 10⁻⁴ M ; F_{3,156}=0.16; p=0.92 para 10⁻⁵ M], no se observa una diferencia significativa entre los grupos CT-TR del par SAL en ninguno de los dos casos (comparaciones planeadas par SAL: p=0.62 para 10⁻⁴ M y p=0.95 para 10⁻⁵ M) dado el número insuficiente de ensayos recibidos. Por otro lado, el tratamiento con OA no afectó esta tendencia, no evidenciándose diferencias significativas entre los grupos CT-TR con ninguna de las dos dosis utilizadas (comparaciones planeadas par OA: p=0.47 para 10⁻⁴ M y p=0.99 para 10⁻⁵ M). Es decir que la OA en dosis bajas no poseería un efecto facilitador sobre la consolidación de la memoria contexto-EVP.

C



SAL u OA 10-5 M

A

Figura 3.7. Ni las dosis bajas de OA ni el antagonista miaserina facilitan la memoria aversiva. A) Esquema del diseño experimental utilizado. Sesión de entrenamiento. Dos pares de grupos CT-TR: SAL (N=40 por grupo) y OA 10-5 M (N=40 por grupo) aplicadas 0h post-entrenamiento. Símbolos como en Fig. 3.1. **B**) Resultado de la sesión de evaluación. Respuesta media y error estándar (ES) normalizada respecto a la respuesta del grupo CT-SAL. Ordenadas y símbolos como en Fig. 3.1. **C**) Esquema del diseño experimental utilizado. Sesión de entrenamiento. Dos pares de grupos CT-TR: SAL (N=35 por grupo) y MIAN 10-5 M (N=35 por grupo) aplicadas 0h post-entrenamiento. Símbolos como en Fig. 3.1. **D**) Resultado de la sesión de evaluación. Respuesta media y error estándar (ES) normalizada respecto a la respuesta del grupo CT-SAL. Ordenadas y símbolos como en Fig 3.1

En segundo lugar, analizamos el posible efecto facilitador del antagonista mianserina sobre la memoria contexto-EVP. Se usaron dos pares de grupos CT-TR, donde los animales TR recibieron 6 ensayos de entrenamiento. Uno de los pares recibió una inyección de solución salina (par SAL), y el otro par una inyección del antagonista en una concentración de 10⁻³ M (par MIAN), en ambos casos aplicadas inmediatamente después de finalizada la sesión de entrenamiento débil. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.7B**, y el análisis de los mismos revela que ninguno de los dos pares de grupos CT-TR presenta diferencias significativas (comparaciones planeadas: p=0.85, p=0.79 para el par SAL y MIAN respectivamente, realizadas luego del ANOVA F_{3,156}=0.05, p=0.98). Por lo tanto, la inhibición de la OA endógena con estas concentraciones del antagonista no facilitaría la memoria contexto-EVP.

3.2.2 <u>Segunda parte</u>. Efecto de la OA sobre la reconsolidación de la memoria aversiva

Como fue comentado en el Capítulo 1, una amplia serie de evidencias experimentales demostraron que al evocarse una memoria ya consolidada, ésta puede hacerse nuevamente susceptible a la acción de agentes de interferencia o de facilitación, dando comienzo a un proceso de re-estabilización de la traza mnésica que se denominó reconsolidación. A pesar de que su nombre daría a entender que durante la misma se "recapitula" lo ocurrido durante la consolidación de la memoria, esta concepción ha sido objeto de muchas críticas (Alberini, 2005) y actualmente la identidad de los mecanismos involucrados en la fase de reconsolidación es materia de debate (Debiec et al., 2002; Lee et al., 2004; Myers & Davis, 2002; Salinska et al., 2004). Por un lado, se admite que la reconsolidación depende de la síntesis de novo de proteínas y de ARNs mensajeros, así como de ciertos factores de transcripción y neurotransmisores, mecanismos coincidentes con los de la fase de consolidación (Boccia et al., 2006; Eisenberg & Dudai, 2004; Kida et al., 2002). Por ejemplo, se demostró que la noradrenalina constituye un requerimiento en la reconsolidación de una memoria de evitación inhibitoria en ratas (Przybyslawski et al., 1999), y lo mismo ocurría en la consolidación: en ambos casos se necesita la cascada de eventos intracelular activada por la unión a receptores β-adrenérgicos. Sin embargo, ciertos trabajos sugieren que los mecanismos serían disímiles en ambos procesos (Lee et al; 2005), o que tendrían diferente dinámica temporal, o bien que las moléculas implicadas actuarían en áreas del cerebro diferentes en cada caso (Taubenfeld et al., 2001).

En el paradigma de memoria contexto-EVP del cangrejo *Chasmagnathus* se comprobó que la memoria consolidada puede volver a un estado lábil como consecuencia de una exposición breve al contexto de entrenamiento (Pedreira *et al.*, 2002) a lo cual seguiría una fase de reconsolidación de la memoria, por lo cual se denomina al proceso conjuntamente como *labilización-reconsolidación*. Se demostró que la misma es dependiente de los mecanismos de síntesis *de novo* de proteínas (Pedreira & Maldonado, 2003), del factor de transcripción NF-KB (Merlo *et al.*, 2005), y que podía ser modulada positivamente por la angiotensina (Frenkel *et al.*, 2005) y negativamente por GABA (Carbo-Tano *et al.*, 2008) y serotonina (Pedetta, comunicación personal).

En la presente sección se evaluó el papel de la OA en el proceso de labilización-reconsolidación de la memoria contexto-EVP. En todos los experimentos de esta sección la dosis de OA utilizada fue de 10⁻³ M, la cual resultaba amnésica en la consolidación de la memoria.

3.2.2.1. La inyección de OA 10⁻³ M causa un efecto amnésico sobre la labilización-reconsolidación en una ventana temporal acotada

En la siguiente serie de tres experimentos se evaluó el efecto de la administración de OA a diferentes tiempos del período de reexposición: 30 minutos antes, 30 minutos después y 2 horas después. No se utilizaron inyecciones inmediatamente antes o después de la reexposición pues demostraron interferir inespecíficamente con el proceso. En todos los casos se utilizaron dos pares de grupos CT-TR. En la sesión de entrenamiento los grupos entrenados recibieron 15 ensayos de entrenamiento, mientras que los controles permanecieron en los contenedores. Durante la sesión de reexposición, realizada 24 horas después, los animales fueron colocados nuevamente en el contexto de entrenamiento durante 5 minutos, tras los cuales vuelven a los recipientes individuales. Uno de los pares CT-TR fue inyectado con solución salina (par SAL) y el otro con una solución de OA 10⁻³ M (par OA) ya sea media hora antes de ser reexpuestos al contexto de entrenamiento, o bien media hora o dos horas después. Finalmente, el tercer día todos los grupos fueron evaluados en su nivel de respuesta frente al pasaje del EVP.

La **Figura 3.8** muestra los valores de las respuestas medias en la sesión de evaluación para los tres experimentos. El análisis de comparaciones planeadas *a priori*,

realizado luego de un ANOVA de un factor [30 min pre: $F_{3,140}$ = 2.71; p<0.05; 30 min post: $F_{3,126}$ =5.03; p<0.005; 2 h post: $F_{3,136}$ =8.7; p<0.0005] mostró una diferencia significativa entre CT-SAL vs. TR-SAL en los tres casos (30 min pre: p<0.05; 30 min post: p<0.05; 2 h post: p<0.005). Por otro lado, la diferencia entre CT-OA vs. TR-OA mostró ser no significativa en el experimento de 30 min pre (p=0.14), y significativa en el caso de 30 min post y 2 h post (30 min: p<0.005; 2 h: p<0.005).

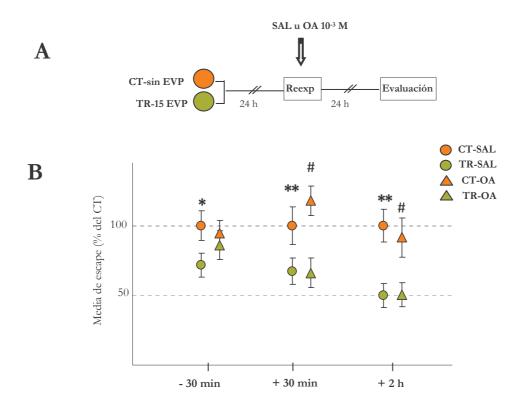


Figura 3.8: La OA tiene un efecto amnésico sobre la reconsolidación dentro de un rango temporal limitado. A) Esquema del diseño experimental utilizado en 3 experimentos. Sesión de entrenamiento para cada caso. Dos pares de grupos CT-TR: un par SAL y otro OA, inyectados a -30 min (pre-reexposición, N=40 por grupo), +30 min (N=35 en par SAL y N=30 en par OA) y +2h post-reexposición (N=35 por grupo). El rectángulo "Reexp" indica la sesión de reexposición al contexto de entrenamiento. Otros símbolos como en Fig 3.1. B) Resultado de la sesión de evaluación. Respuesta media y error estándar (ES) normalizada respecto a la respuesta del grupo CT-SAL. Los círculos indican los grupos inyectados con SAL y los triángulos con OA. *: (p<0.05), **: (p<0.01) para comparaciones entre CT y TR del par SAL y # (p<0.01) para comparaciones CT-TR del par OA. Ordenadas como en Fig 3.1

Estos resultados indican un efecto amnésico de la OA cuando se aplica 30 minutos antes de la reexposición, y no al inyectarla 30 minutos o 2 horas post-reexposición. La posibilidad de explicar este resultado en términos de un efecto de la OA sobre la evocación de la memoria resulta poco viable, pues ya vimos previamente que la OA no tiene efecto sobre este proceso al aplicarla media hora antes (ver Figura 3.4). Es decir que, al igual que lo ocurrido sobre la consolidación, la OA posee un efecto amnésico sobre la reconsolidación de la memoria contexto-EVP y la ventana temporal de efecto es de corta duración.

3.2.2.2. La OA tiene un efecto amnésico sólo cuando la memoria es evocada y labilizada por la reexposición al mismo contexto que el del entrenamiento

El objetivo del siguiente experimento fue verificar si el efecto amnésico de la OA se produce como consecuencia de la labilización de la memoria inducida por la exposición de los animales al contexto del entrenamiento. En el paradigma de la memoria aversiva del cangrejo *Chasmagnathus* está demostrado que la evocación depende de que las claves contextuales sean coincidentes con las del entrenamiento (Hermitte *et al.*, 1999; Tomsic *et al.*, 1998). A partir de este antecedente, utilizamos el procedimiento de cambio de claves contextuales durante la sesión de reexposición como artilugio para impedir la evocación de la memoria (Pedreira & Maldonado, 2003) y de este modo analizar si la OA requiere o no esta evocación para causar su efecto amnésico.

Se usaron dos pares de grupos CT-TR: en la sesión de entrenamiento los grupos TR recibieron 15 ensayos de TR y los CT permanecieron en el contexto. El segundo día todos los animales fueron inyectados con OA 30 minutos antes de la reexposición, pero en esta ocasión uno de los pares fue expuesto a un contexto diferente (par DIF), mientras que el otro par se expone al mismo contexto que el del entrenamiento (par IGUAL), ambos durante 5 minutos Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.9**. Estadísticamente [ANOVA F_{3,136}=2.79, p<0.05] se vio que los grupos CT-igual y TR-igual no muestran diferencias significativas (p=0.23), mientras que lo opuesto ocurre entre CT-dif y TR-dif (p<0.005). Como puede apreciarse, el efecto amnésico de la OA sólo se evidencia si la memoria es evocada y labilizada mediante la reexposición de los animales al mismo contexto del entrenamiento, interfiriendo posiblemente con el mecanismo de re-estabilización de la

memoria: el proceso de reconsolidación.

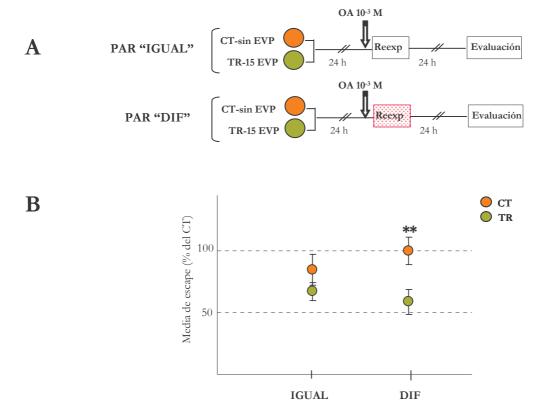
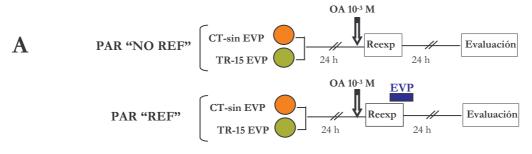


Figura 3.9: La OA inhibe la reconsolidación sólo cuando la reexposición ocurre en el contexto de entrenamiento. A) Esquema del diseño experimental utilizado. Sesión de entrenamiento. Dos pares de grupos CT-TR: IGUAL (contexto congruente, N=31 por grupo) y DIF (contexto incongruente, N=32 por grupo), inyectados con OA 30 min pre-reexposición. El rectángulo con puntos rosas indica la sesión de reexposición en un contexto diferente al del entrenamiento. Otros símbolos como en Fig 3.8. B) Resultado de la sesión de evaluación. Respuesta media y error estándar (ES) normalizada respecto a la respuesta del grupo CT-DIF. Ordenadas como en Fig 3.1

3.2.2.3. La OA tiene efecto amnésico sólo si la reexposición no incluye la presentación del refuerzo

El estudio de la reconsolidación de la memoria en *Chasmagnathus* demostró que la labilización ocurrida ante la reexposición al contexto de entrenamiento sería consecuencia de una discrepancia entre lo que el animal espera que ocurra –el pasaje del EVP- y lo que efectivamente ocurre -el no pasaje del EVP- (Pedreira *et al.*, 2004). Es decir, la labilización requiere de la ausencia del refuerzo durante la reexposición. Utilizamos este antecedente en el diseño del siguiente protocolo experimental, con el objetivo de confirmar si la acción de la OA sólo ocurre cuando la memoria se labiliza.

Se usaron dos pares de grupos CT-TR. En la sesión de entrenamiento los grupos TR recibieron 15 ensayos y los CT permanecieron en el contexto. En la sesión de reexposición, ambos pares fueron inyectados con una solución de OA 10⁻³ M 30 minutos antes de la reexposición, pero en esta ocasión luego de los 5 minutos de exposición al contexto uno de los pares recibió un pasaje de la figura (par REF), mientras que el otro par no recibió refuerzo (par NO-REF). Los resultados se muestran en la **Figura 3.10** y el análisis estadístico [ANOVA general F_{3,156}=4.04, p<0.005] indica que el par REF presenta diferencias significativas entre los grupos CT y TR (p<0.005), mientras que en el par NO REF la diferencias entre CT y TR son no significativas (p=0.2). Es decir que aún cuando los dos pares recibieron la droga antes de la reexposición, sólo se evidencia un efecto amnésico de la OA en el par que no recibió el refuerzo, mientras que el reforzado demuestra una retención normal. Esto indicaría que, ante el cumplimiento de la expectativa, la memoria no se labilizaría y por lo tanto la OA no consigue alterar el proceso de reconsolidación.



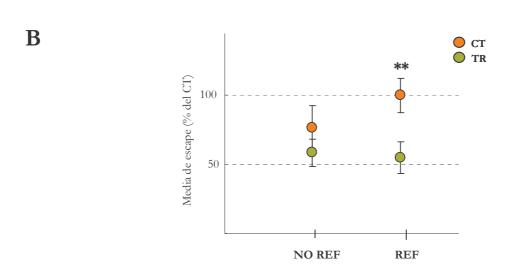


Figura 3.10. La OA tiene un efecto amnésico sobre la reconsolidación sólo si la reexposición no incluye la presentación del EVP. A) Esquema del diseño experimental utilizado. Sesión de entrenamiento. Dos pares de grupos CT-TR: NO REF (sin pasaje del EVP, N=40 por grupo) y REF (recibe un pasaje del EVP luego de la reexposición, N=40 por grupo), inyectados con OA 30 min pre-reexposición. El rectángulo azul indica el EVP. Otros símbolos como en Fig 3.8. B) Resultado de la sesión de evaluación. Respuesta media y error estándar \$\mathcal{D}S) normalizada respecto a la respuesta del grupo CT-REF. Ordenadas como en Fig 3.1

3.3. Conclusiones y Discusión

Analizando el conjunto de resultados obtenidos acerca del papel de la OA sobre las diferentes etapas del procesamiento de la memoria contexto-EVP, podemos destacar ciertos aspectos fundamentales. En primer lugar, la OA en una dosis de 10⁻³ M posee un efecto deletéreo sobre la memoria que se evidencia tanto en el proceso de consolidación (Figuras 3.1 y 3.2) como en el de la reconsolidación (Figura 3.8), pero no sobre la adquisición (Figura 3.3) ni evocación (Figura 3.4). Este efecto ocurriría a través de una interacción específica de la OA con sus receptores (Figura 3.6) y no podría atribuirse a una alteración inespecífica sobre la respuesta de los animales. Es decir que la OA actúa sobre las fases del proceso mnésico que implican una estabilización de la información adquirida en el entrenamiento o la reexposición. Asimismo, la ventana temporal de efecto de la droga sería muy breve en las dos fases, acotada a tiempos cercanos al fin del entrenamiento (Figura 3.2) y la reexposición (Figura 3.8). Es importante tener en cuenta que la vida media de la OA en la hemolinfa se estima en unos 10-20 minutos, a partir de datos obtenidos en cangrejos de una especie relacionada (Hoeger & Florey, 1989). Por lo tanto la droga tendría efectos biológicos en un acotado rango temporal, cercano al momento de la invección, actuando en una etapa temprana del proceso de consolidación y reconsolidación, lo cual es coincidente con la dinámica de acción de agentes moduladores de la capacidad mnésica. Por ejemplo, el muscimol, un agonista de GABA utilizado en el modelo de memoria de Chasmagnathus, muestra un efecto amnésico sólo hasta media hora después del entrenamiento (Carbo-Tano et al., 2008).

Las evidencias obtenidas parecen señalar a la OA como integrante del variado grupo de sustancias moduladoras de la memoria, dado que no constituye un requerimiento esencial del mecanismo de la consolidación (vimos que el bloqueo de la OA endógena no tendría un efecto apreciable sobre la memoria con las dosis y tiempos analizados, Figura 3.5), sino que interfiere con el mismo. El porqué de esta interferencia es la gran incógnita que nos surgió ante estos resultados. Una posibilidad podría haber sido que la OA, al igual que otros moduladores, fuera amnésica al usar dosis altas, y facilitadora en dosis menores. Pero los resultados obtenidos con dosis bajas no revelan efectos potenciadores de la memoria (Figura 3.7 A). Asimismo, consideramos la posibilidad de que la OA endógena fuera una moduladora negativa de la capacidad mnésica, con lo cual al bloquearla debería obtenerse una facilitación. Pero vimos que la inyección de un antagonista no logró facilitar la consolidación de una memoria generada por un entrenamiento débil (Figura 3.7 C). Si

bien es posible que estos dos últimos resultados, al ser negativos, tengan explicaciones alternativas (que la dosis no fue la adecuada, o el tiempo de inyección, etc), nos conducen a la idea de que la OA no formaría parte *per se* del proceso de consolidación de la memoria aversiva Pero aún queda el interrogante sobre el porqué de su efecto amnésico tan consistente. Intentaremos desentrañar esta cuestión a medida que vayamos avanzando en esta discusión y en el siguiente capítulo.

Respecto a la acción de la OA en la fase de la reconsolidación de la memoria, los resultados de este capítulo indican que modula negativamente el proceso, al igual que lo ocurrido en la consolidación. Sin embargo, la ventana temporal de efecto sería diferente en ambos casos: la OA demostró un efecto amnésico únicamente cuando se la aplica media hora antes de la reexposición, lo cual contrasta con la consolidación, donde las inyecciones efectivas eran las post-entrenamiento. Esto podría ser consecuencia de una dinámica temporal diferente de los dos procesos: considerando que la reexposición es de tan sólo 5 minutos, una inyección 30 min post-reexposición tal vez resulta tardía para actuar sobre una etapa temprana del proceso de reconsolidación. Adicionalmente, los resultados indican que la OA sólo es efectiva cuando los animales son reexpuestos al mismo contexto de entrenamiento (Figura 3.9). Esto nos indica que la droga puede actuar sólo cuando el sistema se "abre" y se vuelve vulnerable mediante la reactivación de la memoria disparada ante la presentación del recordatorio. Si las claves no coinciden con las del entrenamiento, la invección de OA no causa un efecto pues justamente no se estaría reactivando la memoria original (Pedreira et al., 2002). Finalmente, la OA tampoco es efectiva cuando la reexposición incluye la presentación del refuerzo (Figura 3.9), lo cual sería consecuencia de que, al cumplirse la expectativa, el sistema cerraría su susceptibilidad y se haría inmune a tratamientos moduladores (Pedreira et al., 2004). El conjunto de resultados indicarían que la acción de la OA ocurre específicamente sobre el proceso de re-estabilización de la marca mnésica, subsecuente a la evocación y la labilización de la memoria.

El hecho de que la OA posea un efecto similar sobre las fases de consolidación y reconsolidación apoya la visión de que ambos procesos compartirían ciertos mecanismos subyacentes (Alberini, 2005). Esto no implica que la reconsolidación recapitule íntegramente lo que acontece durante la consolidación (Dudai, 2006), dado que los dos procesos tendrían perfiles temporales diferentes, como se comprobó en el caso de la OA, y además existen ejemplos de moléculas no compartidas por ambas fases (Miller & Sweatt, 2006). Por otro lado, el hallazgo de un efecto modulador sobre la reconsolidación resulta

consistente con la idea formulada (aunque no demostrada fehacientemente) de que durante este proceso se podría incorporar nueva información a la traza mnésica original, actualizando de este modo la situación a las condiciones presentes durante la reactivación (Duvarci & Nader, 2004; Dudai, 2006).

Si bien una serie de trabajos asignan a la OA un papel mediador del estado de alerta o arousal (Adamo et al., 1995; Bacon et al., 1995; Farooqui, 2007) ante una variedad de estímulos, en nuestro caso no evidenciamos ningún efecto de la droga en la reactividad de los animales frente al EVP. Por un lado, las inyecciones pre-entrenamiento no afectaron la curva de adquisición, y por otro lado una aplicación pre-evaluación no impidió la subsiguiente retención de la memoria. Sin embargo, existe la posibilidad de que la acción de la OA no se evidencie como un aumento o disminución en el nivel de respuesta. En Chasmagnathus, se demostró que la angiotensina puede facilitar la evocación de la memoria (Frenkel et al., 2002), posiblemente mediante un aumento en el nivel de atención selectiva de los animales frente a las claves contextuales. Por lo tanto, es posible que la OA pueda también facilitar la evocación, aunque no ha sido específicamente evaluado en nuestros experimentos.

Si consideramos los resultados a la luz de la hipótesis de que la OA actuaría de modo análogo a la NA en procesos de memoria de vertebrados, encontramos evidencias a favor y en contra. Entre las coincidencias, podemos decir que ambas sustancias poseen una ventana temporal de efecto acotada a etapas iniciales de la consolidación (McGaugh, 2000; Izquierdo, 1989). Otra semejanza es que las dos actuarían como moduladoras de la memoria, aunque en el caso de la NA se trataría de una "moduladora inevitable", dado que en general su bloqueo mediante la invección de antagonistas beta-noradrenérgicos causa un efecto deletéreo sobre la retención de ciertas memorias de miedo (Gold & van Buskirk, 1978; Tronel et al., 2004), aunque existen evidencias contradictorias al respecto (Lee et al., 2001; Murchison et al., 2004). Finalmente, ambas estarían implicadas tanto en la consolidación (Cahill & McGaugh, 1998; McGaugh, 2000) como en la reconsolidación de la memoria (Debiec & Ledoux, 2004; Debiec & LeDoux, 2006; Przybyslawski et al., 1999; Roullet & Sara, 1998). Sin embargo, la interpretación del efecto de la NA sobre la fase de reconsolidación (Sara, 2000) es que la misma mediaría la respuesta condicionada de alerta que facilitaría la evocación. En otras palabras, la liberación de NA precedería y condicionaría a la evocación, afectando subsecuentemente a la reconsolidación. Por el contrario, nuestro planteo es que la OA actuaría sobre la reconsolidación, es decir, después de la evocación y sin influencia sobre ésta.

Si aceptáramos las similitudes planteadas entre la NA y la OA como una demostración del accionar semejante de ambas sustancias en los procesos mnésicos, podría entonces plantearse que la OA al igual que la NA se liberaría ante las situaciones de luchahuida afectando la capacidad de memoria. Según esta idea, las dosis exógenas altas equivaldrían a la liberación endógena alta de OA, motivada por un estrés excesivo (causado por la presentación reiterada del EVP) y con un efecto negativo sobre la memoria. Hay que destacar que la dosis de OA a 10⁻³ M equivale a una concentración en hemolinfa 100 veces más diluida, considerando que el volumen de hemolinfa corresponde al 30 % del peso corporal (Gleeson & Zubkoff, 1977). Aunque esta dosis final implica un valor alto de concentración, puede considerarse como un nivel posible de OA endógena en situaciones extremas. En efecto, en insectos se han detectado valores similares en el sistema nervioso central (David & Lafon-Cazal, 1979; Pimley & Stafford, 1985) y además, los valores de OA pueden sufrir grandes oscilaciones en respuesta a diversos factores de estrés, como se vio tanto en crustáceos como en insectos (Hirashima *et al.*, 2000; Sneddon *et al.*, 2000).

Sin embargo, existe una diferencia fundamental entre la OA y la NA, que hace difícil sostener la visión recién planteada: mientras que la OA causa un efecto amnésico sobre la consolidación, la NA tiene efectos facilitadores en la gran mayoría de los casos de memorias emocionales en vertebrados. Hay evidencias de que el sistema noradrenérgico contribuye a incrementar la atención selectiva, la detección de novedad y a la decodificación del estrés y la emoción en el sistema nervioso (Aston-Jones et al., 1994; Ferry et al., 1999; Smith & Nutt, 1996; Steketee et al., 1989) con lo cual su activación resulta necesaria para que las memorias puedan ser retenidas a largo término. Por lo tanto, consideramos que nuestros resultados no se condicen con el paralelismo que suele plantearse entre las funciones de la OA y la NA. El hecho de que ambas sustancias tengan muchas coincidencias en ciertos procesos fisiológicos no implica que actúen de igual modo en todos ellos, menos aún cuando lo que se están comparando son fenómenos de aprendizaje y memoria, suficientemente complejos y multifactoriales como para concluir que las dos sustancias propias de diferentes grupos animales tienen un accionar idéntico en paradigmas de aprendizaje con características disímiles.

A lo largo de esta sección analizamos desde diversas perspectivas el accionar de la

OA sobre la memoria contexto-EVP. Sin embargo, queda aún latente el interrogante acerca del efecto inhibitorio de la OA. Vimos que atribuirlo a una situación de estrés excesivo no resulta convincente. Asignarlo a un efecto inespecífico de la droga resulta muy poco factible pues vimos que la droga no afecta la reactividad de los animales y que su acción sería a través de receptores específicos. Es muy probable que el efecto de la OA ocurra en un momento preciso del proceso de formación de la memoria, que podría coincidir con el período conocido como codificación (o encoding), donde los estímulos sensoriales adquieren una representación mnésica en el sistema nervioso. ¿Estará la OA interfiriendo con el proceso de codificación de los estímulos? Esta pregunta fue cobrando fuerza debido a que una serie de trabajos plantearon a la OA como una mediadora de refuerzos de tipo apetitivos en modelos de aprendizajes en insectos (Hammer & Menzel, 1998; Schwaerzel et al., 2003; Unoki et al., 2005). Entonces ¿será la OA una señal correspondiente a estímulos apetitivos, que se podría contraponer a la señal aversiva del EVP y así causar un efecto amnésico? En el siguiente Capítulo vamos a abordar esta pregunta.

Capítulo 4

Evaluación del rol de la octopamina en un nuevo paradigma de aprendizaje apetitivo

4.1 Introducción

La publicación de una serie de trabajos señalando un papel de la OA como mediadora de refuerzos de tipo apetitivo en insectos (Farooqui et al., 2003; Schwaerzel et al., 2003; Unoki et al., 2005) nos llevó a plantear el desarrollo de un nuevo modelo de aprendizaje apetitivo en el cangrejo Chasmagntahus. La obtención del nuevo paradigma no sólo nos permitirá evaluar el rol de la OA sobre la memoria apetitiva en este modelo, sino también contrastar los resultados obtenidos con los del modelo aversivo, brindando así una visión integradora sobre el accionar de la OA en diferentes procesos de aprendizaje y memoria.

Estímulos apetitivos vs. aversivos

Resulta indudable que las emociones como el placer y el miedo afectan en gran medida nuestros actos. Ya en la antigüedad, los hedonistas consideraban que la búsqueda del placer era la principal motivación del comportamiento. Sin embargo, si intentamos precisar por qué determinados estímulos o ciertas acciones nos resultan placenteros mientras que otros ejercen un efecto opuesto, no encontramos una respuesta unívoca. Desde una perspectiva biológica, sabemos que ciertos elementos del entorno poseen un alto valor motivacional para el individuo, determinando su supervivencia y reproducción. De acuerdo a las reacciones que generan, tanto comportamentales como fisiológicas, los estímulos ambientales pueden clasificarse según su valor motivacional como apetitivos o aversivos (Dudai, 2002). Los apetitivos inducen inicialmente una reacción de preparación, que permite una exploración e inspección cercana del estímulo y que culmina con un comportamiento consumatorio. Por el contrario, los estímulos aversivos inducen conductas de evitación, como el escape o la respuesta de congelamiento, que intentan reducir el impacto negativo del estímulo sobre el individuo.

En relación a los procesos de aprendizaje, los estímulos apetitivos y aversivos poseen diferentes funciones. En primer lugar, si bien ambos pueden interrumpir el comportamiento que está teniendo lugar y generar reacciones inmediatas, en un caso serán de aproximación y en el otro de evitación, como consecuencia de una clasificación automática del estímulo como "apetitivo" o "aversivo" (Schultz, 1997). En los condicionamientos clásicos, generalmente representan al estímulo incondicionado (EI), asociado a una clave intrínsecamente neutra (estímulo condicionado, EC), adquiriendo esta

última un valor predictivo de la llegada del EI. En segundo lugar, pueden reforzar positiva o negativamente un comportamiento determinado, incrementando o disminuyendo las probabilidades de que se realice. De ahí la denominación utilizada comúnmente de "refuerzo positivo" o "refuerzo negativo" que surgió en el marco de los condicionamientos instrumentales y se extendió genéricamente a otros tipos de aprendizaje (White & Milner, 1992). En tercer lugar, tienen un valor emocional capaz de inducir sensaciones subjetivas tales como el placer, en el caso de los apetitivos, o el miedo en el caso de los aversivos (Robbins & Everitt, 1996).

Condicionamientos apetitivos

La primera formalización del condicionamiento que ahora conocemos como *clásico* o *pavloviano* corresponde, justamente, a los trabajos de Pavlov de hace más de un siglo (Clark, 2004) en los cuales demostró que una clave visual o sonora (EC) asociada a un estímulo apetitivo gustativo (EI) era capaz, luego del condicionamiento, de generar por sí sola una respuesta de salivación (respuesta condicionada). Desde entonces, este paradigma de aprendizaje se ha extendido a muchos modelos animales, tanto de vertebrados como de invertebrados.

En insectos existen numerosos ejemplos de condicionamientos apetitivos. El primero que se describió (por von Frisch, en 1914) y el más estudiado desde entonces es el de la abeja *Apis mellifera*, que demostró la capacidad de asociar estímulos de diversa índole sensorial, como olores, colores o formas, con un refuerzo azucarado (Giurfa, 2007). En la mosca *Drosophila*, si bien el paradigma dominante es de tipo aversivo (Tully *et al.*, 1994), recientemente se desarrolló un modelo apetitivo donde los animales aprenden a dirigirse hacia un olor reforzado con una solución de sacarosa (Kim *et al.*, 2007). Por otro lado, en cucarachas *Periplaneta americana* se desarrolló un modelo de condicionamiento de la secreción salival (Watanabe & Mizunami, 2007), análogo al clásico perro de Pavlov, donde se vio que un determinado olor pareado con una solución de sacarosa era capaz de inducir un incremento en la salivación.

En crustáceos, estudios realizados en *Chasmagnathus* (Dimant & Maldonado, 1992; Hermitte, 1995) constituyen uno de los pocos antecedentes de un modelo de aprendizaje apetitivo. El dispositivo utilizado consistía en una caja experimental con un compartimiento oscuro, en el cual los animales eran colocados inicialmente, comunicado con un compartimiento iluminado de iguales dimensiones al anterior. Se vio que cuando los

animales entraban por primera vez al dispositivo, atravesaban generalmente la división entre ambos sectores pasando al sector iluminado, mientras que al repetir la experiencia varias ocasiones la exploración decrecía notablemente, lo cual se consideró como un caso de aprendizaje de habituación. Sin embargo, cuando el animal encontraba alimento en el compartimiento iluminado, se evidenciaba una disminución en la latencia a entrar a este sector, que persistía hasta un día después, lo cual se consideró como un caso de aprendizaje apetitivamente motivado (Hermitte, 1995).

Neurobiología del aprendizaje apetitivo. Papel de la OA

Un tema de alta relevancia en el área de la neurobiología es entender las bases neurofisiológicas que llevan a que un estímulo sea considerado como apetitivo. Una extensa serie de trabajos en modelos de vertebrados, fundamentalmente roedores, demostraron que los sistemas dopaminérgicos están involucrados en el procesamiento de información relacionada con refuerzos positivos (Schultz, 1997). En particular, se considera que el núcleo accumbens, sobre el que actúa la dopamina liberada principalmente desde el área tegmental ventral y la sustancia nigra, juega un papel determinante en la mediación de los efectos de estímulos apetitivos como el alimento o drogas de adicción (Martin-Soelch *et al.*, 2007). Estas neuronas dopaminérgicas serían detectoras de la característica "apetitiva" de un evento o de un estímulo relativo a la predicción. Además, las neuronas tienen la capacidad de transferir su respuesta ante estímulos apetitivos a otros estímulos predictores del mismo, de modo análogo a lo que ocurre en el condicionamiento pavloviano.

En los invertebrados, en cambio, se considera que la molécula clave en los aprendizajes apetitivos no es la dopamina sino la OA. Una serie de trabajos realizados en varias especies y paradigmas de aprendizaje de insectos convergen en la idea de que la OA sería mediadora de refuerzos apetitivos. El estudio pionero fue realizado en la abeja *Apis mellifera* (Hammer & Menzel, 1998) donde se encontró que la OA podía sustituir a la sacarosa en un condicionamiento basado en la presentación de un olor seguido por una recompensa de azúcar, que genera consecuentemente un reflejo de extensión de la probóscide (PER) ante el olor recompensado. Se demostró que el apareamiento de un olor determinado con una inyección de OA aplicada en una zona específica del cerebro (donde se produciría la convergencia entre la señal del olor y la recompensa), permite la formación de una memoria de largo término expresada en un aumento del reflejo PER. Posteriormente, mediante la utilización de la técnica de ARN de interferencia, se vio que el

bloqueo de la expresión del receptor de OA impedía el condicionamiento olfatorio (Farooqui et al., 2003). En la mosca Drosophila melanogaster, individuos transgénicos defectuosos en la síntesis de OA presentaban un impedimento en un aprendizaje apetitivo con un refuerzo azucarado (Schwaerzel et al., 2003), mientras que uno aversivo estaba intacto. En el grillo Gryllus bimaculatus, la aplicación de antagonistas del receptor de OA consiguió bloquear tanto un condicionamiento apetitivo de tipo visual como uno olfativo (Unoki et al., 2005; Unoki et al., 2006). Paralelamente, en la mayoría de los estudios sobre la OA se analizó también el papel de la dopamina (DA) en aprendizajes de tipo aversivo (Schwaerzel et al., 2003; Unoki et al., 2005; Unoki et al., 2006; Vergoz et al., 2007; Riemensperger et al., 2005; Keene & Waddell, 2005) concluyéndose que la DA estaría implicada en la mediación del refuerzo negativo y la OA en la del refuerzo apetitivo.

<u>Objetivos</u>: desarrollar un nuevo paradigma de aprendizaje apetitivo que permita establecer comparaciones directas con el modelo de memoria aversiva. Habiendo establecido este paradigma, nos interesa analizar el papel de la OA en su procesamiento mnésico.

<u>Hipótesis:</u> en base a los resultados obtenidos en diversos modelos de aprendizaje en insectos, postulamos que la OA participaría de la señalización del refuerzo apetitivo.

4.2. Resultados

4.2.1. <u>PRIMERA PARTE</u>: desarrollo de un nuevo paradigma de aprendizaje apetitivo

4.2.1.1. Puesta a punto del nuevo paradigma

Basándonos en el precedente de aprendizaje apetitivo de *Chasmagnathus*, utilizamos al alimento como estímulo incondicionado (EI), dado que había demostrado ser efectivo en cuanto a su valor de reforzar un determinado contexto. Sin embargo, en el nuevo paradigma apetitivo decidimos usar como contexto (estímulo condicionado, EC) al mismo que se usa en el modelo aversivo (ver Tabla 2.1, capítulo 2). El hecho de que ambos modelos compartan el EC permite contrastar de modo directo los resultados obtenidos en los dos paradigmas. Considerando que en este caso no se determinan respuestas de escape como en el aversivo, fue preciso hallar el tipo de respuesta condicionada más apropiada. En

el nuevo modelo la medición de la actividad de los animales se realiza mediante un método de análisis de video, detallado en el Capítulo 2 (Sección 2.4), y no a través de micrófonos colocados debajo del contenedor como se hace en el aversivo. La ventaja de este nuevo dispositivo es que posibilita una mayor sensibilidad en la medición y una mayor versatilidad en las variables a analizar, dado que permite determinar la velocidad, la distribución espacial, la distancia recorrida, entre otros.

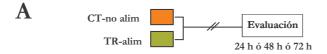
Se ha desarrollado el siguiente protocolo a partir de los parámetros establecidos en una serie de experimentos preliminares.

Los animales son colocados en los contenedores plásticos y los primeros cinco minutos se mide su actividad para determinar si existe alguna diferencia inicial entre grupos (período de adaptación). De igual modo que en el modelo aversivo, se usan pares de grupos: luego de los cinco minutos de adaptación, uno de los grupos recibe un ensayo de entrenamiento apetitivo, que consiste en una ración de 80 mg de alimento balanceado para conejos, mientras que el otro permanece en el contenedor sin recibir refuerzo alguno; este período tiene una duración de 30 minutos. Finalizada la sesión de entrenamiento, los animales son retirados de los contenedores y guardados en recipientes individuales dentro de cajoneras. A los dos días se realiza la sesión de evaluación, donde se los vuelve a colocar en los contenedores y se registra su actividad de exploración durante los primeros 5 minutos. Los resultados preliminares demostraron consistentemente que el grupo que recibe alimento durante la sesión de entrenamiento (al que denominamos grupo entrenado, TR), despliega en promedio una respuesta exploratoria significativamente mayor que el grupo no alimentado (de ahora en más grupo control, CT). También analizamos las variaciones en el parámetro de la densidad, que indica cuán expansiva es la distribución de los animales en el espacio, pero no encontramos diferencias entre grupos CT y TR. Por lo tanto, la respuesta condicionada que demostró mayor solidez es la de un aumento en la distancia explorada por el grupo alimentado. Un hecho destacable es que al analizar las filmaciones correspondientes al período de entrenamiento, se observa que la exploración de los animales alimentados es significativamente menor que la de los controles, lo cual es muy lógico pues mientras comen no continúan explorando. Esto indica que la respuesta incondicionada (alimentarse) implica un decremento en la distancia recorrida, mientras que la condicionada (exploración) implica un incremento en la distancia.

La siguiente serie experimental estuvo diseñada para caracterizar el paradigma apetitivo y evaluar si el incremento en la respuesta exploratoria de los grupos TR se debe a una asociación entre el contexto de entrenamiento y el alimento recibido durante el mismo.

4.2.1.2. Las diferencias en la respuesta exploratoria entre los grupos controles y entrenados persisten al menos 72 h luego del entrenamiento apetitivo

Inicialmente quisimos evaluar por cuánto tiempo era posible encontrar las diferencias entre la actividad de los grupos CT y TR. Además de ser relevante para la descripción del modelo, cuanto más consistente sea la diferencia entre los grupos, más improbable es atribuirlas a un efecto general de la comida sobre la actividad locomotora de los animales. Realizamos tres experimentos, cada uno contó con un par de grupos CT-TR. Los animales TR recibieron un ensayo de entrenamiento, consistente en la entrega de un *pellet* de 80 mg durante 30 minutos, luego de 5 minutos de adaptación. El primer par CT-TR se evaluó a las 24 h luego del entrenamiento, el segundo a las 48 h y el tercero a los 72 h. Los resultados de la sesión de evaluación se muestran en la **Figura 4.1**.



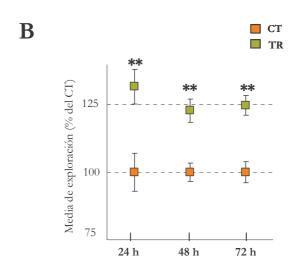


Figura 4.1. Los grupos CT y TR difieren aún 72 h después del entrenamiento. A) Esquema del diseño experimental utilizado. Sesión de entrenamiento. El cuadrado anaranjado representa el grupo control (CT) que no recibe alimento durante la sesión, y el verde al grupo entrenado (TR) que recibe 80 mg de alimento, por 30 minutos. Sesión de evaluación: rectángulo blanco. Se realizó 24, 48 o 72 h luego del entrenamiento (N=40 por grupo). B) Resultados de la sesión de evaluación para los tres pares de grupos CT-TR. Distancia media explorada y ES (error estándar), normalizado respecto a la distancia media del grupo CT. Los cuadrados naranjas corresponden a los grupos CT y los verdes a los TR. **: p<0.01

Se observó que la actividad exploratoria de los grupos TR, expresada como distancia, fue significativamente mayor que la de los grupos CT, para cada uno de los pares analizados [ANOVA, 24h: $F_{1,78}$ =10.98; p<0.005; 48h: $F_{1,68}$ =5.45, p<0.01; 72h: $F_{1,78}$ =21.18, p<0.00005]. Estos resultados indican que la diferencia en la actividad exploratoria de los grupos alimentados respecto de los controles puede evidenciarse por un período de al menos tres días. De este modo, resulta poco probable una explicación en términos de un efecto del alimento sobre la actividad locomotora de los animales, aunque aún no se puede descartar de lleno esa posibilidad. A partir de este experimento elegimos el intervalo de 48 h entre la sesión de entrenamiento porque permite un suficiente alejamiento entre las sesiones de modo tal de limitar los posibles efectos inespecíficos del alimento sobre la actividad exploratoria de los animales.

4.2.1.3. La mayor exploración de los grupos alimentados se produce sólo cuando el contexto es congruente con el del día del entrenamiento

En segundo lugar, quisimos analizar si los resultados recién comentados correspondían a un proceso de memoria que involucra una asociación entre el contexto y la comida. Para evaluar este interrogante, nos basamos en el dato de que los procesos asociativos que involucran claves contextuales se expresan sólo cuando hay una congruencia entre el contexto de entrenamiento y el de la evaluación (Tomsic *et al.*, 1998). Vale la pena aclarar que lo que venimos denominando "contexto", no incluye únicamente al componente visual del recipiente color anaranjado en el cual se coloca a los animales, sino que también incluye claves táctiles del material y del agua, claves químicas de la composición de solutos disueltos, e incluso las claves de manipulación que implican tomar al animal y colocarlo en el recipiente. Por esta razón nos interesó no sólo determinar si se produce una asociación, sino también cuáles son las claves relevantes del contexto que determinan una asociación con el alimento.

El diseño experimental utilizado incluyó dos pares de grupos CT-TR por experimento: un par llamado *congruente* (CONG) y otro *no congruente* (NO CONG). En la sesión de entrenamiento, los animales del par CONG fueron colocados en los contenedores estándar, mientras que los del par NO CONG se colocaron en un contexto diferente (ya sea visual, químico o táctil). Los grupos TR recibieron un ensayo de entrenamiento apetitivo, con una ración de 80 mg durante 30 minutos, mientras que los CT permanecieron en el contexto sin recibir refuerzo. En la sesión de evaluación, 48 h

después, todos los animales fueron colocados en los contenedores estándar y se midió su actividad exploratoria. La hipótesis es que si efectivamente se produce una asociación entre el alimento y las claves contextuales presentes en el entrenamiento, entonces en el par entrenado en un contexto diferente al de la evaluación no debería expresarse una diferencia entre los grupos CT y TR.

En los siguientes experimentos se analizó la implicancia de diferentes tipos de claves contextuales. El diseño experimental fue igual en todos lo casos, excepto en el tipo de contexto presentado al par NO CONG.

En el primer experimento se variaron las claves *visuales*. En el modelo de memoria aversiva las claves visuales del contexto son fundamentales para evocar la memoria contexto-EVP (Hermitte *et al.*, 1999). Considerando este precedente, colocamos al grupo NO CONG en un recipiente plástico cilíndrico con rayas verticales blancas y negras. Los resultados se muestran en la **Figura 4.2 A**, y se observa que en el par CONG el grupo TR explora significativamente más que el CT, mientras que en el par NO CONG el grupo TR no presenta diferencias significativas con el CT [ANOVA, F_{3,152}=3.713, p<0.05; comparaciones planeadas: CONG: p<0.01; NO CONG: p=0.11]. Es decir que las claves visuales resultaron necesarias para generar el aumento en la exploración del grupo alimentado.

En el segundo experimento se variaron las claves químicas, las cuales son determinantes en el comportamiento alimentario de los crustáceos (Atema & Voigt, 1995; Zimmer-Faust et al., 1984). Consecuentemente, nos preguntamos si las mismas podían estar implicadas en la asociación del contexto con la comida. Colocamos al par NO CONG en los contenedores estándar que tenían incorporada una solución de glutamato monosódico en agua salada, con una concentración final de 10⁻³ M. El glutamato es un derivado del aminoácido no esencial ácido glutámico y se comprobó que en especies como la langosta marina su sal puede ser detectada a través de quimiorreceptores localizados principalmente en las anténulas y en las patas (Carr et al., 1987), y que posee propiedades estimulatorias sobre el comportamiento de búsqueda de alimento (Atema & Voigt, 1995). Por otro lado en el par CONG se utiliza, como en todos los experimentos, un fondo de agua salobre de igual composición que la empleada para mantener los animales. Los resultados se muestran en la Figura 4.2 B. Sólo en el par CONG se observan diferencias significativas del tipo TR>CT, mientras que en el par NO CONG las diferencias entre CT y TR son no significativas [ANOVA, F_{3,156}=2.7, p<0.05; comparaciones planeadas: CONG: p<0.05; NO CONG: p=0.72]. Este resultado muestra que una incongruencia en las claves químicas

entre el entrenamiento y la evaluación impide la expresión de un aumento en la exploración del grupo alimentado.

Asimismo, realizamos un experimento complementario en donde invertimos el orden del contexto respecto al anterior: en este caso el par CONG fue entrenado y evaluado en el contexto con glutamato mientras que el NO CONG fue entrenado en el contexto estándar y evaluado en el que tiene glutamato. Mediante este diseño es posible analizar la simetría de las claves contextuales presentadas a ambos pares de grupos. Los resultados [ANOVA, F_{3,136}=2.7, p<0.005; comparaciones planeadas: CONG: p<0.01; NO CONG: p=0.11] indican nuevamente que en el par CONG los grupos CT y TR presentan diferencias significativas, mientras que en el NO CONG las diferencias entre ambos son no significativas.

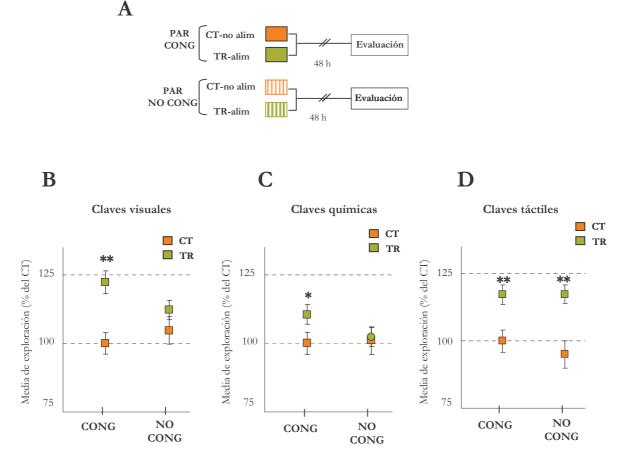


Figura 4.2. La diferencia entre los grupos CT y TR sólo se evidencia cuando las claves contextuales son congruentes con las del entrenamiento. A) Esquema del protocolo experimental utilizado en los tres experimentos. Sesión de entrenamiento. Dos pares de grupos CT-TR en cada caso. El par CONG es colocado en el contexto estándar, mientras que el par NO CONG es colocado en un contexto con claves diferentes representando con un patrón rayado. El contexto del entrenamiento del par puede diferir en claves visuales (panel B, N=39 por grupo en par CONG y 40 por grupo par NO CONG), químicas (panel C, N=39 por grupo), o táctiles (panel D, N=40 por grupo). A las 48 todos son evaluados en el contexto estándar. B, C, D) Resultado de la sesión de evaluación para los tres experimentos, donde el par NO CONG fue entrenado con diferentes claves visuales, químicas o táctiles, respectivamente. Ordenadas y símbolos como en Fig.4.1.

Finalmente analizamos la influencia de las claves *táctiles*. Los crustáceos decápodos pueden decodificar información táctil mediante mecanoreceptores distribuidos a lo largo de la cutícula, fundamentalmente en las antenas, los cuales contribuyen en gran medida a la exploración de un ambiente novedoso (McMahon *et al.*, 2005; Patullo & Macmillan, 2006) y en la detección del alimento (Atema & Voigt, 1995). Por esta razón decidimos variar el tipo de sustrato en el par NO CONG, colocando en los contenedores un fondo de piedritas de acuario recubiertas con agua salada. Los resultados se muestran en la **Figura 4.2 C.** Puede observarse que en ambos pares la diferencia entre los grupos CT y TR es altamente significativa [ANOVA, F_{3,156}=8.12, p<0.0001; comparaciones planeadas: CONG: p<0.001; NO CONG: p<0.0001]. Aparentemente la variación del tipo de sustrato no impidió el aumento en la exploración del grupo alimentado en un contexto no congruente.

En su conjunto, estos resultados apoyan la idea de que la diferencia en la actividad exploratoria entre los grupos CT y TR es producto de un proceso asociativo entre las claves contextuales presentes en el entrenamiento y el alimento. En particular, vimos que tanto las claves visuales como las químicas resultarían determinantes para predecir el refuerzo, pues al variarlas los animales no demuestran un aumento en la exploración, lo cual indicaría que no están evocando la memoria. En cambio, las claves táctiles no parecen tener una relevancia determinante en la codificación del contexto, aunque habría que realizar una búsqueda más exhaustiva de otro tipo de estímulos para poder extraer una conclusión más certera al respecto.

4.2.1.4. El proceso es dependiente de la síntesis proteica

Uno de los aspectos más paradigmáticos sobre la formación de la memoria de largo término es el requerimiento de síntesis proteica y consecuentemente, el efecto deletéreo de los inhibidores de la misma (Eisenstein et al., 1983; Flood et al., 1975; Flood et al., 1973). El experimento final de esta serie fue diseñado para evaluar la hipótesis de que si la diferencia hallada entre los grupos CT y TR constituye un caso de memoria a largo término, entonces debería ser susceptible a la interferencia por inhibidores de la síntesis proteica, como la cicloheximida (CHX). Previamente, se demostró en *Chasmagnathus* que la aplicación de 15 µg de CHX por animal lograba inhibir cerca del 90 % de la síntesis proteica a las dos horas siguientes de la inyección (Pedreira et al., 1995) y tenía un efecto amnésico sobre la memoria aversiva.

En el siguiente experimento, usamos dos pares de grupos CT-TR, uno inyectado

con salina (par SAL) y el otro con una dosis de 20 µg de CHX (par CHX), aplicada 45 minutos antes de la sesión de entrenamiento. Los resultados de la sesión de evaluación se muestran en la **Figura 4.3**, y su análisis estadístico [ANOVA, F_{3,156}=3.534, p<0.05] revela una diferencia significativa entre los grupos CT y TR del par SAL (p<0.005), mientras que en el par CHX las diferencias son no significativas (p=0.18). Por otro lado, los grupos CT de ambos pares no presentan diferencias, por lo que deducimos que la CHX no afecta la actividad de los animales. Este resultado estaría indicando que el aumento observado en la actividad exploratoria de los grupos TR depende de la síntesis proteica, lo cual resulta consistente con la hipótesis de que se trataría de una memoria de largo término

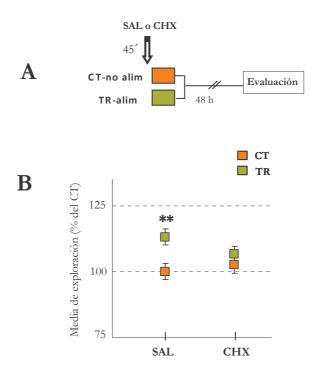


Figura 4.3. La diferencia entre los grupos CT y TR depende de la síntesis proteica. A) Esquema del diseño experimental utilizado. Sesión de entrenamiento. Dos pares de grupos CT-TR. Un par es inyectados con SAL y el otro con CHX (20 μg por animal), 45 min antes del entrenamiento (flecha). N=30 por grupo. Símbolos como en Fig. 4.1. B) Resultado de la sesión de evaluación para los dos pares de grupos. Normalización respecto al CT-SAL. Ordenadas y símbolos como en Fig. 4.1.

En **síntesis**, los resultados expuestos en esta primera sección representan una evidencia de que el aumento en la actividad exploratoria manifestado por los animales alimentados constituye un caso de memoria asociativa de largo término. En primer lugar,

vimos que este aumento no era transitorio, sino que persistía aún 72 horas después del entrenamiento, lo cual hace poco factible una explicación términos de un efecto metabólico de la comida. Luego, pudimos constatar que sólo cuando las claves del entrenamiento y la evaluación eran congruentes los animales alimentados expresaban el incremento en la distancia recorrida. Finalmente, acudiendo a una herramienta farmacológica, encontramos que la síntesis de proteínas resulta necesaria para que se produzca el aumento en la exploración. Creemos que las pruebas expuestas son lo suficientemente fuertes como para considerar a éste un proceso de memoria. Por eso a partir de ahora denominaremos operativamente al aumento en la exploración del grupo entrenado respecto al control como retención de la memoria apetitiva, la cual sería consecuencia de un proceso de evocación disparado por la exposición de los animales a las claves contextuales del entrenamiento. A su vez, esta memoria es producto del aprendizaje asociativo generado durante el entrenamiento.

4.2.2. <u>SEGUNDA PARTE</u>: evaluación del rol de la OA en el paradigma de aprendizaje apetitivo

4.2.2.1. Los antagonistas de la OA inhiben la memoria apetitiva

Para estudiar la implicancia de la OA en la memoria apetitiva, inicialmente analizamos el efecto del bloqueo de la OA endógena mediante el uso de dos antagonistas: la mianserina y la epinastina, los cuales fueron utilizados previamente en el paradigma de memoria aversiva, y cuyas características describen en el Capítulo 2. Usamos tres pares de grupos CT-TR: uno inyectado con solución salina (par SAL), el segundo con epinastina 6.10⁻³ M (par EPI) y el tercero con mianserina, 5.10⁻³ M (par MIAN), aplicadas 5 minutos después de colocar a los animales en el contenedor durante la sesión de entrenamiento. Los grupos TR recibieron un ensayo con 80 mg de comida. Los resultados se muestran en la **Figura 4.4,** y su análisis estadístico [ANOVA, F_{5,188}=2.42, p<0.05] muestra que tanto la epinastina como la mianserina impidieron la retención de la memoria apetitiva (comparaciones planeadas: SAL: p<0.005, EPI: p=0.24; MIAN: p=0.89).

El efecto de los antagonistas demostró ser dosis-dependiente, dado que al realizar un experimento de iguales características al anterior pero con dosis menores de las drogas, de 5.10⁻³ M en el caso de la epinastina y de 4.10⁻³ M en el de la mianserina, se obtuvo retención de la memoria apetitiva en ambos casos (datos no mostrados).

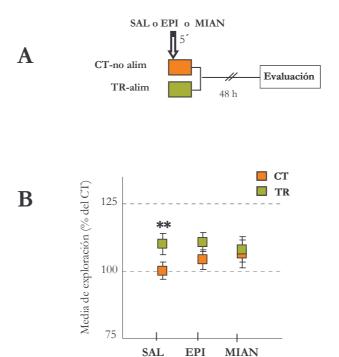


Figura 4.4. Los antagonistas de OA inhiben la memoria apetitiva. A) Esquema del diseño experimental utilizado. Sesión de entrenamiento. Tres pares de grupos CT-TR. Un par es inyectado con SAL (N=32 por grupo), otro con EPI 6.10⁻³ M (N=32 por grupo) y el tercero con MIAN 5.10⁻³ M (N=33 por grupo), justo antes de la entrega del alimento (flecha). Símbolos como en Fig. 4.1. **B**) Resultado de la sesión de evaluación para los tres pares de grupos. Ordenadas y símbolos como en Fig.4.1

Este resultado constituye el primer indicio de que la OA es un requerimiento para la formación de la memoria apetitiva. Pero todavía no evaluamos si efectivamente está involucrada en la representación del refuerzo apetitivo. En los siguientes experimentos abordaremos esta cuestión.

4.2.2.2. La OA no es capaz de reemplazar al estímulo incondicionado alimenticio

Comenzamos con una aproximación lineal: nos preguntamos si una inyección de OA era capaz por sí sola de imitar el efecto del alimento como refuerzo. Usamos dos pares de grupos. El primero consistió en los usuales grupos CT y TR (par ESTANDAR) y el segundo incluyó dos grupos no alimentados, uno inyectado con solución salina y el otro con OA en una dosis de 4.10⁻³ M, administradas 5 minutos después de colocar a los animales en los contenedores (se lo llamó par FALSO, porque el grupo "falso-TR" recibe

OA en lugar de alimento). Si la OA pudiera actuar como un refuerzo, entonces debería obtenerse una mayor exploración del contexto en el grupo inyectado con OA respecto al que recibió solución salina. La inclusión del par ESTANDAR permite por un lado un control positivo de la retención y por el otro una comparación de la actividad del grupo TR con la del falso-TR. Los resultados (**Figura 4.5**) mostraron que el grupo inyectado con OA no presenta diferencias en la distancia total explorada con respecto al grupo inyectado con salina [ANOVA, F_{3,135}=4.83, p<0.01, comparaciones planeadas: ESTANDAR: p<0.05, FALSO: p=0.94], es decir que la OA *per se* no logró sustituir al estímulo incondicionado apetitivo.

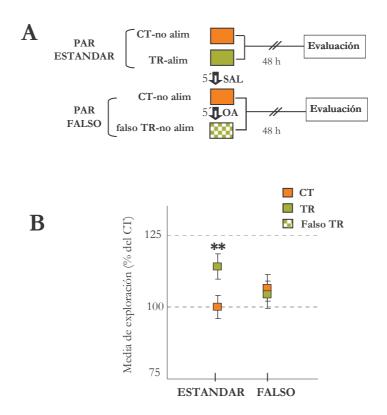


Figura 4.5. La OA no sustituye *per se* al alimento. **A)** Esquema del protocolo experimental utilizado. Sesión de entrenamiento. Dos pares de grupos CT-TR: uno estándar y uno "falso", donde el grupo CT recibe una inyección de SAL y el grupo falso TR recibe una inyección de OA 4.10⁻³ M en lugar de alimento, ambas aplicadas 5 min luego de colocarlos en los contenedores (flechas). El cuadrado con cuadros verdes representa al falso-TR. Otros símbolos como en Fig. 4.1. N=40 por grupo.. **B**) Resultado de la sesión de evaluación para los tres experimentos. Ordenadas y otros símbolos como en Fig.4.1

Pese a este resultado, existe aún la posibilidad de que la OA esté implicada en el proceso de codificación del refuerzo sin representar en sí misma al estímulo del alimento. De hecho, resulta un poco forzado pretender que una inyección sistémica de OA le indique al sistema nervioso específicamente la señal "comida" y que la misma además se asocie con

un contexto determinado. Es posible entonces que sea necesaria la activación de las vías implicadas en la alimentación para que la OA pueda señalar el valor apetitivo del estímulo. Consecuentemente, planteamos la hipótesis de que la OA sería capaz de facilitar un refuerzo alimenticio débil, aumentando su saliencia y permitiendo que se exprese la memoria a largo término.

4.2.2.3. La OA puede facilitar un entrenamiento apetitivo débil

Con el objetivo de evaluar la hipótesis desarrollamos un protocolo de entrenamiento débil, donde el grupo TR recibe un ensayo de entrenamiento con una cantidad de alimento sustancialmente menor que la utilizada en el protocolo usual (ver Capítulo 2, Sección 2.4.2). Una serie de experimentos preliminares demostraron que al reducir la ración de alimento en un 40% se impide la retención de la memoria apetitiva en la sesión de evaluación.

Realizamos tres experimentos, donde fuimos reduciendo progresivamente la cantidad de refuerzo entregada. En cada caso se usaron dos pares de grupos CT y TR: uno inyectado con salina (par SAL) y el otro con OA 4.10⁻³ M (par OA), aplicadas 5 minutos después de colocar a los animales en el contexto, justo antes de que reciban el alimento. En el primer experimento se usó una ración de 50 mg, en el segundo una de 30 mg y en el tercero una de 10 mg. Los resultados (**Figura 4.6**) en los tres casos fueron coincidentes: en los pares inyectados con solución salina no se encontraron diferencias entre los grupos CT y TR, tal cual lo previsto acorde al entrenamiento débil, mientras que los pares inyectados con OA revelaron una diferencia significativa TR>CT [**50** mg: ANOVA, F_{3,136}=3.095, p<0.05, comparaciones planeadas: SAL: p=0.09, OA: p<0.05; **30** mg: ANOVA F_{3,134}=3.32, p<0.05, comparaciones planeadas: SAL: p=0.27, OA: p<0.05; **10** mg: ANOVA F_{3,156}: 4.493, p<0.005, comparaciones planeadas: SAL: p=0.22, OA: p<0.05].

Es decir que aún reduciendo la cantidad de alimento a una porción mínima de 10 mg, la inyección de OA permitió evidenciar una diferencia entre los grupos CT y TR. Por lo tanto, la OA tiene un efecto facilitador sobre la memoria apetitiva.

Una repetición del experimento realizado con 50 mg de alimento pero utilizando una dosis menor de OA (10⁻³ M) mostró que las diferencias entre CT y TR eran no significativas tanto en el par SAL como en el par OA (datos no mostrados). Esto indica que el efecto facilitador de la OA es dosis-dependiente.

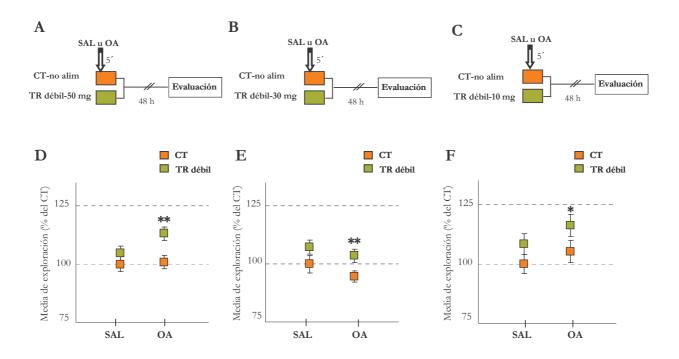


Figura 4.6. La OA permite generar facilitar la memoria apetitiva cuando se reduce la cantidad de comida. A, B, C) Esquema de los diseños experimentales utilizados. Sesión de entrenamiento. Dos pares de grupos CT-TR en cada caso. Un par recibió una inyección de SAL y el otro de OA 4.10⁻³ M, aplicadas a los 5 min de la sesión de entrenamiento (flechas). Se utilizó un protocolo de entrenamiento débil, con una cantidad reducida de alimento: A) 50 mg de alimento, N= 35 por grupo; B) 30 mg de alimento, N=34 por grupo; C) 10 mg, N=40 por grupo. D, E F) Resultado de la sesión de evaluación. D corresponde a 50 mg, B a 30 y F a 10 mg. Ordenadas y otros símbolos como en Fig.4.1

4.3. Conclusiones y Discusión

En el presente Capítulo hemos mostrado una serie de evidencias experimentales que sustentan el planteo de un nuevo paradigma de aprendizaje apetitivo en *Chasmagnathus*. Si bien existían antecedentes de un modelo apetitivo en esta especie, en el cual se demostró que los cangrejos podían reducir la latencia a entrar a un compartimiento donde habían recibido alimento, en nuestro caso mantuvimos en gran medida el dispositivo experimental utilizado en el modelo de memoria aversiva, y a su vez nos adentramos en el estudio de las bases mecanísticas del proceso. Los resultados aquí expuestos dan cuenta de que el modelo desarrollado es robusto, demostrando retención de la memoria hasta tres días después del entrenamiento (Figura 4.1), contexto-especificidad (Figura 4.2), y dependencia de síntesis proteica (Figura 4.3). Este paradigma abre la posibilidad a estudios comparados sobre diversas fases de la memoria en los dos modelos de aprendizaje.

Uno de los aspectos que hemos intentado determinar es qué tipo de claves

contextuales resultan relevantes en cuanto a su capacidad de ser asociadas con el alimento. Cuando nos referimos genéricamente al contexto, lo hacemos en el sentido propuesto por Fanselow (2000), como una integración de múltiples estímulos ambientales que cobran una representación mnésica en el animal a través de la exploración. Es posible que se estén sensando una combinación de claves: desde las características visuales del entorno, la composición del agua (salinidad, presencia de solutos disueltos), la temperatura, la textura del material, la hora del día, entre otros. De hecho, aunque se intenten controlar la mayoría de las variables presentadas, probablemente su complejidad sea subestimada por el experimentador. Todos o algunos de estos elementos confluirían de un modo determinado constituyendo al "contexto", que el animal luego asocia con el estímulo alimenticio (Bouton, 1993). Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que tanto las claves visuales como las químicas serían importantes como componentes del estímulo condicionado (Figuras 4.2 A y B), y no así las táctiles (Figura 4.2. C), aunque también es posible que esto último sea una consecuencia del tipo de clave elegida. Estos resultados dan cuenta de la complejidad de las propiedades contextuales que participan en la asociación con el alimento.

En cuanto al estudio del papel de la OA sobre la memoria apetitiva, utilizamos dos tipos de aproximaciones. En primer lugar, se analizó el efecto del bloqueo farmacológico de los receptores de OA utilizando dos antagonistas. Se demostró que ambos causaban un efecto deletéreo sobre la memoria apetitiva al aplicarlos justo antes de presentar el ensayo de entrenamiento (Figura 4.4). Esto indicaría que la OA endógena sería necesaria al menos durante alguna etapa de la formación o de consolidación de la memoria apetitiva. Al haber aplicado los antagonistas antes del entrenamiento, no podemos determinar específicamente qué fase del proceso mnésico está viéndose afectada. Sin embargo, en base a la hipótesis de que la OA constituye la señal del refuerzo, puede especularse que los antagonistas inhibirían la fase de codificación (o encoding), durante la cual se adquieren las representaciones neuroquímicas de los estímulos. Por otro lado, es importante destacar que si bien la especificidad de los antagonistas de OA no es muy alta (ver Capítulo 2), el hecho de haber obtenido un efecto similar usando dos antagonistas diferentes permite concluir más firmemente que el efecto amnésico está causado por el bloqueo específico de los receptores de OA.

En segundo lugar, se probó el efecto de la aplicación de OA exógena: vimos que la sola inyección de OA 4.10⁻³ M no pudo sustituir al refuerzo apetitivo (Figura 4.5). Sin

embargo, cuando se la aplicó en conjunto con una mínima cantidad de alimento, insuficiente per se de generar retención a largo término, la OA demostró un efecto facilitador sobre la memoria apetitiva (Figura 4.6). A partir de estos resultados se sugiere, en concordancia con una serie de estudios realizados en insectos (Schwaerzel et al., 2003; Unoki et al., 2005; Unoki et al., 2006; Vergoz et al., 2007), que la OA podría constituir una molécula clave en la señalización del refuerzo apetitivo. En nuestro caso, planteamos que la OA aportaría al sistema nervioso algún componente de la señal apetitiva que permite la expresión de la memoria contexto-alimento. Un aspecto a destacar es que la OA sólo puede facilitar la memoria cuando se la aplica en presencia de al menos una pequeña cantidad de alimento (10 mg). Por lo tanto, para evidenciar una acción de la OA es necesaria algún tipo de clave de la comida, capaz de generar en el animal un comportamiento alimentario. Es posible entonces que el estímulo incondicionado apetitivo incluya no sólo a la comida, sino a todo el acto de alimentarse. Los cangrejos poseen un comportamiento de alimentación conspicuo, que incluye a la extensión de las quelas, golpes en el sustrato y constantes movimientos de las piezas bucales, y es probable que la OA inyectada requiera la presencia de una cierta cantidad de alimento capaz de generar este despliegue, para de este modo "sumarse" con éste y poder así transmitir la señalización positiva al sistema nervioso.

Un interrogante que surge ante estos resultados sobre el papel de la OA es cómo se relacionan con los obtenidos en el paradigma de memoria aversiva, lo cual analizaremos en el siguiente capítulo.

Capítulo 5

La interacción entre el aprendizaje aversivo y el apetitivo. Hipótesis sobre el papel de la octopamina en ambos paradigmas

5.1. <u>Introducción</u>

En el capítulo anterior vimos que la OA participaría en la codificación del estímulo incondicionado apetitivo. Adicionalmente, sabemos que la misma tiene un efecto deletéreo sobre la memoria aversiva, a partir de los resultados obtenidos en el Capítulo 3. Nuestra intención en el presente Capítulo es integrar estos dos resultados, que evidencian un efecto divergente de la OA sobre los dos tipos de aprendizaje. El hecho de que el paradigma apetitivo y el aversivo compartan el estímulo condicionado contextual constituye una ventaja para estudiar la interacción entre ambos, debido a que permite realizar los dos tipos de entrenamientos con una contigüidad temporal. Mediante este abordaje intentamos aprehender un proceso que puede ocurrir en situaciones naturales, donde un animal se enfrenta de modo simultáneo o secuencial, en un mismo lugar, a situaciones aversivas, como la presencia de un predador, y apetitivas, como el encuentro de una fuente de alimento. Ante esta perspectiva, surgen distintas preguntas: ¿interferirán ambos tipos de aprendizaje? ¿Podrán los animales retener las dos memorias de significado contrapuesto?

<u>Objetivos</u>: entrenar a los animales con los dos tipos de protocolos, el aversivo y el apetitivo, sin una intervención farmacológica, y analizar la consecuencia de esta situación aparentemente conflictiva sobre los procesos de memoria resultantes. Luego, a partir de los resultados, nos interesa discutir el mecanismo que subyace a los mismos, haciendo un énfasis en la función de la OA.

<u>Hipótesis</u>: el refuerzo apetitivo, que involucra a la acción de la OA, interferirá con la memoria aversiva de modo análogo a lo que ocurre al aplicarla exógenamente.

5.2. Resultados

El protocolo utilizado en los diferentes experimentos de este Capítulo fue el siguiente (ver Capítulo 2, Sección 2.5 para más detalles): los animales recibieron los dos tipos de entrenamiento, aversivo y apetitivo, en un mismo contexto, de modo sucesivo o simultáneo de acuerdo al experimento. Para evaluar la retención de ambos tipos de memoria, un día después de los entrenamientos, realizamos un *test* apetitivo seguido por un *test* aversivo. La lógica de este orden en la evaluación de las dos memorias es que al volver a

colocar a los animales en el contexto, inicialmente se expresaría el aumento en la exploración propio de la retención de la memoria apetitiva, y luego de ese período, ante el pasaje del EVP, se puede evidenciar la retención de la memoria aversiva. El *test* apetitivo consistió en el registro de la actividad exploratoria de cada animal durante los primeros 5 minutos de exposición al contexto, a través de una cámara de video. Por otro lado, en el *test* aversivo, la retención de la memoria contexto-EVP fue evaluada mediante la filmación de la respuesta de los animales ante el pasaje del EVP por 9 segundos. Es decir que en ambos casos se utilizó una metodología de análisis de imágenes y el parámetro determinado fue la distancia total recorrida

Consideramos cuatro casos, cada uno con un intervalo diferente entre el paradigma aversivo y el apetitivo.

5.2.1. El entrenamiento apetitivo realizado inmediatamente después del aversivo produce un efecto deletéreo sobre la memoria aversiva

En el primer experimento de la serie estudiamos el efecto de incluir un ensayo de entrenamiento apetitivo (80 mg de alimento) inmediatamente después de una sesión de 15 ensayos de entrenamiento aversivo. La sesión completa incluyó dos fases experimentales sucesivas, denominadas fase aversiva (45 min) y fase apetitiva (30 min). Los animales fueron controles (CT) o entrenados (TR) en cada una de las fases, lo que llevó a constituir cuatro grupos: CT_{AV}-CT_{AP} (control en ambas fases), TR_{AV}-CT_{AP} (entrenado en la fase aversiva y control en la apetitiva), CTAV-TRAP (control en la aversiva y entrenado en la apetitiva) y TR_{AV}-TR_{AP} (entrenado en ambas fases). La retención de la memoria apetitiva, analizada mediante el test apetitivo en el día 2, incluye dos comparaciones: CT_{AV}-CT_{AP} vs. CT_{AV} - \underline{TR}_{AP} y TR_{AV} - \underline{CT}_{AP} vs. TR_{AV} - \underline{TR}_{AP} . El resultado se muestra en la **Figura 5.1**, y el posterior análisis estadístico [ANOVA F_{3,136}=13.226; p<0.0001] reveló una diferencia significativa (TR>CT) para CT_{AV} - \underline{CT}_{AP} vs. CT_{AV} - \underline{TR}_{AP} [p<0.0001] y para TR_{AV} - \underline{CT}_{AP} vs. TR_{AV}-TR_{AP} [p<0.05]. Por lo tanto, la fase apetitiva induce la formación de la memoria contexto-alimento a pesar de haber estado precedida por una fase aversiva. Por otro lado, la retención de la memoria aversiva fue analizada mediante un test aversivo en el día 2, en el cual se comparan los siguientes grupos: \underline{CT}_{AV} - CT_{AP} vs. \underline{TR}_{AV} - CT_{AP} y \underline{CT}_{AV} - TR_{AP} vs. \underline{TR}_{AV} -TR_{AP}. El resultado se muestra en panel derecho de la Figura 5.1, y su análisis [ANOVA $F_{3,136}$ =4.851; p<0.005] reveló una diferencia significativa (TR<CT) para \underline{CT}_{AV} -CT_{AP} vs. $\underline{\mathbf{TR}}_{AV}$ -CT_{AP} [p<0.05], y una diferencia no significativa para $\underline{\mathbf{CT}}_{AV}$ -TR_{AP} vs. $\underline{\mathbf{TR}}_{AV}$ -TR_{AP} [p=0.81]. Estos resultados llevan a concluir que la inclusión del refuerzo apetitivo inmediatamente después de un entrenamiento aversivo tiene un efecto deletéreo sobre la formación de la memoria apetitiva.

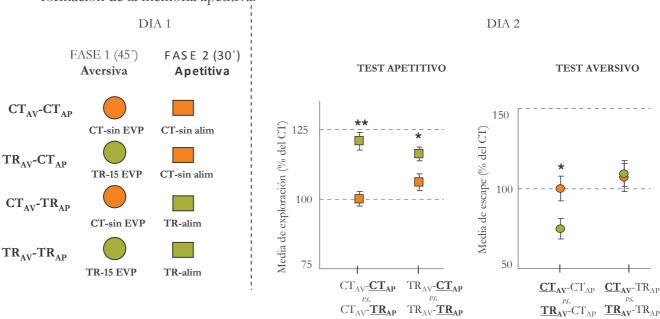


Figura 5.1: El entrenamiento apetitivo inmediatamente después del aversivo inhibe la memoria aversiva sin afectar la memoria apetitiva. *Panel izquierdo*. Día 1: Protocolo experimental de la sesión de entrenamiento. Dos fases experimentales sucesivas: fase aversiva (45 min, indicado con círculos) inmediatamente seguida por una fase apetitiva (30 minutos, indicada con cuadrados). Los animales pueden ser CT (color naranja) o TR (color verde), en cada una de las dos fases: CT_{AV} - CT_{AP} (i.e., control en las dos fases, N=35), TR_{AV} - CT_{AP} (entrenado en la fase aversiva con 15 ensayos, control en la fase apetitiva, N=35), CT_{AV} - TR_{AP} (control en la fase aversiva, entrenado en la fase apetitiva con 80 mg de alimento por 30 min, N=35), y TR_{AP} - TR_{AP} (entrenado en ambas fases, N=35). *Paneles a la derecha*: Día 2. Resultado de la sesión de evaluación: *Testeo apetitivo*: Media de respuesta exploratoria durante los primeros 5 min. *Testeo aversivo*. Media de escape al EVP. Los valores se expresan como porcentaje de la respuesta del grupo CT_{AV} - CT_{AP} *: p<0.05; **:p<0.01

5.2.2. El entrenamiento apetitivo una hora después del aversivo no afecta la memoria aversiva ni la apetitiva

El protocolo del segundo experimento fue similar al del anterior, con la diferencia de que en este caso las fases aversiva y apetitiva estuvieron separadas por un intervalo de una hora, en el cual los animales fueron removidos del contenedor y permanecieron en recipientes individuales. Los resultados del *test apetitivo* realizado en el día 2 se muestran en la **Figura 5.2**, panel izquierdo, cuyo análisis estadístico [ANOVA, F_{3,116}=2.863, p<0.05] reveló una diferencia significativa (TR>CT) tanto para CT_{AV}-<u>CT_{AP} vs. CT_{AV}-TR_{AP} [p<0.05]</u> como para TR_{AV}-<u>CT_{AP} vs. TR_{AV}-TR_{AP} [p<0.05]; y los del *test aversivo*, mostrados en la **Figura 5.2** panel derecho, revelaron una diferencia significativa (TR<CT) [ANOVA,</u>

 $F_{3,116}$ =3.967, p<0.01] para \underline{CT}_{AV} - CT_{AP} vs. \underline{TR}_{AV} - CT_{AP} [p<0.05] y para \underline{CT}_{AV} - TR_{AP} vs. \underline{TR}_{AV} - TR_{AP} ps. $\underline{$

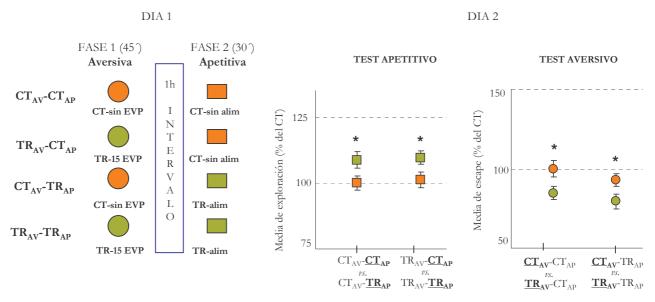


Figura 5.2: El entrenamiento apetitivo una hora después del aversivo no afecta la memoria aversiva ni la apetitiva. *Panel izguierdo*. Día 1: Protocolo experimental de la sesión de entrenamiento. Ídem a la Fig. 5.1, pero en este caso se intercala una hora de intervalo entre la fase aversiva y la apetitiva. N=30 por grupo. *Paneles a la derecha*: Día 2. Resultado de la sesión de evaluación: Testeo apetitivo y Testeo aversivo. Ordenadas y símbolos como en Fig. 5.1

5.2.3. El entrenamiento aversivo en simultáneo con el apetitivo impide la formación de ambas memorias

En el tercer experimento de la serie, los entrenamientos aversivo y apetitivo fueron dados de modo simultáneo. En este caso se usaron sólo dos grupos de animales: el grupo CT_{AV} - CT_{AP} permaneció en el contenedor durante 45 minutos sin recibir ningún tipo de refuerzo, mientras que el grupo TR_{AV} - TR_{AP} recibió los dos entrenamientos en forma conjunta, en el mismo contexto, durante 45 minutos. El entrenamiento aversivo consistió en 15 pasajes del EVP y el apetitivo en un pellet de 80 mg. Al día siguiente, la retención fue estimada mediante un *test apetitivo* y uno *aversivo*.

Los resultados de la sesión de entrenamiento mostraron que los animales despliegan una respuesta de escape característica, con intensidad decreciente a lo largo del entrenamiento (datos no mostrados), mientras que se alimentan mayormente en los intervalos entre las presentaciones del EVP. Incluso se vio que en muchos casos los

animales escapan frente a la figura a la vez que sostienen entre sus pinzas trozos de alimento.

En la sesión de evaluación (**Figura 5.3**), se observaron diferencias no significativas para las comparaciones CT-TR apetitiva y aversiva [ANOVA, F_{1,57}=3.025, p=0.09; F_{1,57}=2, p=0.247 respectivamente]. Por lo tanto, los animales que reciben ambos entrenamientos de modo simultáneo no muestran retención de ninguna de las dos memorias.

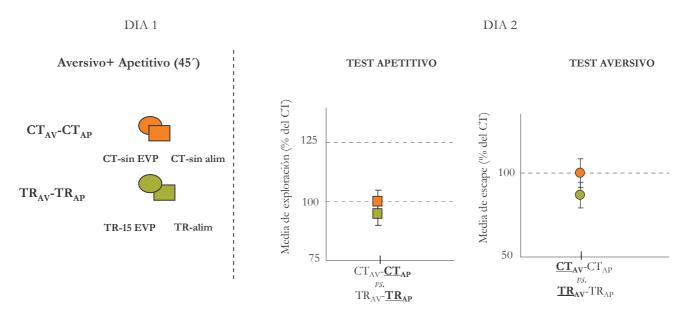


Figura 5.3: El entrenamiento aversivo en simultáneo con el apetitivo impide la formación de ambas memorias. Panel izquierdo. Día 1: Protocolo experimental de la sesión de entrenamiento Las fases aversivas y apetitivas fueron realizadas simultáneamente y se incluyeron dos grupos: CT-CT (control en las dos fases) y TR-TR (entrenado con los dos protocolos). N=30 por grupo. Paneles a la derecha: Día 2. Resultado de la sesión de evaluación: Testeo apetitivo y Testeo aversivo. Ordenadas y símbolos como en Fig. 5.1

5.2.4. El entrenamiento aversivo realizado inmediatamente después del apetitivo causa un efecto amnésico sobre la memoria apetitiva

En este cuarto y último experimento evaluamos la situación inversa a la del ítem 5.2.1.: realizamos el entrenamiento apetitivo seguido inmediatamente por el aversivo. Los grupos experimentales son los siguientes: CT_{AP} - CT_{AV} (control en ambas fases), TR_{AP} - CT_{AV} (entrenado en la fase apetitiva y control en la apetitiva), CT_{AP} - TR_{AV} (control en la apetitiva y entrenado en la aversiva) y TR_{AP} - TR_{AV} (entrenado en ambas fases). Los resultados correspondientes a la sesión de evaluación se muestran en la **Figura 5.4**. En el *test apetitivo* [ANOVA, $F_{3,116}$ =3.28, p<0.05; comparaciones planeadas: p<0.005] se obtuvo una diferencia significativa TR>CT entre CT_{AP} - CT_{AV} vs. TR_{AP} - CT_{AV} (p<0.005), mientras que el par de grupos CT_{AP} - TR_{AV} vs. TR_{AP} - TR_{AV} , que estuvo seguido por el entrenamiento

aversivo, muestra diferencias no significativas (p=0.63). Por otro lado, los resultados del *test* aversivo [ANOVA $F_{3,116}$ =9.36, p<0.01] muestran que ambos pares de grupos presentan diferencias significativas TR<CT: CT_{AP} - CT_{AV} vs. CT_{AP} - CT_{AV} (p<0.05) y TR_{AP} - CT_{AV} vs. TR_{AP} - CT_{AV} (p<0.001), indicativas de retención de la memoria contexto-EVP. Estos resultados indican que el entrenamiento aversivo realizado después del apetitivo interfiere con la memoria apetitiva, mientras que no se ve afectada la memoria aversiva.

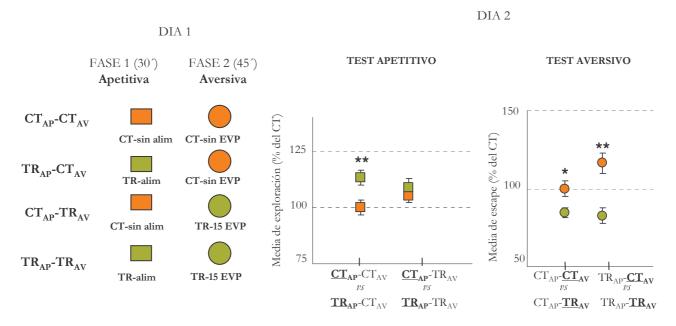


Figura 5.4: El entrenamiento aversivo inmediatamente después del apetitivo inhibe la memoria apetitiva sin afectar la memoria aversiva. Panel izquierdo. Día 1: Protocolo experimental de la sesión de entrenamiento. Dos fases experimentales sucesivas: fase apetitiva (30 min, indicado con cuadrados) inmediatamente seguida por una fase apetitiva (45 minutos, indicada con círculos). N=30 por grupo. Símbolos como en Fig. 5.1. Paneles a la derecha: Día 2. Resultado de la sesión de evaluación: Testeo apetitivo: Media de respuesta exploratoria durante los primeros 5 min. Testeo aversivo. Media de escape al EVP. Los valores se expresan como porcentaje de la respuesta del grupo CT_{AV}-CT_{AP}, *: p<0.05; **:p<0.01

5.3. Conclusiones y Discusión

Los resultados obtenidos nos permiten analizar cómo interactúan los dos tipos de aprendizaje cuando ocurren temporalmente cerca. Al presentar el entrenamiento apetitivo inmediatamente después del aversivo, se observa por un lado retención de la memoria apetitiva, y por el otro un efecto amnésico de la memoria aversiva (Figura 5.1). En cambio, cuando el entrenamiento apetitivo se presenta una hora después de finalizado el aversivo, no se observa tal efecto deletéreo, sino que los animales evidencian una retención tanto de la memoria apetitiva como de la aversiva (Figura 5.2). Al coexistir ambos entrenamientos,

no se encuentra retención para ninguna de las dos memorias (Figura 5.3). Finalmente, al invertir el orden de los entrenamientos y realizar el apetitivo seguido inmediatamente por el aversivo (Figura 5.4), se observa un efecto deletéreo sobre la memoria apetitiva y retención de la aversiva. A partir de este patrón de resultados podemos apreciar que los aprendizajes interfieren entre sí sólo cuando el intervalo entre ambos es muy breve. Además, la interferencia tiene lugar sobre el aprendizaje que ocurrió primero, mientras que el que ocurrió en segundo lugar es capaz generar una memoria resultante de la experiencia, aún estando precedida por un entrenamiento de signo opuesto. Es posible asumir entonces que el segundo aprendizaje estaría interfiriendo con una etapa temprana de la consolidación del primer aprendizaje.

Un aspecto a considerar es el de los mecanismos que estarían determinando el patrón de interacción observado entre el protocolo apetitivo y el aversivo. Los resultados muestran que la influencia del aprendizaje apetitivo sobre el aversivo es semejante a la que se obtuvo con inyecciones de OA exógena (ver figura 3.2). Es decir que la presentación del estímulo incondicionado apetitivo tiene el mismo efecto sobre la memoria aversiva que las inyecciones de OA, al presentarse aproximadamente a los mismos tiempos. De esta manera, la misma señal química implicada en la codificación del estímulo apetitivo también sería capaz de inhibir al aprendizaje aversivo. Estos resultados permiten realizar una reinterpretación de los obtenidos con las invecciones de OA exógena sobre la memoria aversiva. Nuestra propuesta es que el efecto deletéreo de la OA podría ser consecuencia de la aplicación de una señal contrapuesta a la del estímulo aversivo, lo cual puede conducir a una codificación fallida del refuerzo. O bien, la OA podría constituir una señal que "reste" algebraicamente el valor negativo del EVP hasta hacerlo poco relevante para el animal. Aunque especulativas, estas interpretaciones permiten conciliar los resultados sobre la acción de la OA obtenidos sobre los dos paradigmas. Hasta el momento, los estudios sobre OA y memoria en diversos modelos de invertebrados se centraron en demostrar que la misma tendría relevancia en modelos apetitivos, y que no sería requerida en modelos aversivos (Schwaerzel et al., 2003; Unoki et al., 2006; Vergoz et al., 2007). Pero este enfoque impedía considerar una acción "cruzada", restringiendo de este modo el análisis y las interpretaciones posibles. Tal es así que nuestros resultados constituyen la primera evidencia de que la OA tiene un efecto deletéreo sobre una memoria aversiva y a su vez que el mismo efecto puede relacionarse con el papel de la OA en la memoria apetitiva.

Quedan aún por analizar los casos de doble aprendizaje en los cuales el entrenamiento apetitivo y el aversivo son presentados simultánea y sucesivamente (primero el apetitivo y después el aversivo). En el caso del entrenamiento conjunto, nuestra interpretación de la ausencia de retención de ambas memorias es que se produciría una inhibición recíproca de un aprendizaje sobre el otro. Sin embargo, podría argüirse que la falta de retención se debe a que la presentación conjunta de ambos podría resultar un entrenamiento débil, o bien una situación conflictiva que lleve a una anulación de ambos estímulos. Consideramos poco factibles estas opciones debido a los siguientes hechos: a) los animales no evidencian una alteración en la adquisición aversiva ni en la apetitiva, sino que escapan y se alimentan normalmente. b) no se muestran comportamientos desplazados ni conductas atípicas que evidencien una situación de conflicto entre estímulos. Por otro lado, en el caso del entrenamiento apetitivo seguido por el aversivo, los resultados indican un patrón similar al obtenido en el caso inverso: el entrenamiento realizado en segundo lugar (aversivo) interfiere con el primero (apetitivo).

Nuestra propuesta para interpretar conjuntamente esta serie de resultados es un modelo hipotético que incluye las siguientes premisas (ver **Figura 5.5** donde se esquematiza el modelo):

- Cada tipo de aprendizaje estaría mediado por una señal química diferente. En el caso del entrenamiento apetitivo, la señal mediadora sería la OA, en base a nuestros resultados del Capítulo 4. En el caso del entrenamiento aversivo, no tenemos evidencias para asignarle una identidad definida, aunque un número de trabajos en insectos (Keene & Waddell, 2005; Riemensperger et al., 2005; Schroll et al., 2006; Schwaerzel et al., 2003; Unoki et al., 2006; Vergoz et al., 2007) señalan a la dopamina (DA) como mediadora de estímulos incondicionados de tipo aversivo, por lo que la consideramos como una molécula candidata.
- Cada señal química (OA o DA) tendría una doble acción: por un lado mediaría el refuerzo de su "propio" aprendizaje (apetitivo u aversivo), de modo tal que cada una tendría una señal instructiva en un aprendizaje específico (Giurfa, 2006). Por el otro lado, cada señal puede inhibir el aprendizaje de signo opuesto siempre que su acción coincida con una fase temprana de consolidación de la otra memoria.
- Cuando los aprendizajes ocurren alejados en el tiempo, el animal puede adquirir los dos tipos de memorias, tanto en el caso de que ambas ocurran en el mismo contexto como en contextos diferentes.

Este sistema de la acción recíproca de dos señales químicas le permitiría al animal resolver ciertas situaciones conflictivas derivadas de una simultaneidad total o parcial de aprendizajes de significado opuesto. Por lo general cada tipo de aprendizaje se estudia separadamente, pero en la vida real de un individuo es posible que los procesos de aprendizaje tengan un patrón más dinámico e impredecible, en donde puede ocurrir una sucesión de diferentes tipos de aprendizaje en momentos cercanos, en un mismo o en diferentes contextos.

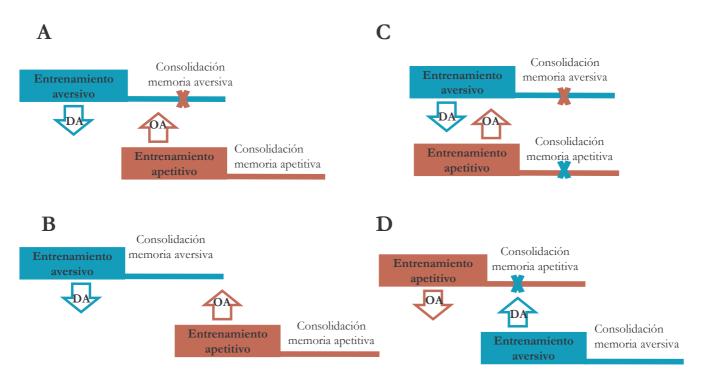


Figura 5.5. Esquema del modelo interpretativo sobre la interacción de los dos tipos de aprendizajes. En cada caso, el rectángulo celeste representa la fase aversiva y el rosa la fase apetitiva. La línea representa la fase de consolidación que sigue a cada aprendizaje. Las cruces indican la inhibición del proceso de consolidación. Las flechas indican las señales químicas que señalizan al estímulo incondicionado en cada aprendizaje: la rosa es la OA, propia del apetitivo, y la celeste corresponde a la señal del aversivo, posiblemente la DA. A) El entrenamiento aversivo está seguido inmediatamente por el apetitivo, el cual interfiere sobre la consolidación del primero a través de la OA. En cambio, la DA no afecta al apetitivo pues no alcanza a su fase de consolidación. B) El entrenamiento aversivo y el apetitivo están separados por un intervalo de una hora. En esta ocasión la OA no alcanza a interferir la consolidación de la memoria aversiva. C) Cuando los aprendizajes ocurren simultáneamente, la OA interfiere sobre la consolidación aversiva y la DA sobre la apetitiva. D) Cuando el aprendizaje aversivo se realiza inmediatamente después que el apetitivo, la DA interfiere con la consolidación de la memoria apetitiva, mientras que la OA no alcanza a afectar a la consolidación aversiva

Sin embargo, es posible asumir que la interferencia entre los dos tipos de aprendizaje sea causada por otros factores no relacionados con la señalización del estímulo incondicionado. Por ejemplo, podría ocurrir que ambos procesos compartan ciertas vías

nerviosas que en un caso requieran una activación y en el otro una inactivación, y que consecuentemente al ocurrir se produzca una interferencia al ocurrir simultáneamente. A pesar de las posibles explicaciones alternativas, nuestro modelo tiene la ventaja de que posee un valor heurístico, dando lugar a una serie de experimentos para evaluar su factibilidad.

Por otro lado, en relación al procesamiento mnésico, el resultado donde los aprendizajes están separados por una hora estaría indicando que los animales son capaces de retener dos tipos de memoria de significado y valor completamente diferente, adquiridas en un mismo contexto. Es decir que en la sesión de evaluación, al exponer a los animales doble-entrenados al contexto de entrenamiento, inicialmente revelan una respuesta condicionada apetitiva (incremento en la exploración) y luego, ante el pasaje del EVP, presentan la respuesta condicionada aversiva (decremento en la respuesta de escape). Este resultado es indicativo de una notable capacidad de procesamiento mnésico en Chasmagnathus, lo cual, en un contexto donde predominan marcadamente los estudios realizados en modelos de vertebrados, constituye una demostración de la complejidad cognitiva de un invertebrado. Finalmente, un aspecto a destacar de los resultados es que la interferencia entre los protocolos depende del orden en el que se recibieron, el segundo afecta al primero. Esto indica que aparentemente no habría un aprendizaje que tuviera una preponderancia sobre el otro, dado que al presentarse secuencialmente los dos son capaces de afectar la retención del aprendizaje opuesto. Si bien a priori tenderíamos a pensar que un estímulo de peligro sería más relevante para el animal, en este caso se observa que la comida posee una saliencia similar, lo cual puede tener relación con un valor adaptativo igualmente determinante de comportamientos defensivos y alimenticios en el comportamiento de Chasmagnathus.

Capítulo 6

Efecto de la octopamina sobre el comportamiento agresivo de *Chasmagnathus*

6.1. <u>Introducción</u>

Papel de la OA en la regulación de la agresión

Las aminas biogénicas han sido implicadas como reguladoras fisiológicas clave del comportamiento agresivo en distintos grupos animales, desde mamíferos hasta insectos (Huber et al., 1997a). El papel de la octopamina (OA) en relación a la agresión se comenzó a estudiar hace casi treinta años en crustáceos decápodos, usando como modelo a la langosta marina Homarus americanus. En aquel trabajo (Livingstone et al., 1980) se analizaron los cambios posturales inducidos por las inyecciones de serotonina (5HT) y de OA: se observó que los animales inyectados con 5HT adquirían una postura erguida típica de individuos dominantes, con el abdomen y las patas flexionadas, mientras que la OA producía un efecto opuesto, causando una hiperextensión de las extremidades, característica de los animales subordinados. Si bien estos resultados fueron atribuidos a un efecto periférico de las aminas sobre la actividad de motoneuronas, se planteó que tendrían adicionalmente un efecto sobre el sistema nervioso central y que podrían afectar el comportamiento agresivo. A partir de ese trabajo, la mayoría de los estudios publicados se abocaron a analizar el papel de la 5HT sobre diversos aspectos del comportamiento agonístico de crustáceos, como su efecto en la dinámica de los enfrentamientos, en el reflejo de escape (el golpe de cola o tailflip), y en el control postural de la langosta de río Procambarus clarkii y la marina Homarus americanus (Edwards & Kravitz, 1997; Horner et al., 1997; Huber et al., 1997b; Kravitz, 2000; Panksepp et al., 2003; Yeh et al., 1997), entre otras especies. Las conclusiones de estos trabajos llevaron a proponer que la 5HT estaría asociada a un aumento del nivel de agresión y a una disminución en los actos de retroceso u escape, por lo se la asoció fuertemente con un estatus de dominante. Estos resultados resultaron contrastantes con estudios realizados en vertebrados, incluyendo humanos, donde se vio que los niveles bajos de 5HT llevan a estados de alta agresión (Edwards & Kravitz, 1997).

Contrariamente a la gran cantidad de trabajos realizados sobre 5HT, se avanzó relativamente poco en la caracterización funcional de la OA sobre el comportamiento agresivo de crustáceos. En algunos trabajos publicados al respecto se describió que, además de los cambios posturales, su aplicación causaba una disminución en el nivel de agresión y comportamientos asociados con el estatus de subordinado, como una mayor tendencia al escape (Antonsen & Paul, 2001; Bevengut & Clarac, 1982; Tricarico & Gherardi, 2007;

Sosa & Baro, 2002), aunque las evidencias fueron poco concluyentes.

Paralelamente, el estudio de la OA sobre la agresión se extendió a varias especies de insectos. En el grillo *Gryllus bimaculatus*, se vio que la depleción de OA y dopamina del sistema nervioso central causaba una reducción en el nivel de agresividad (Stevenson *et al.*, 2000). Además se demostró que luego del vuelo, una actividad que implica un aumento de los niveles de OA (Candy *et al.*, 1997), los animales presentaban una mayor tendencia a entablar una lucha, la cual puede revertirse mediante la aplicación de antagonistas de OA (Stevenson *et al.*, 2005). En abejas *Apis mellifera*, la inyección de agonistas octopaminérgicos provocó un aumento en la tendencia de agresión hacia individuos de otra colmena (Schulz & Robinson, 1999; Wagener-Hulme *et al.*, 1999). Finalmente, en la mosca *Drosophila melanogaster* individuos mutantes en una clave en la ruta biosintética de la OA, la TβH (tiramina beta hidroxilasa), muestran menor cantidad de despliegues agresivos que los individuos salvajes (Baier *et al.*, 2002; Hoyer *et al.*, 2008).

En vista de los resultados comentados, puede apreciarse que la OA está implicada en la regulación de la agresión en los artrópodos, aunque tendría un papel diferente según el grupo considerado. Mientras que en los crustáceos estaría relacionada con una disminución de la agresión, en los insectos jugaría un rol opuesto, aumentando la tendencia al enfrentamiento. Esto último también puede analizarse desde la perspectiva de autores que consideran que la OA estaría determinando el nivel de motivación general de los animales, dentro del cual estaría incluida la motivación a la pelea (Adamo *et al.*, 1995), y que no cumpliría un papel específico en la agresión.

<u>Objetivos</u>: considerando que la OA ha sido repetidamente relacionada con el control de la agresión en los artrópodos, en este capítulo nos propusimos estudiar su rol en el comportamiento agresivo del cangrejo *Chasmagnathus*. Los objetivos particulares son:

- -Caracterizar el comportamiento agonístico de esta especie en condiciones de laboratorio usando pares de animales y analizar si se establecen relaciones del tipo dominante-subordinado.
- -Analizar el efecto de la aplicación de OA exógena sobre la dinámica de los enfrentamientos y la postura de los animales.

Hipótesis: la aplicación de OA tendería a reducir el nivel de agresividad de los animales y aumentaría sus probabilidades perder en un enfrentamiento agonístico.

6.2. Diseño experimental

En el Capítulo 2 (Sección 2.7) se detalla el procedimiento general de los experimentos de agresión. En líneas generales, se usan pares de animales igualados en tamaño corporal y de quela que se enfrentan en una arena experimental reducida durante 10-15 minutos, durante los cuales se registra su comportamiento a través de una cámara de video. Se determina el tiempo destinado a tres categorías: aproximación (AP), ataque (AT) y retroceso (R), y se calculan los índices correspondientes (nivel de dominancia individual, para cada uno de los contrincantes, y el tiempo total de interacción, para cada par de animales). Luego se establece cuál es animal dominante y el subordinado para cada pelea, y en los casos donde esto no sea posible se lo considera como un enfrentamiento no definido.

Realizamos los siguientes experimentos:

6.2.1. Experimento sin intervención

El objetivo de este experimento es caracterizar la dinámica de los enfrentamientos entre pares de animales de igual tamaño. Los animales se mantuvieron aislados por una semana y se enfrentaron en díadas durante 10 minutos, sin recibir ningún tratamiento farmacológico.

6.2.2. Experimentos farmacológicos

Efectos posturales

Inicialmente determinamos el efecto de las inyecciones de OA sobre la postura de los animales, con el objeto de analizar si, al igual que en otras especies de crustáceos, se obtienen posturas características de animales subordinados. Realizamos un experimento cualitativo usando dos dosis de OA: 10⁻¹ M y 4.10⁻³ M, que se compararon con un grupo control inyectado con solución salina (SAL), con 10 animales por grupo. Se filmó su actividad durante los 10 minutos siguientes a la inyección y se evaluaron los cambios en la postura y en la respuesta exploratoria.

Efectos sobre las peleas

En segundo lugar, analizamos si la OA afecta la dinámica de las peleas y el resultado de las mismas, realizando enfrentamientos de animales que recibieron previamente una inyección de OA. Se realizaron dos experimentos diferentes, en donde se inyectó a uno o a los dos integrantes de la pareja con OA. En estos casos la duración de los enfrentamientos fue de 15 minutos.

OA-SAL. Uno de los animales de la pareja fue inyectado con una solución de OA 4.10⁻³ M y el otro con solución salina (grupo OA-SAL), aplicada 15 minutos antes de la pelea. Adicionalmente se incluyó un grupo control donde los dos animales recibieron una inyección de solución salina (grupo SAL-SAL). Como sólo uno de los animales de la pareja recibe OA, este experimento permitió evidenciar si se produce alguna diferencia en el resultado del enfrentamiento debido a la droga, es decir, si la OA hace más proclives a los animales a perder la pelea. Asimismo, se evaluó el comportamiento de cada individuo inyectado con OA respecto a su contrincante para ver si varía la proporción de tiempo destinado a las diferentes categorías.

OA-OA. Los dos animales de la pareja fueron inyectados con una solución de OA 4.10⁻³ M (grupo OA-OA), o bien con solución salina (grupo SAL-SAL), 15 minutos antes del enfrentamiento. El objetivo de este experimento fue evidenciar si la OA afectaba el nivel de agresión general durante el enfrentamiento, por lo que se realizaron comparaciones entre las parejas inyectadas con OA en relación a las salinas. Este diseño permite detectar cambios globales de la OA sobre la dinámica de las peleas.

Análisis de los datos

Para cada uno de los enfrentamientos se analizó en primer lugar si era posible determinar a un animal dominante y un subordinado, con lo cual pudimos evaluar si la inyección de OA estaba afectando de modo generalizado la definición de las peleas. Luego, en el caso del experimento OA-SAL, se comparó el porcentaje de individuos inyectados con OA que resultaron dominantes en relación a los que resultaron subordinados, con el fin de determinar si la OA tenía un efecto sobre el resultado del enfrentamiento. Para estimar las diferencias entre las proporciones observadas y las estimadas se usó un test de

Chi cuadrado.

Para analizar el efecto de la OA sobre la dinámica de las peleas, se compararon los tiempos dedicados a cada comportamiento (AP, AT o R), así como el tiempo total de interacción entre los grupos experimentales o entre los miembros de la pareja. Las diferencias entre los índices fueron analizadas usando un test de *t* pareado de dos colas (cuando se compararon animales de una misma pareja), o no pareado (cuando se hicieron comparaciones respecto al grupo control).

Para poder analizar conjuntamente los datos de distintas series experimentales se realizó una normalización respecto al grupo control, expresando el tiempo total de interacción (TTI) de cada pareja en relación al TTI del grupo salino correspondiente. En el caso de los parámetros individuales, se calculó qué porcentaje representa cada tipo de acto realizado por un animal (AP, AT o R) sobre el TTI de la pareja.

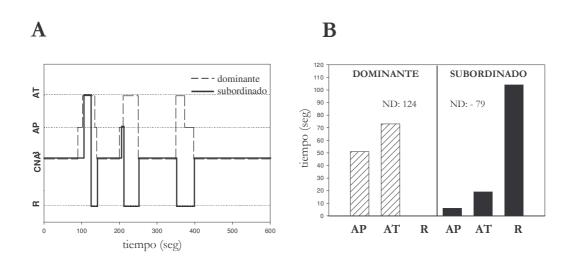
6.3. Resultados

6.3.1. Experimento sin intervención: Descripción de una pelea

La observación de diversos enfrentamientos de animales que no recibieron ningún tratamiento farmacológico permitió extraer las características más relevantes del comportamiento agonístico de *Chasmagnathus* en condiciones de laboratorio: 1- No se observan despliegues de agresión ritualizada, ni posturas características de dominante y subordinado. El animal subordinado no presenta un patrón de sumisión como ocurre en otros decápodos (Antonsen & Paul, 2001). 2- Los ataques conllevan un bajo riesgo de lesión. No se observó en ningún caso pérdida de patas o quelas por autotomía. 3- La gran mayoría de las peleas son definidas en el lapso de 10 minutos, pudiendo establecer luego de ese período a un animal ganador y un perdedor. Si bien los términos *dominante* y *subordinado* denotan la existencia de un estatus social, lo cual no ha sido específicamente evaluado en estos experimentos, usaremos estos términos como sinónimos de ganador y perdedor.

Los gráficos ilustrados en la **Figura 6.1** corresponden a una de las interacciones analizadas en esta sección. Allí se resume la metodología aplicada en el análisis de cada enfrenamiento, ejemplificándola con los datos particulares de un encuentro. En la **Figura 6.1 A** se ilustra la secuencia temporal de la pelea: puede apreciarse que inicialmente los dos animales realizan comportamientos no agonísticos (como la exploración de la arena, o el reposo) hasta que se produce la aproximación de uno de los individuos hacia el otro,

seguida por un ataque, que pasa a ser mutuo (generalmente quedan agarrados de las pinzas), hasta que uno de los animales retrocede. A partir de ese momento queda definido el enfrentamiento y se observa una asimetría en el tipo de actos realizados: el dominante sólo realiza aproximaciones y ataques y el subordinado sólo retrocesos. En la **Figura 6.1. B** se muestra la distribución total de los actos durante los 10 minutos para los dos animales y el valor de los índices correspondientes. El parámetro que más claramente diferencia a los dos oponentes es el retroceso, dado que es una acción realizada casi exclusivamente por el subordinado.

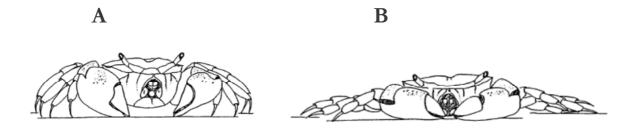


<u>Figura 6.1</u> Ejemplo de un enfrentamiento agonístico y la metodología utilizada para su análisis. **A)** Curva temporal de la interacción. Se representa la cinética de la interacción mostrando el desempeño de los dos animales durante los 10 minutos del encuentro agonístico. La línea punteada corresponde al animal que resultó dominante y la continua al subordinado. Se establecieron valores arbitrarios para las diferentes categorías comportamentales: AP: aproximación, AT: ataque, R: retroceso., CNA: comportamiento no agonístico. **B)** Diferencias entre dominantes y subordinado. El tiempo que pasó cada animal en las diferentes categorías nos permite estimar el nivel de dominancia individual (NDI= AP+AT-R) y así determinar cuál animal fue dominante y cuál subordinado.

6.3.2. Una dosis alta de OA genera cambios en la postura de los animales

La observación de las filmaciones correspondientes a los experimentos posturales revela un efecto de la dosis de 10⁻¹ M sobre la postura de los animales, mientras que la dosis de 4.10⁻³ M resulta indistinguible de la de solución salina. La aplicación de OA 10⁻¹ M provoca una híper-extensión de las extremidades y una posición baja de las quelas (**Figura 6.2**) generándose una postura de adhesión al sustrato. Asimismo, los animales presentan una reducida movilidad durante el período de observación de 10 minutos. Sin embargo, se

recuperan después de aproximadamente media hora, y no se observa un efecto sobre su posterior viabilidad.



<u>Figura 6.2</u> Cambios posturales inducidos por la inyección de OA. A) Posición de reposo característica. Es la que suelen adoptar los animales inyectados con solución salina o con la dosis de OA 4.10⁻³ M **B)** Postura adquirida luego de la inyección de OA.10⁻¹ M. Se observa que la extensión de las patas caminadoras y las quelas, así como la posición baja del cuerpo apoyándose en el sustrato. (Adaptado de Pereyra *et. al*, 1999)

6.3.3. La OA altera la dinámica de los enfrentamientos, pero no su resultado

En el experimento "OA-SAL", el análisis de los resultados cualitativos indica que el porcentaje de peleas definidas no difiere significativamente entre los grupos OA-SAL y el grupo control SAL-SAL. Por lo tanto, la invección de OA no causaría un efecto inhibitorio general sobre la agresión. Por otro lado, al analizar el resultado de los enfrentamientos del grupo OA-SAL se encontró que los animales inyectados con OA resultaron dominantes o subordinados en iguales proporciones [χ^2_{47} , p=0.3]. Es decir que la OA no aumenta la tendencia a ser subordinado. Respecto a la dinámica de los enfrentamientos, en la Figura 6.3.A se observan los resultados correspondientes al grupo OA-SAL, donde puede apreciarse que los animales inyectados con OA dedican significativamente menos tiempo a los actos dominantes (aproximaciones y ataques), y más tiempo a los retrocesos en relación a sus contrincantes inyectados con SAL [test de t pareado, 2 colas, AP: t₄₇=-2,47; AT: t₄₇=-2,33; R: t_{47} = -2,1, p<0.05 en los tres casos]. En la **Figura 6.3 B** vemos que tiempo total de interacción del grupo OA-SAL resulta un poco menor al del grupo SAL-SAL, pero la diferencia no alcanza el nivel de significativa [test de t no pareado, 2 colas, t₈₄=1.41, p=0.16]. Por lo tanto, una inyección de OA no afectaría el nivel general de interacción de la pareja, pero modifica el tipo de actos realizados por el individuo, disminuyendo la proporción de actos dominantes y aumentando la de actos sumisos.

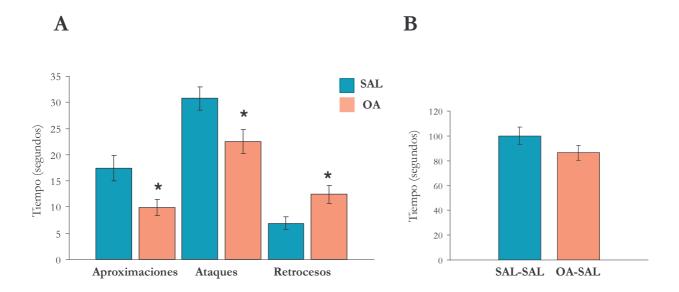


Figura 6.3: Resultados correspondientes al Exp OA-SAL. A) Tiempo destinado a aproximaciones, ataques y retrocesos de los animales del grupo OA-SAL. El color celeste corresponde a los animales inyectados con SAL y el rosa a los inyectados con OA. *: p<0.05 (prueba de *t* pareada). N=48 parejas. **B**) Tiempo Total de Interacción de las parejas donde ambos animales recibieron SAL (SAL-SAL), *vs.* las parejas donde un animal recibió SAL y el otro OA (SAL-OA). N=86 parejas

En el experimento "OA-OA" los resultados cualitativos no revelan diferencias en el porcentaje de peleas definidas entre los grupos OA-OA vs. SAL-SAL, lo cual estaría indicando que sigue produciéndose un enfrentamiento agonístico entre dos individuos inyectados con OA. Respecto al tiempo dedicado a cada categoría (**Figura 6.4.A**), no se observan diferencias en la distribución de los actos de los individuos del grupo OA-OA respecto a los del control SAL-SAL [test de t no pareado AP: t₁₄₆=-0.51, p=0.6, AT: t₁₄₆=0.34, p=0.73; R: t₁₄₆=0.008, p=0.99]. Sin embargo, al analizar conjuntamente a las parejas OA-OA en relación a las parejas control, se observa que el tiempo total de interacción de los pares inyectadas con OA es significativamente menor [test de t no pareado, 2 colas, t₇₂= 2.21, p<0.05] respecto a las inyectadas con SAL (**Figura 6.4.B**). Por lo tanto, la OA disminuye globalmente el nivel de interacción entre los individuos, pero no afecta la distribución de actos realizados por los mismos.

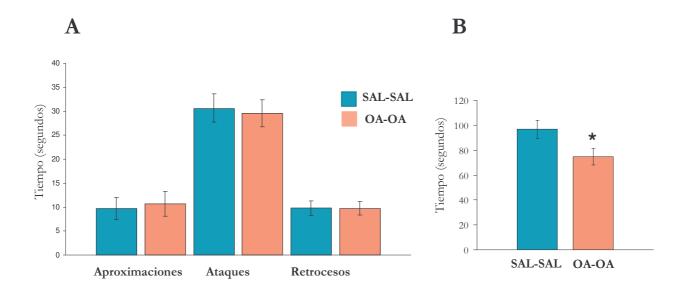


Figura 6.4: Resultados correspondientes al Exp OA-OA. A) Distribución del tiempo destinado a AP, AT y R en los animales inyectados con SAL (grupo SAL-SAL) respecto a los inyectados con OA (grupo OA-OA). Comparaciones no pareadas. N=148 individuos **B**) Tiempo total de Interacción de las parejas donde ambos animales recibieron SAL (SAL-SAL), vs. las parejas donde ambos recibieron OA (OA-OA). N=74 parejas

6.4. Conclusiones y Discusión

Nuestro trabajo constituye el primer estudio sistemático del comportamiento agresivo en el cangrejo *Chasmagnathus*. Como ocurre en otras especies de crustáceos decápodos, al enfrentar dos cangrejos machos de tamaño similar se entabla una lucha entre ambos que generalmente culmina con el retroceso de un animal ante el ataque del otro, determinándose de este modo un ganador y un perdedor (Figura 6.1). Sin embargo, a diferencia de lo que se describe en otras especies (Goessmann *et al.*, 2000; Issa *et al.*, 1999; Karavanich & Atema, 1998), no se evidencian despliegues ni posturas características de animales dominantes o subordinados, y la agresión entre los contrincantes no alcanza niveles muy altos. Vale la pena considerar estos resultados en relación al hábitat natural de los animales. Estos cangrejos habitan zonas intermareales, formando extensas poblaciones con una alta densidad de cuevas por metro cuadrado (Botto & Iribarne, 2000). La observación de videos grabados a campo (Fathala, comunicación personal) reveló que las interacciones directas entre coespecíficos suelen ser de tipo agresivo, y que ocurren generalmente en el marco de disputas territoriales por acceso a las cuevas. Estas luchas en situaciones naturales mostraron tener un repertorio agonístico similar al descripto en el

presente trabajo, con la diferencia de que en el campo los animales perdedores suelen escaparse, mientras que en la arena experimental deben permanecer en el mismo espacio que los dominantes.

Resulta interesante discutir sobre los factores que contribuyen a que un animal gane o pierda un enfrentamiento diádico, aunque no haya sido específicamente evaluado en nuestros experimentos. El resultado de una interacción agonística puede deberse a diferencias entre los atributos individuales de los oponentes capaces de modificar su habilidad de pelea. En los crustáceos decápodos se demostró que factores como el tamaño corporal (Caldwell & Dingle, 1979; Sneddon & Swaddle, 1999); el tamaño y simetría de las quelas (Sneddon & Swaddle, 1999); el estadio en el ciclo de muda (Bolingbroke & Kass-Simon, 2001), los efectos de la dieta (Vye et al., 1997), el tiempo de aislamiento (Dunham, 1972; Grant & Ulmer, 1974) y la experiencia agonística previa (Karavanich & Atema, 1998), pueden afectar el resultado de las peleas. En nuestro caso, intentamos igualar estos factores en la mayor medida posible, enfrentando animales de igual tamaño corporal y de quela, que no presentaran asimetrías en el tamaño de las pinzas y que no evidenciaran signos de pre-muda. Asimismo, todos los animales tuvieron un período de aislamiento de una semana, el cual contribuiría a "remover" los efectos de la experiencia agonística previa (Guiasu & Dunham, 1999). En base a esto, consideramos que el resultado del enfrentamiento, así como su dinámica, podrían ser una consecuencia de las diferencias en el nivel de agresividad individual de los oponentes, una característica accesible a la modulación por las aminas biogénicas como la OA, aunque no podemos descartar la influencia de algún factor no controlado.

Las evidencias experimentales presentadas en este Capítulo demuestran que la OA tiende a disminuir el nivel de agresión de los animales. Esta aseveración surge principalmente de los siguientes resultados, provenientes de diferentes diseños experimentales: en primer lugar, la OA reduce el tiempo de interacción respecto al grupo control cuando se la aplica a los dos animales de la pareja (experimento OA-OA, Figura 6.4); en segundo lugar la inyección de OA a uno de los contrincantes provoca una reducción en los ataques y las aproximaciones y un aumento en los retrocesos, en comparación con los de su oponente inyectado con solución salina (experimento OA-SAL, Figura 6.3). Sin embargo, los resultados cualitativos del experimento OA-SAL muestran que los animales inyectados con OA tienen igual probabilidad de resultar dominantes o subordinados. Esto último puede resultar poco coherente con los resultados anteriores,

pues en principio tenderíamos a pensar que si la droga disminuye el nivel de agresión, entonces haría a los animales más proclives a resultar subordinados. Pero debe tenerse en cuenta que la inyección de OA se realiza de modo azaroso, desconociendo la agresividad propia de cada uno de los contrincantes. Por lo tanto puede recaer sobre un animal intrínsecamente muy agresivo que termina ganando el enfrentamiento, pero que debido a la acción de la OA disminuye los ataques y aproximaciones realizados. En consecuencia, resulta más informativa una comparación de los grupos independientemente del resultado final del enfrentamiento. Coincidentemente con nuestro trabajo, un estudio reciente realizado en langostas de río (Tricarico & Gherardi, 2007) demuestra que la OA reduce el nivel de agresión, pero que no es capaz de alterar la jerarquía de los animales: un dominante invectado con OA continúa siendo dominante. Evidentemente, el nivel intrínseco de agresividad u otros factores no controlados afectan en gran medida el resultado de la pelea. Además, en nuestros experimentos sólo evaluamos una única dosis de OA (4.10⁻³ M), y el tiempo transcurrido entre la inyección y la pelea fue siempre de 15 minutos, por lo que es posible que otras dosis o tiempos tengan efectos más marcados sobre la definición de una pelea.

Por otro lado, pudimos comprobar que la aplicación de una dosis muy alta de OA (10⁻¹ M) genera cambios posturales notorios en los animales, provocando la extensión de las patas caminadoras y los quelíceros y una posición de adhesión al sustrato (Figura 6.2). En cambio, la dosis de 4.10⁻³ M, que es la utilizada en los experimentos de peleas con inyección, no produce modificaciones notables sobre la postura. Por lo tanto, los efectos comentados previamente de la OA sobre la agresión no se correlacionarían con cambios posturales de los individuos. La postura generada por la invección de OA en Chasmagnathus es similar a la observada en otras especies de crustáceos, así como también el rango de las dosis utilizadas (Bevengut & Clarac, 1982; Sosa & Baro, 2002; Tricarico & Gherardi, 2007; Livingstone et al., 1980; Antonsen & Paul, 1997). En algunos de estos trabajos se consideró que la postura adquirida como consecuencia de la inyección era similar a la que adoptaban los animales subordinados luego de un enfrentamiento (Livingstone et al., 1980; Antonsen & Paul, 1997). De hecho, se identificaron varios sitios de acción de la OA en el sistema de control postural de la langosta marina Homarus americanus y la langosta de río, Procambarus clarkii, tanto a nivel de neuronas comando que regulan la respuesta de escape (Glanzman & Krasne, 1983), como a nivel neuromuscular (Harris-Warrick & Kravitz, 1984) y muscular (Kravitz et al., 1980). Por el contrario, en nuestro estudio los animales subordinados no revelaron cambios posturales de ningún tipo, por lo que no es posible establecer la correspondencia entre la agresión, la postura y la acción de la OA. Tal vez esto se deba a las características del sistema octopaminérgico de *Chasmagnathus*: en ocasiones las modificaciones a nivel de circuitos o grupos neuronales en una especie se correlacionan con la presencia o ausencia de determinados comportamientos (Antonsen & Paul, 2001).

En este capítulo demostramos que la OA modifica el comportamiento agresivo de Chasmagnathus, pero queda aún el interrogante de cuáles son los sistemas afectados por la acción de la amina. En el caso de la serotonina, cuyo efecto ha sido analizado profundamente en langostas marinas Homarus americanus (Edwards & Kravitz, 1997), se vio que la mayor parte de sus influencias sobre el comportamiento agonístico provenían de dos neuronas de gran tamaño situadas en el primer ganglio abdominal, de función neurosecretora. Estas neuronas recibirían estímulos provenientes de órganos sensoriales y se conectarían con órganos efectores tónicos (capaces de generar cambios posturales), y fásicos (relacionados con la respuesta de escape y la lucha) a través de dos plexos neurosecretores diferentes (Horner et al., 1997; Ma et al., 1992). Sin embargo, en el caso de la OA se desconocen en gran medida los sustratos neuronales afectados por la aplicación exógena de la droga. En algunas especies de crustáceos se realizó un mapeo de las fibras octopaminérgicas (Antonsen & Paul, 2001; Heinrich et al., 2000; Schneider et al., 1993), que permitió obtener una visión aproximada de los sistemas neurohormonales que liberan OA, pero se avanzó poco en una caracterización funcional de los mismos. Es posible que la disponibilidad de nuevas técnicas permita un abordaje más profundo sobre el accionar de la OA en la agresión; en particular, los estudios que se vienen realizando en insectos como la mosca Drosophila resultan auspiciosos pues brindan un salto cualitativo en el nivel de análisis utilizado, incorporando herramientas genéticas y moleculares, que incluso permiten expresar una mutación de interés en una zona determinada y un momento deseado (Baier et al., 2002; Hoyer et al., 2008).

Capítulo 7

La relación entre el comportamiento agonístico y la capacidad mnésica

7.1. <u>Introducción</u>

Memoria y agresión

El desempeño de un individuo ante una determinada tarea de aprendizaje puede verse afectado por una multiplicidad de factores, tanto ambientales como surgidos de la interacción con otros individuos. Una serie de trabajos realizados en diferentes especies de vertebrados demostraron que la capacidad de memoria de un animal estaba relacionada con su nivel de agresividad, expresado en su condición de ganador o perdedor de un encuentro agonístico, o en su rango dentro de una jerarquía social. En particular, se vio que los ratones machos subordinados presentaban un déficit en su memoria espacial, evaluada en un laberinto acuático (Francia et al., 2006) o en un laberinto de tipo "T" (Fitchett et al., 2005), y en este último caso la deficiencia en la memoria persistía aún semanas después de haber perdido un enfrentamiento. En otro trabajo se demostró que los ratones de mayor jerarquía eran más eficientes para encontrar alimento en un laberinto radial respecto a los de menor jerarquía (Barnard & Luo, 2002), y que este efecto sólo se obtenía luego de establecido el estatus de dominancia y no previamente. En ratones de la pradera Microtus pennsylvanicus, se demostró que los animales dominantes tenían una mayor habilidad de aprendizaje espacial que los subordinados, pero que la capacidad de retención de la memoria no difería entre ambos (Spritzer et al., 2004). En monos Rhesus, sólo los dominantes fueron capaces de realizar una tarea de aprendizaje de discriminación (Drea, 1998), aunque posteriormente se sugirió que este resultado no tendría relación con una mayor capacidad cognitiva, sino con una presencia "intimidatoria" de los dominantes sobre los subordinados (Drea & Wallen, 1999). Finalmente, en un trabajo sobre grupos sociales de aves Poecile gambeli, se planteó la hipótesis de que los individuos subordinados deberían tener una mayor eficiencia en una tarea de memoria espacial, debido a que poseen un mayor riesgo de hambreado al ser excluidos por los dominantes de las mejoras zonas de forrajeo. Sin embargo, los resultados demostraron la tendencia opuesta, dado que los individuos dominantes fueron más eficientes en la recuperación del alimento previamente almacenado, i.e., en el food caching (Pravosudov et al., 2003).

El conjunto de estos resultados demuestra una capacidad mnésica diferencial de dominantes y subordinados, ante la cual surge la pregunta de cuál sería el mecanismo fisiológico capaz de mediar entre la dominancia y la memoria. En la mayor parte de los ejemplos mencionados se le atribuye un papel destacado a los glucocorticoides, los cuales

son liberados ante situaciones de estrés y pueden causar un efecto deletéreo sobre la memoria de los animales subordinados (Pravosudov *et al.*, 2003). En los invertebrados, las aminas biogénicas como OA y serotonina son posibles candidatas a mediar en estos procesos, debido a que pueden modificar la función neural a múltiples niveles y han sido repetidamente asociadas a la regulación de la agresión y la memoria (Bicker & Menzel, 1989; Huber, 2005; Libersat & Pflüger, 2004).

<u>Objetivo</u>: estudiar la relación entre la interacción agonística y la capacidad mnésica en el cangrejo *Chasmagnathus* en términos del desempeño de animales dominantes y subordinados ante el aprendizaje y la memoria contexto-EVP.

<u>Hipótesis</u>: la experiencia en un enfrentamiento agonístico podría afectar la capacidad de aprendizaje y memoria de los animales. En relación al mecanismo subyacente, planteamos que la OA podría constituir un vínculo fisiológico entre la agresión y la memoria.

7.2. Procedimiento experimental

Los experimentos tuvieron dos fases: una agonística donde se estableció la condición de dominante o subordinado de los animales, y una fase mnésica donde se evaluó su capacidad de memoria.

<u>Fase agonística</u>: El procedimiento general de los experimentos de peleas se detalla en el Capítulo 2 (Sección 2.7). Se realizaron dos enfrentamientos para cada par de animales, entre los mismos contrincantes, separados por un intervalo de 48 horas. Las observaciones del segundo encuentro se hicieron de modo "ciego" respecto al resultado del primero. Consideramos para los experimentos sólo a las díadas con un resultado persistente a lo largo de los dos encuentros (corresponden aproximadamente a un 80 % de las parejas) debido a que nos interesó restringir el análisis a los animales que demostraran ser consistentemente dominantes o subordinados.

<u>Fase de memoria</u>: La metodología usada en esta fase es la que se usa rutinariamente en los experimentos de memoria aversiva, y está explicada en el Capítulo 2 (Sección 2.3).

Realizamos los siguientes tres experimentos, cuyos diseños se esquematizan en la **Figura 7.1**.

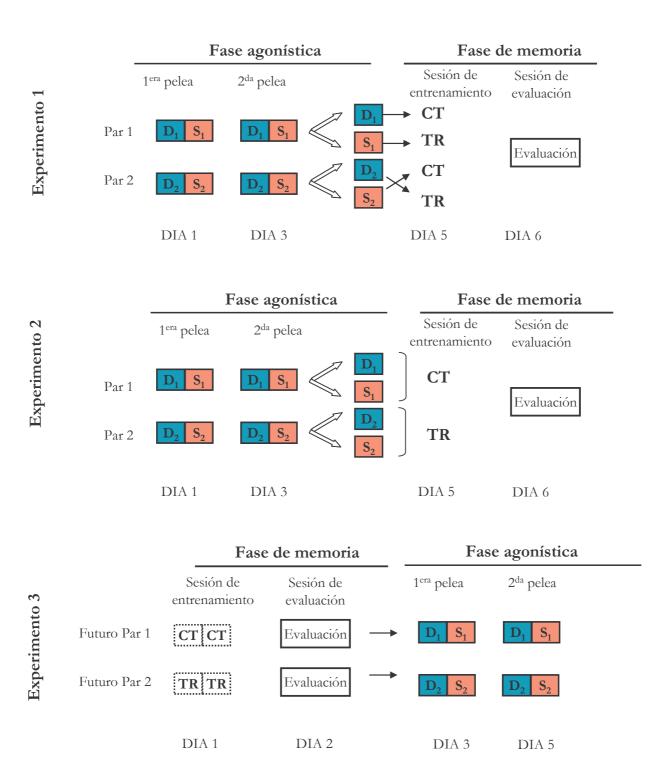


Figura 7.1. Protocolos experimentales. Diagrama esquemático de los protocolos usados en este capítulo. Los cuadrados representan los miembros de la díada, celeste para dominante y rosa para subordinado. Se muestran dos díadas en cada caso para esquematizar a los cuatro grupos experimentales. En el Exp.1 los miembros de cada pareja fueron asignados a diferentes tratamientos, mientras que en los Exp. 2 y 3 los dos animales de la díada recibieron el mismo tratamiento.

Experimento 1

<u>Fase agonística</u>: los animales fueron mantenidos aislados por 6 días y luego enfrentados en díadas en dos encuentros agonísticos, con un intervalo de 48 h entre ambos, durante el cual se mantuvieron aislados en sus respectivos recipientes. Analizamos todos los encuentros y caracterizamos a cada animal como dominante (D) o subordinado (S).

<u>Fase de memoria</u>: dos días después de que ocurriera el segundo enfrentamiento, el dominante y el subordinado de cada una de las díadas fueron asignados azarosamente a un grupo control (CT) o uno entrenado (TR). De este modo, se constituyeron los siguientes 4 grupos: D-CT, D-TR, S-CT, S-TR. Durante la sesión de entrenamiento los animales fueron colocados en los contenedores plásticos, los grupos TR recibieron 15 ensayos y los CT permanecieron en el contexto. Al día siguiente se realizó la sesión de evaluación, donde todos los animales recibieron un pasaje del EVP.

Experimento 2

Fase agonística: se realizó igual que el Experimento 1.

<u>Fase de memoria</u>: para poder realizar comparaciones pareadas entre los oponentes, en este experimento los dos animales de la díada fueron asignados a un mismo protocolo: o controles o entrenados. El experimento tuvo también 4 grupos: D-CT, D-TR, S-CT, S-TR.

Experimento 3

En este caso se invirtió el orden del experimento anterior: primero se realizó la fase de memoria y luego la agonística.

<u>Fase de memoria</u>: los animales se mantuvieron aislados por 10 días antes de la sesión de entrenamiento. Usamos este período para poder estandarizar el tiempo de aislamiento que transcurre hasta el comienzo de la fase aversiva en los tres experimentos. Luego fueron asignados al azar a un grupo CT o uno TR. Al día siguiente fueron evaluados.

<u>Fase agonística</u>: un día después de la sesión de evaluación, se formaron pares de animales de igual tamaño a partir de los grupos CT o TR, y se enfrentaron en dos encuentros sucesivos separados por un intervalo de 48h. Se usaron los mismos cuatro grupos que en Exp. 1 y 2: D-CT, D-TR, S-CT, S-TR, donde los miembros de cada par habían recibido igual tratamiento en la fase de memoria, o CT o TR.

7.3. Resultados

7.3.1. Los animales subordinados muestran mayor capacidad de memoria que los dominantes 48 h después del establecimiento de la condición de dominancia

En el Experimento 1, se realizó un protocolo de memoria contexto-EVP 48 horas después de la fase agonística (**Figura 7.1**, Exp 1). Un análisis de los resultados de la sesión de evaluación (**Figura 7.2 A**) reveló una diferencia significativa entre los grupos CT y TR subordinados (CT-S > TR-S). En cambio, no se encontraron diferencias significativas entre los CT y TR dominantes (CT-D ~ TR-D) [ANOVA: F_{3,124}=2.86, p<0.05; comparaciones planeadas: CT-S vs. TR-S: p<0.05; CT-D vs. TR-D: p=0.17]. Es decir, sólo los subordinados mostraron retención de la memoria, lo que sugiere que la condición de dominancia definida 48 h antes tuvo un efecto diferencial sobre la capacidad de memoria.

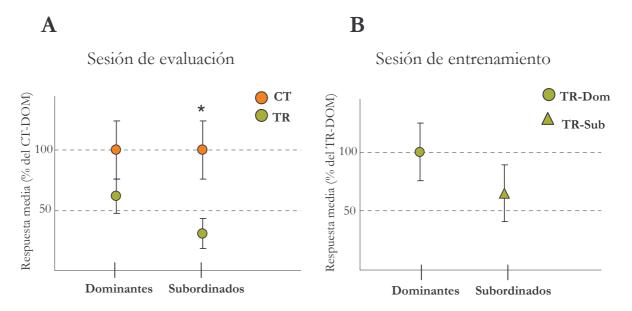


Figura 7.2. Sólo los subordinados muestran retención de la memoria al ser evaluados luego de las peleas. A) Respuesta media (+/- ES) correspondiente a la sesión de evaluación normalizada al valor del CT-dominante. El color naranja corresponde a los grupos CT y el verde a los TR. *: p<0.05 (comparaciones planeadas entre CT-TR). Los datos corresponden al Exp.1, N=125. B) Respuesta media (+/- ES) en el primer ensayo de la sesión de entrenamiento de los grupos TR-Dom y TR-Sub

Sin embargo, podría argumentarse que las diferencias entre el nivel de respuesta en la evaluación de dominantes y subordinados se deberían a una reactividad diferente frente al estímulo visual de peligro. Para explorar esta posibilidad analizamos las respuestas de los animales ante el primer pasaje de la figura. En la sesión de entrenamiento (**Figura 7.2 B**), comparamos el nivel de respuesta en el primer ensayo de los grupos entrenados dominantes y subordinados. El grupo de los subordinados tendió a ser menor que el de los dominantes, pero esta diferencia no alcanzó el nivel de significancia [test de *t*, t₆₂=1.19, p=0.27]. En la sesión de evaluación (**Figura 7.2 A**), comparamos la respuesta frente al EVP de de los grupos controles (que durante el entrenamiento no habían sido estimulados): los dominantes mostraron un nivel de respuesta similar al de los subordinados [p=0.99]. Por lo tanto, estos datos descartan una explicación de los resultados en términos de una diferencia en la reactividad de dominantes y subordinados.

El objetivo del siguiente experimento (**Figura 7.1**, Exp 2) fue comparar la capacidad mnésica de los cangrejos dominantes respecto a la de sus *respectivos* subordinados. A diferencia del anterior, se asignó el mismo protocolo de entrenamiento (CT ó TR) a los dos miembros de la díada, habilitando de este modo las comparaciones pareadas entre los oponentes. En consecuencia, el análisis de los datos de la evaluación incluyó en primer lugar un análisis como el anterior, con resultados similares a los obtenidos en el Exp.1 (**Figura 7.3 A**). Es decir, se observó una diferencia significativa entre los subordinados CT y TR, pero no entre los dominantes [ANOVA: F_{3,110}=5.79, p<0.01; comparaciones planeadas: CT-S vs. TR-S: p<0.01; CT-D vs. TR-D: p=0.109]. En segundo lugar, la comparación pareada reveló diferencias significativas entre los grupos entrenados dominantes y los entrenados subordinados [test de *t* pareado t₂₇=2.51, p<0.05]. Estos resultados nuevamente demostraron un impedimento en la memoria de los animales dominantes, confirmando los del Exp.1, y adicionalmente revelaron que el dominante de cada díada entrenada expresa una menor retención de la memoria que su respectivo subordinado.

A partir de los datos de los Exp.1 y 2 realizamos un análisis de correlación entre el nivel de dominancia individual y la respuesta en la sesión de evaluación para cada animal. Encontramos una correlación significativa en ambos experimentos [r=0.287, p<0.05, N=63, para el Exp. 1; r=0.29, p<0.05, N=57, para el Exp. 2], apoyando la idea de que a mayor nivel de dominancia se expresa una menor retención de la memoria.

7.3.2. Los futuros dominantes y subordinados no difieren en su capacidad de memoria

El objetivo del Exp. 3 (**Figura 7.1**, Exp. 3) fue evaluar si las diferencias halladas en la capacidad de memoria de dominantes y subordinados ya estaban presentes antes de las peleas. Podría ocurrir que los animales intrínsecamente más agresivos revelaran una menor capacidad de memoria, independiente de haber peleado. Por esta razón la memoria se evaluó antes de enfrentar a los animales.

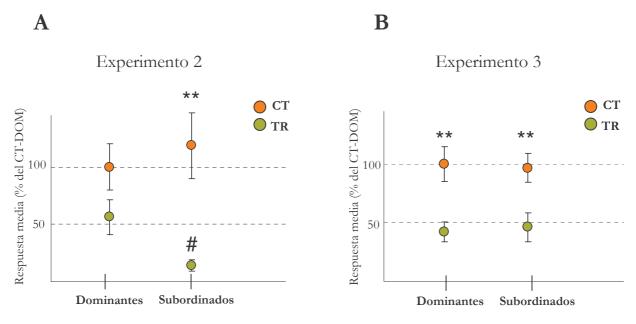


Figura 7.3 Dominantes y subordinados muestran diferente capacidad de memoria únicamente cuando se los evalúa después de las pelas. A) Experimento 2, N=111. B) Experimento 3, N=124. Respuesta media (+/- ES) en la sesión de evaluación.. **: p <0.005 (comparaciones planeadas entre grupos CT y TR); #: p<0.05, (comparaciones planeadas entre los grupos TR, *t*-test pareado de 2 colas)

Los resultados correspondientes a la sesión de evaluación (**Figura 7.3 B**) revelaron diferencias significativas entre los grupos CT y TR tanto para subordinados como para dominantes [ANOVA: $F_{3,123}$ =6.59, p<0.001; comparaciones planeadas: CT-S vs. TR-S: p<0.01; CT-D vs. TR-D: p<0.001]. El hecho de que ambos grupos entrenados mostraran retención indica que el período de aislamiento de 10 días no tuvo un efecto deletéreo sobre la memoria. Las comparaciones pareadas entre los animales entrenados subordinados con sus respectivos dominantes no mostraron diferencias significativas entre los oponentes durante la sesión de evaluación [TR-D vs. TR-D, test de t pareado t_{30} =-0.19, p=0.85]. Tampoco se encontraron diferencias entre los controles en la sesión de evaluación [test de t pareado, t_{31} =-0.16, p=0.87]. Asimismo, el análisis de la respuesta en la sesión de

entrenamiento tampoco reveló diferencias entre los grupos entrenados [test de t pareado: t_{30} =-0.66, p=0.51]. Por lo tanto, no habría un efecto de la condición de dominancia sobre la capacidad de memoria cuando es evaluada antes de los enfrentamientos.

7.4. Discusión

La principal conclusión de este capítulo es que la memoria contexto-EVP puede ser modificada por un encuentro agonístico ocurrido 48 h antes de que tenga lugar el aprendizaje, y que esta modulación varía de acuerdo al resultado obtenido en el enfrentamiento (Figuras 7.2A y 7.3.A). Se demostró que la retención de la memoria es significativamente mayor en los subordinados que en los respectivos dominantes, y que además existiría una relación inversa entre el nivel de dominancia y el nivel de retención de la memoria. Esta relación no se verifica en el caso de futuros dominantes y subordinados (Figura 7.3.B), donde los enfrentamientos se realizan posteriormente a la adquisición y evaluación de la memoria. Por otro lado, la habilidad de aprendizaje no resultó ser diferente entre dominantes y subordinados, como puede deducirse a partir de su desempeño similar en la sesión de entrenamiento (Figura 7.2.B).

A partir de los resultados recién comentados surge la pregunta de si las diferencias en la capacidad de memoria se originan en un déficit de los animales dominantes, o en una mejora en la capacidad de los subordinados. La respuesta a este interrogante está sesgada por el tipo de entrenamiento utilizado, que permite sólo evaluar un impedimento de la memoria cuando no se cumple la predicción de TR<CT. En consecuencia, en nuestro caso sólo podemos aseverar la falta de retención de la memoria en los dominantes, pero no sabemos si los subordinados poseen una capacidad mnésica incrementada. Sin embargo, los resultados de la correlación permiten suponer que no se trataría de un fenómeno dicotómico sino que posiblemente cuanto mayor sea la dominancia (o subordinación), más marcado será el efecto posterior sobre la memoria.

Nuestros resultados difieren de los obtenidos en estudios con roedores (Barnard & Luo, 2002; Fitchett et al., 2005; Francia et al., 2006; Spritzer et al., 2004) y aves (Pravosudov et al., 2003), donde se vio que los dominantes tenían un mejor desempeño en las tareas de aprendizaje y memoria que los subordinados. Esta discrepancia puede originarse por diversos motivos. En primer lugar, en todos los ejemplos nombrados se utilizaron tareas que implican memoria espacial, mientras que en nuestro caso usamos un protocolo de memoria aversiva, por lo que no es apropiado entablar un paralelismo dado que se trata de tareas muy diferentes, tanto en su significado biológico como en los requerimientos

específicos de la tarea. En segundo lugar, en la mayoría de los estudios realizados se considera a la condición de subordinado como una situación de estrés social, atribuyendo las deficiencias en su capacidad mnésica a un efecto deletéreo del estrés sobre la memoria (McEwen & Sapolski, 1995). En nuestro caso resulta un tanto forzado considerarlo de tal modo, pues la agresión no alcanza niveles muy altos y el encuentro agonístico tiene una duración acotada Sería conveniente analizar el desempeño de dominantes y subordinados en otro tipo de paradigma, como el apetitivo, para determinar si su diferente capacidad mnésica se extiende a otros tipos de protocolos o si es una característica sólo apreciable en la memoria aversiva.

Hipótesis sobre el papel de la OA como vínculo entre la agresión y la memoria

Al evaluar la memoria antes de las peleas no encontramos diferencias en la capacidad mnésica de los futuros dominantes y subordinados. Esto indica que la disparidad entre la memoria de dominantes y subordinados surgiría como consecuencia de la condición establecida a través de un enfrentamiento, y no de una capacidad intrínseca desigual. A partir de este resultado, podría pensarse que el mecanismo que subyace al establecimiento de la condición de dominancia estaría a su vez implicado en la modulación de la memoria, constituyendo un *link* fisiológico entre agresión y memoria. En base a los resultados obtenidos en capítulos previos, sabemos que la aplicación de OA provoca una disminución en los niveles de agresividad y, por otro lado, que afecta negativamente a la memoria contexto-EVP. Nuestra hipótesis es que la OA podría formar parte del mecanismo vinculante entre la pelea y la modulación diferencial de la memoria de dominantes y subordinados.

Para evaluar la hipótesis propuesta utilizamos dos abordajes experimentales:

- 1) Bioquímico: realizamos una serie de experimentos de cuantificación de los valores de OA en la hemolinfa y el cerebro (i.e., el ganglio supraesofágico) de los animales que tuvieron un enfrentamiento agonístico. El objetivo fue determinar si se producían variaciones en los niveles de OA como consecuencia de la pelea y detectar diferencias entre dominantes y subordinados.
- 2) Farmacológico: mediante este abordaje intentamos "reproducir" el efecto de un

enfrentamiento sobre la memoria contexto EVP mediante la aplicación de inyecciones de OA a tiempos similares a los que separan la pelea de la sesión de entrenamiento.

Abordaje bioquímico

Para cuantificar los valores de OA se utilizó el método de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), asociada a detección electroquímica. Para realizarla, establecimos inicialmente una colaboración con el Laboratorio de Farmacología de la Universidad de Córdoba, y luego con el Laboratorio de Neurofarmacología de los Procesos de Memoria de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. La preparación de las muestras se realizó en nuestro laboratorio y posteriormente fueron trasladadas para su cuantificación.

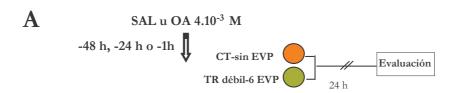
Si bien mediante esta metodología se pudieron detectar niveles apreciables de OA tanto en el cerebro como en la hemolinfa, no obtuvimos resultados consistentes ni repetibles, evidenciándose una gran variabilidad en los niveles detectados tanto dentro de un experimento como entre diferentes series experimentales. Una de las posibles explicaciones para este hecho es que para cuantificar la OA se debe utilizar un potencial de reducción muy alto, lo que genera una gran inestabilidad en el sistema de detección. Además, considerando la rápida degradación de las aminas, hubiese sido conveniente realizar las determinaciones inmediatamente después de la extracción de hemolinfa y la disección del cerebro.

Abordaje farmacológico

La serie experimental consistió en tres experimentos de memoria contexto-EVP, cada uno con dos pares de grupos CT-TR, donde se aplicó a uno de los pares una inyección de OA 4.10⁻³ M (par OA), y al otro una inyección de solución salina (par SAL). Lo que diferenció a cada experimento fue el momento en el cual se aplicó la inyección: 48, 24, o 1 h antes de la sesión entrenamiento. Elegimos estos tiempos de acuerdo a los intervalos que separaron a los enfrentamientos agonísticos de la sesión de entrenamiento. En el intervalo entre la inyección y el comienzo de la sesión de entrenamiento los animales permanecieron alojados en recipientes individuales dentro de cajoneras. La sesión de entrenamiento consistió en un protocolo débil de 6 ensayos, el cual resulta insuficiente para

generar retención de la memoria y que se usa para evaluar efectos facilitadores de un determinado tratamiento. Finalmente, en la sesión de evaluación todos los animales recibieron un pasaje del EVP. Como es habitual, se compara la respuesta entre los grupos CT y TR ante el pasaje de la figura.

Los resultados (**Figura 7.4**) indican que en los casos donde la inyección se aplicó mucho tiempo antes de que tuviera lugar la sesión de entrenamiento, a 48 h o 24 h, se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos CT y TR inyectados con OA [comparaciones planeadas en par OA, 48 h: p<0.01; 24 h: p<0.01, luego de un ANOVA general F_{3,138}=2.81, p<0.05 y F_{3,141}=3.12, p<0.05 respectivamente], es decir que la OA tuvo un efecto facilitador sobre la memoria. En cambio, cuando se la aplicó 1 hora antes, no se observaron diferencias significativas entre los grupos CT-TR del par OA [comparaciones par OA: p=0.44]. En ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas entre los grupos CT-TR del par SAL: p=0.7, p=0.35 y p=0.44 para 48 h, 24 h y 1 h respectivamente], lo cual resulta acorde con la predicción, dado que recibieron un protocolo de entrenamiento débil.



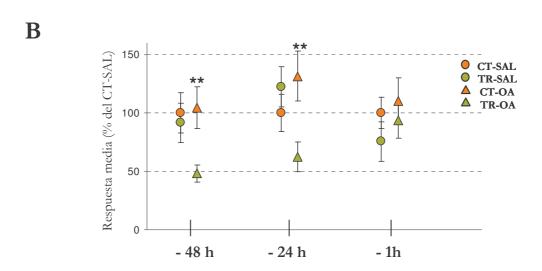


Figura 7.4: La aplicación de OA 48 o 24 h antes del entrenamiento facilita la memoria. A) Esquema del diseño experimental utilizado en los tres experimentos, donde se aplicó SAL u OA 4.10⁻³ M a 48, 24 o 1 h antes del entrenamiento aversivo débil (flecha). El círculo naranja representa al grupo CT y el verde al TR. -48h: N= 142; -24h: N=145; -1h: N=140. B) Respuesta en la sesión de evaluación, normalizada al grupo CT-SAL. Los círculos corresponden al par SAL y los triángulos al par OA.**:p<0.01

Los resultados obtenidos constituyen un sustento indirecto de la hipótesis formulada sobre el papel de la OA como vínculo entre dominancia y memoria. En primer lugar, la inyección de OA intenta remedar el estado hormonal de los animales subordinados luego de la pelea, de acuerdo a los resultados que muestran que esta amina está asociada con una disminución de la agresividad (capítulo 6). Es decir que la facilitación de la memoria observada ante la inyección de OA podría suponerse análoga a la mayor capacidad mnésica de los animales subordinados. En segundo lugar, nos resulta muy llamativo haber obtenido un efecto de la OA aplicándola hasta dos días antes del entrenamiento. Es evidente que la amina no estaría afectando de modo directo el proceso de consolidación, sino que posiblemente se esté modificando algún área o circuito que posteriormente se vea implicado en la formación de la memoria y genere una facilitación del proceso. En la discusión general analizaremos con mayor profundidad las implicancias de la hipótesis formulada.

Capítulo 8

Discusión general

A lo largo de esta Tesis analizamos la participación de la octopamina en dos procesos disímiles de importancia vital en el comportamiento del cangrejo *Chasmagnathus granulatus*: los fenómenos de memoria y de agresión, mediante una aproximación de tipo farmacológico-comportamental. Realizaremos inicialmente una síntesis de los principales resultados obtenidos en nuestro trabajo.

En relación al papel de la OA en procesos mnésicos, inicialmente hemos estudiado su acción sobre un modelo de memoria de tipo aversivo ampliamente caracterizado, el cual involucra una asociación entre un estímulo potencialmente peligroso y el contexto donde fue presentado. Los resultados obtenidos (Capítulo 3) demostraron consistentemente que la OA posee un efecto deletéreo sobre esta memoria. En particular, su acción afecta tanto la fase de consolidación como la de reconsolidación, mientras que no se ven alteradas la fase de adquisición ni la de evocación. El efecto amnésico de la OA se obtiene únicamente al aplicar la droga en un período acotado, cercano al fin del entrenamiento o la reexposición.

Por otro lado, hemos estudiado el rol de la OA en un modelo de memoria apetitiva novedoso que hemos desarrollado durante esta tesis (Capítulo 4). Este paradigma incluye al mismo contexto de entrenamiento que se utiliza en la memoria aversiva y al alimento como refuerzo positivo, y ha demostrado ser un proceso de memoria asociativa dependiente de la síntesis proteica. Los resultados demostraron que la señal de la OA sería un requisito necesario para establecer la memoria apetitiva, dado que al bloquearla con antagonistas se obtiene un efecto inhibitorio y por otro lado la aplicación de OA exógena puede facilitar un entrenamiento débil que incluye una cantidad mínima de alimento.

Analizamos la relación establecida entre los dos tipos de memoria mediante la realización de experimentos de "doble-aprendizaje", donde los animales reciben consecutiva o simultáneamente ambos entrenamientos (Capítulo 5). Vimos que la inclusión de un aprendizaje apetitivo inmediatamente después de uno aversivo, ambos en el mismo contexto, tiene un efecto inhibitorio sobre la memoria aversiva. En cambio, al dejar transcurrir una hora de intervalo entre ambos, los animales pueden adquirir ambas memorias. Este patrón de resultados se asemeja al obtenido con las inyecciones de OA exógena, es decir, sugieren que el refuerzo positivo tendría el mismo efecto que la aplicación de OA al presentarlo aproximadamente en los mismos puntos temporales del proceso de memoria aversiva.

A partir de este conjunto de resultados proponemos que la OA tendría un doble papel en los procesos de memoria asociativa: por un lado estaría involucrada en la

codificación del estímulo apetitivo y por el otro sería capaz de interferir con la consolidación de una memoria aversiva.

Paralelamente, realizamos una caracterización del comportamiento agonístico de Chasmagnathus en condiciones de laboratorio y analizamos su modulación por parte de la OA (Capítulo 6). Mediante enfrentamientos entre animales de igual tamaño, demostramos que la OA tiende a reducir los actos agresivos de los animales tratados.

Por último, se analizó la influencia de un enfrentamiento agonístico sobre el posterior desempeño de los animales en el paradigma de memoria aversiva (Capítulo 7). Se demostró que los animales subordinados tienen una mayor capacidad mnésica que los dominantes, lo cual sería una consecuencia de la experiencia del enfrentamiento y no de una diferencia intrínseca en la capacidad de memoria de ganadores y perdedores. Se propuso la hipótesis de que la OA podría ser parte del vínculo establecido entre la pelea y la modulación diferencial de la memoria de dominantes y subordinados.

Si bien el estudio del papel de la OA constituyó una de las motivaciones principales de este trabajo, creemos importante destacar que en cierta medida su empleo ha sido una herramienta para profundizar nuestros conocimientos sobre la regulación fisiológica del comportamiento animal, centrándonos en los procesos de memoria y de agresión. Como suele ocurrir en la investigación científica, no desarrollamos un recorrido lineal, sino que de acuerdo a los resultados obtenidos fuimos considerando diferentes hipótesis que guiaron el abordaje experimental utilizado.

Complejidad, Fragmentación y Octopamina

Considerando la diversidad de procesos regulados por la OA, y la complejidad de analizarlos de un modo integrado, nos parece relevante discutir el tipo de enfoque que suele adoptarse en la investigación científica en cuanto a la fragmentación epistemológica de una sustancia de interés. En la literatura científica suelen encontrarse frases sobre la funcionalidad de un compuesto, generalmente en las primeras líneas de un paper, que son heredadas de trabajo en trabajo y que terminan adquiriendo cierto carácter dogmático. En ocasiones se dificulta rastrear el trabajo que dio origen a la frase inicial, ya sea porque proviene de larga data y no se puede acceder a la fuente, o porque se desconoce certeramente cuál fue el primer trabajo. Lo cierto es que solemos leer "El compuesto X

tiene esta función", seguido por unas cuantas citas. Este tipo de enunciación constituye de algún modo un artificio, porque si bien es cierto que una sustancia puede cumplir principalmente esa función, también es cierto que cumplirá muchas otras. La hemoglobina es un ejemplo claro. Al indagar sobre las funciones de esta proteína, siempre encontraremos que es la encargada de realizar el transporte de oxígeno necesario para el metabolismo celular. Con menos probabilidad, podremos leer que cumple muchas otras funciones, como la regulación del pH sanguíneo, el transporte de dióxido de carbono, entre otras.

En nuestro trabajo nos centramos en el estudio de las funciones de la OA. La bibliografía al respecto refleja una clara divergencia de acuerdo al área de la cual provenga el trabajo. En ciertos casos, es "la hormona del estrés", en otros "la moduladora general de la fisiología de invertebrados" o "la mediadora del refuerzo apetitivo", "la molécula que actúa como neurotransmisora, neuromoduladora y neurohormona". Es posible que la OA sea todas esas cosas. Pero también es imposible considerarlas todas a la vez. De allí que la fragmentación experimental sea necesaria ante las múltiples acciones de una sustancia. En genética se utiliza comúnmente el concepto de pleiotropía para referirse, por ejemplo, a un gen con efectos biológicos sobre múltiples caracteres. Consideramos que es importante incorporar esta visión al campo de la fisiología, aún reconociendo la dificultad de tenerlo en cuenta en cada uno de los estudios realizados. Una frase del destacado biólogo evolutivo Richard Lewontin (Lewontin, 2000) resume el planteo recién esbozado: "El hecho de que la biología experimental deba limitarse a manipular una sola causa o un pequeño numero de causas influye mucho en el tipo de explicación que nos ofrecen los biólogos. Los límites metodológicos de los experimentos se confunden con las explicaciones correctas de los fenómenos".

OA en procesos de memoria apetitiva y aversiva

Los resultados obtenidos sobre el papel de la OA en los paradigmas aversivo y apetitivo permitieron la formulación de un modelo de acción de la OA sobre dos procesos de aprendizaje de significado opuesto para el animal: por un lado, la OA estaría involucrada en la codificación de refuerzos apetitivos, y por el otro sería capaz de interferir sobre una memoria aversiva. Hasta el momento, los estudios sobre la función de la OA en el aprendizaje se centraron en los paradigmas de tipo apetitivo, bajo la concepción de que la OA sería la señal mediadora de la recompensa en el sistema nervioso (Hammer, 1993;

Sandoz et al., 2002; Schwaerzel et al., 2003; Unoki et al., 2005; Vergoz et al., 2007). En algunos de estos trabajos se analizó paralelamente la acción de otra amina, la dopamina (DA) sobre paradigmas de tipo aversivo, llegando a la conclusión de que la misma señalaría el refuerzo aversivo. Es decir, la idea vigente es la de "una amina, un aprendizaje", OA en el apetitivo, DA en aversivo (Giurfa, 2006). Asimismo, esta visión se vio reforzada por resultados que demostraron que los antagonistas de la OA no tienen ningún efecto sobre memorias aversivas, así como los de DA tampoco afectan las memorias apetitivas. Al no encontrar un efecto amnésico se concluía entonces que la OA no desempeñaba ninguna función sobre las memorias aversivas, ni la DA sobre las apetitivas. Pero en ningún trabajo hasta el momento se analizó la influencia de la supuesta señal apetitiva sobre una memoria aversiva. A partir de nuestra propuesta de la doble función de la OA se desprende una visión más compleja sobre los mecanismos de señalización implicados en el aprendizaje respecto a la de una sustancia, un aprendizaje.

Ahora bien, cabe preguntarse en qué situaciones naturales podría ocurrir que la OA interfiriera con una memoria aversiva. Abordamos esta pregunta mediante la realización de experimentos que involucran la interacción de los dos tipos de aprendizaje: los resultados muestran que un aprendizaje apetitivo interfiere sobre uno aversivo cuando ocurren temporalmente próximos. La hipótesis formulada a partir de este resultado y de los farmacológicos es que esta interferencia estaría causada por la acción de la OA, liberada como consecuencia de la señalización del refuerzo apetitivo, que afectaría la consolidación de una memoria de significado opuesto. Sin embargo, este planteo no ha sido demostrado fehacientemente en nuestros experimentos, sino que surge a partir de un paralelismo entre los datos obtenidos con la aplicación de OA y la influencia de un aprendizaje sobre el otro. Una demostración más directa de la hipótesis se lograría aplicando un antagonista de OA inmediatamente después del entrenamiento aversivo, justo antes del apetitivo, experimento que planeamos realizar a futuro. De este modo, si la OA fuera la causante de la interferencia con la consolidación aversiva, el antagonista bloquearía este efecto y se debería obtener una retención normal de la memoria aversiva y un efecto amnésico de la memoria apetitiva.

Un aspecto relevante a discutir es el de las bases neuronales subyacentes a los procesos comportamentales analizados. A lo largo de nuestros experimentos, hemos considerado al sistema nervioso del animal como una "caja negra" sobre la cual actuaría la droga inyectada, causando un efecto determinado que luego podemos inducir a partir de los

cambios en el comportamiento. Además, la utilización de inyecciones sistémicas impide saber qué zonas específicas están siendo afectadas, debido a que la droga se distribuye por todas las áreas del sistema nervioso. Nuestra propuesta sobre la participación de la OA en la señalización del refuerzo alimenticio está fundada en resultados de experimentos farmacológicos. Sin embargo, una demostración contundente de la hipótesis requeriría analizar el proceso a nivel de los circuitos neuronales y las vías involucrada. Esto ha sido posible en dos especies de insectos intensamente estudiadas: la abeja Apis mellifera y la mosca Drosophila melanogaster. Las abejas aprenden a asociar un olor con una recompensa azucarada, lo cual resulta en un incremento duradero en la probabilidad de que ese olor evoque un reflejo de extensión de la probóscide (PER). Se demostró que la presentación de un olor conjuntamente con la aplicación localizada de OA en un área específica del sistema nervioso lograba el mismo aumento del el PER que el refuerzo azucarado (Hammer & Menzel, 1998). Es decir, el animal responde a la señal de la OA de igual modo que a la recompensa gustativa natural. Este experimento constituye uno de los más claros ejemplos sobre cómo el sistema nervioso codifica el valor positivo de un determinado estímulo de importancia biológica. En el caso de las moscas, las demostraciones sobre el papel de la OA incluyeron el uso de sofisticadas herramientas de tipo genético y molecular. Un trabajo reciente realizado en larvas (Schroll et al., 2006) demostró que la estimulación de una población de neuronas octopaminérgicas, en conjunto con la presentación de un estímulo olfativo, permite inducir la formación de una memoria apetitiva. En cambio, la activación de un área dopaminérgica induce una memoria de tipo aversiva, lo cual constituye una evidencia directa de la existencia de dos sistemas neuronales diferentes implicados en el procesamiento de refuerzos de significado opuesto. En el caso de Chasmagnathus no es posible realizar el tipo de experimentos comentados para la mosca y la abeja, pero creemos que una posibilidad para estudiar de modo más directo la acción de la OA es mediante el uso de la técnica de inmunohistoquímica. A través de la misma, se podría analizar la distribución y la intensidad de la marca de OA en el sistema nervioso, así como la de sus receptores (usando anticuerpos específicos contra OA y para algún subtipo de receptor) y comparar individuos que fueron entrenados con el paradigma apetitivo respecto a los controles, de modo detectar diferencias producto del aprendizaje. Asimismo, esta técnica permitiría caracterizar al sistema octopaminérgico del cangrejo y compararlo con el de otras especies relacionadas.

Uno de los interrogantes fundamentales al analizar el efecto de la OA en el comportamiento es el de los mecanismos de señalización moleculares involucrados. A

partir de estudios realizados en insectos sabemos que la OA actúa a través de receptores de tipo metabotrópico asociados a proteína G, y que los diferentes subtipos implican la activación de diversas vías de transducción (Evans & Maqueira, 2005). En nuestro caso, nos interesan particularmente los receptores de OA expresados en áreas del cerebro relacionadas con la integración mnésica. En la mosca se describió la presencia de un receptor con una expresión preferencial en los cuerpos pedunculados que produce un aumento en los niveles de AMP cíclico y de calcio (Han et al., 1998). Por otro lado, en la abeja se demostró que la inyección de OA en los lóbulos antenales produce una estimulación rápida y transitoria de la actividad de la quinasa dependiente de AMPc, PKA (Hildebrandt & Muller, 1995). En el modelo de memoria aversiva de Chasmagnathus están caracterizadas diversas vías de señalización moleculares que participan en la consolidación de la memoria, como la de PKA, la de la quinasa regulada por señales extracelulares y la del factor de transcripción nuclear Kappa-B (NF-KB). La activación de estas vías lleva a modificaciones post-traduccional de proteínas sinápticas así como a la regulación de la expresión génica, promoviendo la estabilización de cambios específicos en los circuitos activados por el aprendizaje (Romano et al., 2006). Un posible modo de indagar sobre los mecanismos de transducción activados por la OA en nuestros experimentos es comparar las ventanas temporales de efecto de la OA con la de activadores o inhibidores de las diferentes vías de señalización. Un inhibidor de la PKA, el Rp-8-Cl-cAMPS AMPc, posee un efecto amnésico al ser inyectado inmediatamente después del entrenamiento (Romano et al., 1996). Este efecto es comparable al obtenido con una inyección de OA luego del entrenamiento aversivo, por lo que podría entonces especularse que la OA activaría un subtipo de receptor inhibitorio que genera una disminución en los niveles de AMPc. En cambio, en el paradigma apetitivo podrían estar involucrados subtipos de receptores activadores de la PKA, mediante el aumento de los niveles de AMPc. Esta propuesta se puede evaluar mediante una inyección conjunta de OA con un inhibidor de la PKA, analizando si se revierte el efecto facilitatorio sobre la memoria apetitiva.

Comportamiento agonístico, OA y memoria

En nuestro trabajo hemos iniciado una línea de investigación sobre la agresión del cangrejo *Chasmagnathus* y el estudio de sus bases fisiológicas, proyecto realizado conjuntamente con la licenciada Silvia Pedetta. En congruencia con otros estudios realizados en crustáceos decápodos, la OA demostró un papel regulador del

comportamiento agonístico: su aplicación provocó una disminución de las interacciones agonísticas realizadas durante el enfrentamiento, aunque no hizo a los animales más proclives a resultar subordinados. Se considera que las aminas biogénicas como la OA pueden modificar la función neuronal a diferentes niveles, sensibilizando o bien inhibiendo elementos sensoriales, centrales o motores, promoviendo de este modo la ocurrencia de determinados comportamientos por sobre otros (Bicker & Menzel, 1989). En base a estas características, nuestra interpretación es que la OA modularía –sutilmente- los circuitos neuronales implicados en el control del comportamiento agonístico y de la toma de decisiones, aportando al sistema una mayor plasticidad. Un animal puede variar su estrategia agonística dependiendo del oponente, del recurso en juego o de las condiciones del entorno, por lo que es posible que través de la acción de la OA se regule el comportamiento adoptado por el individuo ante las diferentes circunstancias.

Hasta el momento venimos refiriéndonos a la OA como si fuera la única molécula implicada en la modulación del comportamiento agonístico. Evidentemente esto fue sólo por motivos expositivos, dado que consideramos que la OA actúa en conjunción con otras sustancias que poseen igual o mayor importancia fisiológica en el control de la agresividad. En particular, la serotonina ha demostrado poseer un rol crucial en la regulación de la agresión en diversos grupos animales, particularmente en crustáceos (Edwards & Kravitz, 1997). Por esta razón, paralelamente a los experimentos sobre OA se analizó también el papel de la serotonina en la modulación del comportamiento agresivo de *Chasmagnathus*. Los resultados preliminares indican que esta sustancia tendría un efecto opuesto al de la OA, incrementando la interacción agresiva entre los oponentes, de modo análogo a lo observado en especies relacionadas.

Por otro lado, hemos analizado la influencia de un enfrentamiento agonístico sobre un proceso comportamental aparentemente no relacionado: el desempeño en un paradigma de memoria aversiva. Nuestros resultados revelan que la experiencia de un encuentro agresivo modula diferencialmente la memoria de los contrincantes, evidenciándose una mayor capacidad mnésica en los subordinados que en los dominantes. Uno de los aspectos que consideramos interesante es la marcada influencia que puede tener el resultado de un enfrentamiento en el posterior comportamiento del individuo. Existen otros ejemplos en la bibliografía que apoyan esta visión. Un trabajo realizado en langostas de río (Herberholz *et al.*, 2003) demostró que el comportamiento de cavado, el cual no forma parte del repertorio conductual agonístico, se ve fuertemente afectado por el estatus obtenido luego de una

lucha: los animales que resultaron dominantes incrementan la frecuencia de cavado, mientras que los subordinados la inhiben por completo. El autor propone que estos cambios podrían ser producto de que ambos comportamientos poseen bases neuronales compartidas. Otro estudio realizado en cangrejos costeros (Fletcher & Hardege, 2009) reveló que el comportamiento agresivo afecta la respuesta posterior de los animales frente a sustancias químicas indicativas de la presencia de alimento o de una potencial pareja. En particular, los subordinados aumentan su tiempo de respuesta respecto a los dominantes, lo cual indicaría una menor eficiencia en el comportamiento alimentario y reproductivo. Asimismo, diversos trabajos en roedores establecen una relación entre el estatus de dominancia y la capacidad mnésica de los animales, como comentamos en Capítulo 7. Sin embargo, en ninguno de estos casos se ha determinado el mecanismo por el cual la agresión modifica otros procesos comportamentales. Posiblemente, la misma complejidad que hace a este tema atractivo para su estudio, dificulta la realización de experimentos para desentrañar su base fisiológica.

Nuestra propuesta es que los mecanismos involucrados en al establecimiento de la condición de dominancia, que llevan a un animal a resultar dominante o subordinado, podrían causar una modificación en los circuitos reclutados durante la consolidación de la memoria. Específicamente planteamos que la OA podría constituir un vínculo entre el comportamiento agonístico y la modulación diferencial de la memoria de los ganadores y perdedores. Este planteo implica a su vez el cumplimiento de ciertos requisitos. En primer lugar, el enfrentamiento agonístico debería provocar una variación en los niveles de OA de los animales o un cambio en su sistema octopaminérgico. En segundo lugar, estos cambios deberían ser diferentes en los animales subordinados y dominantes. Finalmente, habría que comprobar una relación causal entre estas variaciones en la acción de la OA y la modulación de la memoria. Este último punto ha sido estudiado mediante la aplicación de inyecciones de OA a 48 o 24 h antes de que tuviera lugar la sesión de entrenamiento aversivo, un período comparable al que separa a las peleas del aprendizaje, obteniéndose un efecto potenciador de la memoria. En este caso la OA actuaría posiblemente a otro nivel que en los experimentos donde se la aplica inmediatamente después del entrenamiento, donde presenta un efecto amnésico. Se desprende entonces que la OA podría afectar tanto directa como indirectamente el proceso de consolidación de la memoria. A pesar del amplio margen de especulación de la hipótesis, nos brinda un enfoque integrador sobre dos procesos comportamentales diferentes regulados por la OA y su interacción.



- **Abbott, J.** (1970) Absence of blood-brain barrier in a crustacean, Carcinus maenas L. *Nature* **225**, 291-3.
- **Abel, T. & Kandel, E.** (1998) Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res Brain Res Rev* **26**, 360-78.
- Adamo, S., Linn, C. & Beckage, N. (1997) Correlation between changes in host behaviour and octopamine levels in the tobacco hornworm Manduca sexta parasitized by the gregarious braconid parasitoid wasp Cotesia congregata. *J Exp Biol* 200, 117-27.
- Adamo, S.A. (2008) Norepinephrine and octopamine: linking stress and immune function across phyla. *Invert Surv J* 5, 12-19.
- Adamo, S.A., Linn, C.E. & Hoy, R.R. (1995) The role of neurohormonal octopamine during 'fight or flight' behaviour in the field cricket Gryllus bimaculatus. J Exp Biol 198, 1691-700.
- Alberini, C.M. (2005) Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28, 51-6.
- Alberti, J., Escapa, M., Iribarne, O., Silliman, B. & Bertness, M. (2008) Crab herbivory regulates plant facilitative and competitive processes in Argentinean marshes. *Ecology* **89**, 155-64.
- Antonsen, B.L. & Paul, D.H. (1997) Serotonin and octopamine elicit stereotypical agonistic behaviors in the squat lobster Munida quadrispina (Anomura, Galatheidae) *Journal* of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology 181, 501-510.
- Antonsen, B.L. & Paul, D.H. (2001) Serotonergic and octopaminergic systems in the squat lobster Munida quadrispina (Anomura, Galatheidae). *J Comp Neurol* **439**, 450-68.
- Arakawa, S., Gocayne, J.D., McCombie, W.R., Urquhart, D.A., Hall, L.M., Fraser, C.M. & Venter, J.C. (1990) Cloning, localization, and permanent expression of a Drosophila octopamine receptor. *Neuron* 4, 343-54.
- Arnott, G. & Elwood, R.W. (2009) Assessement of fighting ability in animal contests. *Animal Behaviour* 77, 991-1004.
- Aston-Jones, G., Rajkowski, J., Kubiak, P. & Alexinsky, T. (1994) Locus coeruleus neurons in monkey are selectively activated by attended cues in a vigilance task. *J Neurosci* 14, 4467-80.
- Atema, J. & Voigt, T. (1995) Behaviour and Sensory Biology. In Biology of the lobster Homarus americanus
- Edited by J. Factor. San Diego: Academic Press.
- Bacon, J.P., Thompson, K.S. & Stern, M. (1995) Identified octopaminergic neurons provide an arousal mechanism in the locust brain. *J Neurophysiol* 74, 2739-43.
- Baier, A., Wittek, B. & Brembs, B. (2002) Drosophila as a new model organism for the neurobiology of aggression? *J Exp Biol* **205**, 1233-40.
- Bailey, C.H., Bartsch, D. & Kandel, E.R. (1996) Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13445-52.
- Bailey, C.H., Kandel, E.R. & Si, K. (2004) The persistence of long-term memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth. *Neuron* 44, 49-57.
- Balfanz, S., Strunker, T., Frings, S. & Baumann, A. (2005) A family of octopamine [corrected] receptors that specifically induce cyclic AMP production or Ca2+ release in Drosophila melanogaster. *J Neurochem* 93, 440-51.
- Bank, B., Nelson, T. & Alkon, D.L. (1988) Molecular mechanisms of associative learning in mammal and mollusc. *J Physiol (Paris)* 83, 119-25.
- Barnard, C.J. & Luo, N. (2002) Acquisition of dominance status affects maze learning in mice. *Behav Processes* **60**, 53-59.
- Battelle, B. & Kravitz, E.A. (1978) Targets of octopamine action in the lobster: cyclic nucleotide changes and physiological effects in hemolymph, heart, and exoeskeletal muscle. *J. Pharmac. Exp. Ther* **205**, 438-448.

- Bellah, K., Fitch, G. & Kammer, A. (1984) A central action of octopamine on ventilation frequency in Corydalus cornatus. *J. Exp. Zool* 231, 289-292.
- **Bergman, D.A. & Moore, P.A.** (2005) The role of chemical signals in the social behavior of crayfish. *Chem Senses* **30 Suppl 1**, i305-6.
- Beron de Astrada, M. & Maldonado, H. (1999) Two related forms of long-term habituation in the crab Chasmagnathus are differentially affected by scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav* **63**, 109-18.
- **Berón, M.P.** (2003) Dieta de juveniles de Gaviota Cangrejera (Larus atlanticus) en estuarios de la provincia de Buenos Aires. *Hornero (B. Aires)* **18**, 113-117.
- Bevengut, M. & Clarac, F. (1982) Controle de la posture du crabe Carcinus maenas par des amines biogenes. C. R. Acad. Sci. Paris 295, 23-28.
- Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Schroder, N., Bromberg, E., Schmitz, P.K., Schaeffer, E., Quevedo, J., Bianchin, M., Walz, R., Medina, J.H. & Izquierdo, I. (1997) Drugs acting upon the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A signalling pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdala. *Behav Pharmacol* 8, 331-8.
- Bicker, G. & Menzel, R. (1989) Chemical codes for the control of behaviour in arthropods. *Nature* 337, 33-9.
- **Bischof, L.J. & Enan, E.E.** (2004) Cloning, expression and functional analysis of an octopamine receptor from Periplaneta americana. *Insect Biochem Mol Biol* **34**, 511-21.
- Boccia, M.M., Blake, M.G., Acosta, G.B. & Baratti, C.M. (2006) Post-retrieval effects of icv infusions of hemicholinium in mice are dependent on the age of the original memory. *Learn Mem* 13, 376-81.
- Bolingbroke, M. & Kass-Simon, G. (2001) 20-hydroxyecdysone causes increased aggressiveness in female American lobsters, Homarus americanus. *Horm Behav* **39**, 144-56.
- Botto, F. & Iribarne, O. (2000) Contrasting Effects of Two Burrowing Crabs (Chasmagnathus granulata and Uca uruguayensis) on Sediment Composition and Transport in Estuarine Environments
- Estuarine, Coastal and Shelf Science **51**, 141-151
- **Bouton, M.E.** (1993) Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull* **114**, 80-99.
- **Braunig, P.** (1995) Dorsal unpaired median (DUM) neurones with neurohaemal functions in the locust, Locusta migratoria. *Acta Biol Hung* **46**, 471-9.
- **Brunner, D. & Maldonado, H.** (1988) Habituation in the crab Chasmagnathus granulatus: effect of morphine and naloxone. *J Comp Physiol [A]* **162**, 687-94.
- Cahill, L. & McGaugh, J.L. (1998) Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci* 21, 294-9.
- Cahill, L., McGaugh, J.L. & Weinberger, N.M. (2001) The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends Neurosci* **24**, 578-81.
- Caldwell, R.L. & Dingle, J. (1979) The influence of size differential on agonistic encounters in the mantis shrimp, Gonodactylus viridis. *Behaviour* **69**, 255-264.
- Candy, D. (1978) The regulation of locust flight muscle metabolism by octopamine and other compounds. *Insect Biochem Mol Biol* 8, 177-181.
- Candy, D., Becker, A. & Wegener, G. (1997) Coordination and integration of metabolism in insect flight. *Comp. Biochem. Physiol* 117B, 497-512.
- Carbo-Tano, M., Molina, V.A., Maldonado, H. & Pedreira, M.E. (2008) Memory
 consolidation and reconsolidation in an invertebrate model: The role of the GABAergic
 system. Neuroscience.
- Carew, T. (2000) Behavioral Neurobiology: The Cellular Organization of Natural Behavior. . Sinauer.
- Carr, W.E., Ache, B.W. & Gleeson, R.A. (1987) Chemoreceptors of crustaceans: similarities to receptors for neuroactive substances in internal tissues. *Environ Health Perspect* 71, 31-46.

- Caveney, S., Cladman, W., Verellen, L. & Donly, C. (2006) Ancestry of neuronal monoamine transporters in the Metazoa. *J Exp Biol* 209, 4858-68.
- Clark, R. (2004) The classical origins of Pavlov's conditioning Integrative Psychological and Behavioral Science 39, 279-294
- Copp, N.H. (1986) Dominance hierarchies in the crayfish Procambarus clarkii (Girard, 1852) and the question of learned individual recognition (Decapoda, Astacidea). *Crustaceana* 51, 9-24.
- Cromarty, S.I., Mello, J. & Kass-Simon, G. (1999) Time in residence affects escape and agonistic behavior in adult male American lobsters *Biol Bull* 196, 105-112.
- Crow, T. (1988) Cellular and molecular analysis of associative learning and memory in Hermissenda. *Trends Neurosci* 11, 136-47.
- Chase, I.D., Tovey, C., Spangler-Martin, D. & Manfredonia, M. (2002) Individual differences versus social dynamics in the formation of animal dominance hierarchies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5744-9.
- Chentsova, N.A., Gruntenko, N.E., Bogomolova, E.V., Adonyeva, N.V., Karpova, E.K. & Rauschenbach, I.Y. (2002) Stress response in Drosophila melanogaster strain inactive with decreased tyramine and octopamine contents. J Comp Physiol /B/172, 643-50.
- Dacks, A.M., Christensen, T.A., Agricola, H.J., Wollweber, L. & Hildebrand, J.G. (2005) Octopamine-immunoreactive neurons in the brain and subesophageal ganglion of the hawkmoth Manduca sexta. *J Comp Neurol* 488, 255-68.
- Dacks, A.M., Dacks, J.B., Christensen, T.A. & Nighorn, A.J. (2006) The cloning of one putative octopamine receptor and two putative serotonin receptors from the tobacco hawkmoth, Manduca sexta. *Insect Biochem Mol Biol* 36, 741-7.
- **Davenport, A.P. & Evans, P.D.** (1984) Stress-induced changes in the octopamine levels of insect haemolymph. *Insect Biochem Mol Biol* **14**, 135-143.
- David, J. & Lafon-Cazal, M. (1979) Octopamine distribution in the locust nervous and non-nervous systems. *Comp. Biochem. Physiol* **64C**, 161-164.
- Davis, H. & Squire, L. (1984) Protein synthesis and memory: a review. Psychol. Bull 96, 518-559.
- Debiec, J. & Ledoux, J.E. (2004) Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. Neuroscience 129, 267-72
- Debiec, J. & LeDoux, J.E. (2006) Noradrenergic signaling in the amygdala contributes to the reconsolidation of fear memory: treatment implications for PTSD. Ann N Y Acad Sci 1071, 521-4.
- Debiec, J., LeDoux, J.E. & Nader, K. (2002) Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* **36**, 527-38.
- Degen, J., Gewecke, M. & Roeder, T. (2000) Octopamine receptors in the honey bee and locust nervous system: pharmacological similarities between homologous receptors of distantly related species. *Br J Pharmacol* 130, 587-94.
- Delorenzi, A., Pedreira, M.E., Romano, A., Garcia, S.I., Pirola, C.J., Nahmod, V.E.
 & Maldonado, H. (1996) Angiotensin II enhances long-term memory in the crab Chasmagnathus. *Brain Res Bull* 41, 211-20.
- **Dimant, B. & Maldonado, H.** (1992) Habituation and associative learning during exploratory behavior of the crab Chasmagnathus. *J. Comp. Physiol.* **170A**, 749-759.
- **Dingle, H.** (1983) Strategies of agonistic behavior in Crustacea. In *Studies in adaptation: the behavior of higher Crustacea*, pp. 113-139. Edited by S. Rebacha & D.W. Dunham. New York: Wiley and Sons.
- **Drea, C.M.** (1998) Status, age, and sex effects on performance of discrimination tasks in group-tested rhesus monkeys (Macaca mulatta). *J Comp Psychol* **112**, 170-82.
- Drea, C.M. & Wallen, K. (1999) Low-status monkeys "play dumb" when learning in mixed social groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12965-9.
- **Dudai, Y.** (2002a) Memory from A to Z: Keywords, Concepts, and Beyond. Oxford Press

- **Dudai, Y.** (2002b) Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 211-6.
- **Dudai, Y.** (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* **55**, 51-86.
- **Dudai, Y.** (2006) Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 174-8.
- **Dugatkin, L.A. & Earley, R.L.** (2004) Individual recognition, dominance hierarchies and winner and loser effects. *Proc Biol Sci* **271**, 1537-40.
- Dukas, R. (2008) Evolutionary biology of insect learning. Annu Rev Entomol 53, 145-60.
- **Dunham, P.J.** (1972) Some effects of group housing upon the aggressive behavior of the lobster Homarus americanus. *J. Fish. Res. Board Can* **29**, 598-601.
- **Duvarci, S. & Nader, K.** (2004) Characterization of fear memory reconsolidation. *J Neurosci* **24**, 9269-75.
- Earley, R.L. & Dugatkin, L.A. (2006) Merging social hierarchies: Effects on dominance rank in male green swordtail fish (Xiphophorus helleri). *Behav Processes* 73, 290-8.
- Eckert, M., Rapus, J., Nurnberger, A. & Penzlin, H. (1992) The octopaminergic system within the ventral nerve cord of the American cockroach. *Acta Biol Hung* **43**, 201-11.
- Edwards, D.H., Issa, F.A. & Herberholz, J. (2003) The neural basis of dominance hierarchy formation in crayfish. *Microsc Res Tech* **60**, 369-76.
- Edwards, D.H. & Kravitz, E.A. (1997) Serotonin, social status and aggression. Curr Opin Neurobiol 7, 812-9.
- **Eisenberg, M. & Dudai, Y.** (2004) Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: old fears don't die. *Eur J Neurosci* **20**, 3397-403.
- Eisenstein, E.M., Altman, H.J., Barraco, D.A., Barraco, R.A. & Lovell, K.L. (1983) Brain protein synthesis and memory: the use of antibiotic probes. *Fed Proc* **42**, 3080-5.
- Enquist, M. & Leimar, O. (1983) Evolution of fighting behavior: decision rules and assessment of relative strength. *Journal of Theoretical Biology* **102**, 387-410.
- Erspamer, V. (1952) Identification of octopamine as l-p-hydroxyphenylethanolamine. *Nature* **169**, 375-6.
- Evans, P.D. (1981) Multiple receptor types for octopamine in the locust. *J Physiol* **318**, 99-122.
- Evans, P.D. & Maqueira, B. (2005) Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned Drosophila G-protein coupled receptors. *Invert Neurosci* 5, 111-8.
- Evans, P.D. & Robb, S. (1993) Octopamine receptor subtypes and their modes of action. *Neurochem Res* 18, 869-74.
- Evans, P.D. & Siegler, M.V. (1982) Octopamine mediated relaxation of maintained and catch tension in locust skeletal muscle. *J Physiol* **324**, 93-112.
- Fanselow, M.S. (2000) Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* **110**, 73-81.
- **Farooqui, T.** (2007) Octopamine-mediated neuromodulation of insect senses. *Neurochem Res* **32**, 1511-29.
- Farooqui, T., Robinson, K., Vaessin, H. & Smith, B.H. (2003) Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *J Neurosci* 23, 5370-80.
- Ferris, C.F., Melloni, R.H., Jr., Koppel, G., Perry, K.W., Fuller, R.W. & Delville, Y. (1997) Vasopressin/serotonin interactions in the anterior hypothalamus control aggressive behavior in golden hamsters. *J Neurosci* 17, 4331-40.
- Ferry, B., Roozendaal, B. & McGaugh, J.L. (1999) Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. *Biol Psychiatry* **46**, 1140-52.

- Fields, P. & Woodring, J. (1991) Octopamine mobilization of lipids and carbohydrates in the house cricket, Acheta domesticus. *J Insect Physiol* 37, 193-199.
- Fitchett, A.E., Collins, S.A., Barnard, C.J. & Cassaday, H.J. (2005) Subordinate male mice show long-lasting differences in spatial learning that persist when housed alone. *Neurobiol Learn Mem* 84, 247-51.
- Fletcher, N. & Hardege, J.D. (2009) The cost of conflict: agonistic encounters influence responses to chemical signals in the shore crab, Carcinus maenas. *Anim.Behav.* 77, 357-361.
- Flood, J.F., Bennett, E.L., Orme, A.E. & Rosenzweig, M.R. (1975) Effects of protein synthesis inhibition on memory for active avoidance training. *Physiol Behav* 14, 177-84.
- Flood, J.F., Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L. & Orme, A.E. (1973) The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiol Behav* 10, 555-62.
- Fox, H.E., White, S.A., Kao, M.H. & Fernald, R.D. (1997) Stress and dominance in a social fish. *J Neurosci* 17, 6463-9.
- Francia, N., Cirulli, F., Chiarotti, F., Antonelli, A., Aloe, L. & Alleva, E. (2006) Spatial memory deficits in middle-aged mice correlate with lower exploratory activity and a subordinate status: role of hippocampal neurotrophins. *Eur J Neurosci* 23, 711-28.
- Frenkel, L., Freudenthal, R., Romano, A., Nahmod, V.E., Maldonado, H. & Delorenzi, A. (2002) Angiotensin II and the transcription factor Rel/NF-kappaB link environmental water shortage with memory improvement. *Neuroscience* 115, 1079-87.
- Frenkel, L., Maldonado, H. & Delorenzi, A. (2005) Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *Eur J Neurosci* 22, 1757-66.
- Freudenthal, R., Locatelli, F., Hermitte, G., Maldonado, H., Lafourcade, C., Delorenzi, A. & Romano, A. (1998) Kappa-B like DNA-binding activity is enhanced after spaced training that induces long-term memory in the crab Chasmagnathus. *Neurosci Lett* 242, 143-6.
- Gallagher, M., Kapp, B.S., Musty, R.E. & Driscoll, P.A. (1977) Memory formation: evidence for a specific neurochemical system in the amygdala. *Science* **198**, 423-5.
- **Giurfa, M.** (2006) Associative learning: the instructive function of biogenic amines. *Curr Biol* **16**, R892-5.
- **Giurfa, M.** (2007) Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **193**, 801-24.
- Glanzman, D.L. & Krasne, F.B. (1983) Serotonin and octopamine have opposite modulatory effects on the crayfish's lateral giant escape reaction. *J Neurosci* **3**, 2263-9.
- Gleeson, R. & Zubkoff, P. (1977) The determination of hemolymph volume in the blue crab, Callinectes sapidus, utilizing 14C-thiocyanate. *Comp. Biochem. Physiol* **56A**, 411-413.
- Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S. & Kandel, E.R. (1986) The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* **322**, 419-22.
- Goessmann, C., Hemelrijk, C. & Huber, R. (2000) The formation and maintenance of crayfish hierarchies: behavioral and self-structuring properties. *Behav. Ecol. Sociobiol* 48, 418-428.
- Gold, P.E. (2006) The many faces of amnesia. *Learn Mem* 13, 506-14.
- Gold, P.E., Hankins, L., Edwards, R.M., Chester, J. & McGaugh, J.L. (1975)
 Memory interference and facilitation with posttrial amygdala stimulation: effect on memory varies with footshock level. *Brain Res* 86, 509-13.
- Gold, P.E. & van Buskirk, R. (1976) Effects of posttrial hormone injections on memory processes. *Horm Behav* 7, 509-17.
- Gold, P.E. & van Buskirk, R. (1978) Effects of alpha- and beta-adrenergic receptor antagonists on post-trial epinephrine modulation of memory: relationship to post-training brain norepinephrine concentrations. *Behav Biol* 24, 168-84.
- Grant, W.C., Jr. & Ulmer, K.M. (1974) Shell selection and aggressive behavior in two sympatric species of hermit crabs. *Biol Bull* **146**, 32-43.

- Guiasu, R.C. & Dunham, D.W. (1999) Aggressive interactions between the crayfishes Cambarus bartonii bartonii and C. robustus (Decapoda: Cambaridae): interespecific and intraespecific contests. *Journal of Crustacean Biology*, 19, 131-146.
- Gutierrez, J.L. & Iribarne, O.O. (2004) Conditional responses of organisms to habitat structure: an example from intertidal mudflats. *Oecologia* **139**, 572-82.
- **Hammer, M.** (1993) An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* **366**, 59-63.
- Hammer, M. & Menzel, R. (1998) Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn Mem* 5, 146-56.
- Han, K.A., Millar, N.S. & Davis, R.L. (1998) A novel octopamine receptor with preferential expression in Drosophila mushroom bodies. *J Neurosci* 18, 3650-8.
- Harris-Warrick, R.M. & Kravitz, E.A. (1984) Cellular mechanisms for modulation of posture by octopamine and serotonin in the lobster. *J Neurosci* 4, 1976-93.
- Harris, J. & Woodring, J. (1992) Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (Apis mellifera L) brain. *Journal of Insect Physiology* **38**, 29-35.
- Harzsch, S., Muller, C.H. & Wolf, H. (2005) From variable to constant cell numbers: cellular characteristics of the arthropod nervous system argue against a sister-group relationship of Chelicerata and "Myriapoda" but favour the Mandibulata concept. *Dev Genes Evol* 215, 53-68.
- Hashemzadeh-Gargari, H. & Friesen, W. (1989) Modulation of swimming activity in the medicinal leech by serotonin and octopamine. . *Comp Biochem Physiol C* **94**, 295-302.
- Hawkins, R.D., Kandel, E.R. & Bailey, C.H. (2006) Molecular mechanisms of memory storage in Aplysia. *Biol Bull* 210, 174-91.
- Hayassi S, M.L., Florey E (1977) Octopamine metabolism in invertebrates (Locusta, Atacus, Helix): evidence for N-acetilation in arthropod tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 58C 183-191.
- Hebb, D. (1949) The organization of behavior New York: Wiley.
- Heinrich, R., Braunig, P., Walter, I., Schneider, H. & Kravitz, E.A. (2000) Aminergic neuron systems of lobsters: morphology and electrophysiology of octopamine-containing neurosecretory cells. J Comp Physiol [A] 186, 617-29.
- Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S. & Byers, D. (1985) Drosophila mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* 2, 1-30.
- Herberholz, J., Sen, M.M. & Edwards, D.H. (2003) Parallel changes in agonistic and non-agonistic behaviors during dominance hierarchy formation in crayfish. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 189, 321-5.
- Hermitte, G. (1995) Mecanismos asociativos en el aprendizaje apetitivamente motivado del cangrejo Chasmagnathus granulatus. Memoria del contexto. Vol. Tesis doctoral: Universidad de Buenos Aires.
- Hermitte, G., Pedreira, M.E., Tomsic, D. & Maldonado, H. (1999) Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long-term habituation after spaced, but not massed, training in the crab Chasmagnathus. *Neurobiol Learn Mem* 71, 34-49.
- **Hildebrandt, H. & Muller, U.** (1995) Octopamine mediates rapid stimulation of protein kinase A in the antennal lobe of honeybees. *J Neurobiol* **27**, 44-50.
- Hirashima, A., Sukhanova, M. & Rauschenbach, I. (2000) Biogenic amines in Drosophila virilis under stress conditions. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 2625-30.
- Hoeger, R. & Florey, E. (1989) Catecholamine degradation in the hemolymph of the Chinese crab, Eriocheir sinesis. *Comp Biochem Physiol* **92**, 323-327.
- Hofmann, H.A. & Stevenson, P.A. (2000) Flight restores fight in crickets. *Nature* 403, 613.
- Horner, M., Weiger, W.A., Edwards, D.H. & Kravitz, E.A. (1997) Excitation of identified serotonergic neurons by escape command neurons in lobsters. *J Exp Biol* **200**, 2017-33.

- Howell, D.C. (1987) Statistical methods for psychology. Boston: PWS-Kent Publishing.
- Howell, K.M. & Evans, P.D. (1998) The characterization of presynaptic octopamine receptors modulating octopamine release from an identified neurone in the locust. *J Exp Biol* 201 (Pt 13), 2053-60.
- Hoyer, S.C., Eckart, A., Herrel, A., Zars, T., Fischer, S.A., Hardie, S.L. & Heisenberg, M. (2008) Octopamine in male aggression of Drosophila. Curr Biol 18, 159-67.
- **Huber, R.** (2005) Amines and motivated behaviors: a simpler systems approach to complex behavioral phenomena. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **191**, 231-9.
- Huber, R., Orzeszyna, M., Pokorny, N. & Kravitz, E.A. (1997a) Biogenic amines and aggression: experimental approaches in crustaceans. *Brain Behav Evol* **50 Suppl 1**, 60-8.
- Huber, R., Panksepp, J.B., Yue, Z., Delago, A. & Moore, P. (2001) Dynamic interactions of behavior and amine neurochemistry in acquisition and maintenance of social rank in crayfish. *Brain Behav Evol* 57, 271-82.
- Huber, R., Smith, K., Delago, A., Isaksson, K. & Kravitz, E.A. (1997b) Serotonin and aggressive motivation in crustaceans: altering the decision to retreat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5939-42.
- Introini-Collison, I.B., Dalmaz, C. & McGaugh, J.L. (1996) Amygdala betanoradrenergic influences on memory storage involve cholinergic activation. *Neurobiol Learn Mem* 65, 57-64.
- Isaac, R.E., Muimo, R. & MacGregor, A.N. (1990) N-acetylation of serotonin, octopamine and dopamine by adult Brugia pahangi. *Mol Biochem Parasitol* 43, 193-8.
- Issa, F.A., Adamson, D.J. & Edwards, D.H. (1999) Dominance hierarchy formation in juvenile crayfish procambarus clarkii. *J Exp Biol* **202** Pt **24**, 3497-506.
- Izquierdo, I. (1989) Different forms of post-training memory processing. *Behav. Neur. Biol* **51**, 171-202.
- Kamei, C., Mio, M., Kitazumi, K., Tsujimoto, S., Yoshida, T., Adachi, Y. & Tasaka, K. (1992) Antiallergic effect of epinastine (WAL 801 CL) on immediate hypersensitivity reactions: (II). Antagonistic effect of epinastine on chemical mediators, mainly antihistaminic and anti-PAF effects. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 14, 207-18.
- Karavanich, C. & Atema, J. (1998) Individual recognition and memory in lobster dominance. *Anim Behav* **56**, 1553-1560.
- Katz, R.J. & Sibel, M. (1982) Animal model of depression: tests of three structurally and pharmacologically novel antidepressant compounds. *Pharmacol Biochem Behav* 16, 973-7.
- **Keene, A.C. & Waddell, S.** (2005) Drosophila memory: dopamine signals punishment? *Curr Biol* **15**, R932-4.
- Kemp, D.J. & Wiklund, C. (2004) Residency effects in animal contests. *Proc Biol Sci* 271, 1707-11.
- Kida, S., Josselyn, S.A., de Ortiz, S.P., Kogan, J.H., Chevere, I., Masushige, S. & Silva, A.J. (2002) CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5, 348-55.
- Kim, J.J. & Diamond, D.M. (2002) The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* **3**, 453-62.
- Kim, Y.C., Lee, H.G. & Han, K.A. (2007) Classical reward conditioning in Drosophila melanogaster. *Genes Brain Behav* **6**, 201-7.
- Korn, H. & Faber, D.S. (1996) Escape behavior brainstem and spinal cord circuitry and function. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 826-32.
- Krasne, F. (1978) Extrinsic control of intrinsic neuronal plasticity: an hypothesis from work on simple systems. *Brain Res* **140**, 197-216.
- Kravitz, E.A. (2000) Serotonin and aggression: insights gained from a lobster model system and speculations on the role of amine neurons in a complex behavior. *J Comp Physiol [A]* **186**, 221-38.

- Kravitz, E.A., Glusman, S., Harris-Warrick, R.M., Livingstone, M.S., Schwarz, T. & Goy, M.F. (1980) Amines and a peptide as neurohormones in lobsters: actions on neuromuscular preparations and preliminary behavioural studies. *J Exp Biol* 89, 159-75.
- Kravitz, E.A. & Huber, R. (2003) Aggression in invertebrates. Curr Opin Neurobiol 13, 736-43.
- Krebs, J. & Davies, N. (1993) An introduction to behavioural ecology. Blackwell Science.
- **Kyriakides, M.A. & McCrohan, C.R.** (1989) Effect of putative neuromodulators on rhythmic buccal motor output in Lymnaea stagnalis. *J Neurobiol* **20**, 635-50.
- Lange, A.B. (2008) Tyramine: From octopamine precursor to neuroactive chemical in insects. *Gen Comp Endocrinol*.
- Lee, H.J., Berger, S.Y., Stiedl, O., Spiess, J. & Kim, J.J. (2001) Post-training injections of catecholaminergic drugs do not modulate fear conditioning in rats and mice. *Neurosci Lett* 303, 123-6.
- Lee, J.L., Everitt, B.J. & Thomas, K.L. (2004) Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* **304**, 839-43.
- Lewontin, R.C. (2000) Genes, organismo y ambiente: las relaciones de causa y efecto en biología.: Editorial Gedisa.
- Libersat, F. & Pflüger, H.-J. (2004) Monoamines and the orchestration of behavior. BioScience 54, 17 - 25.
- Livingstone, M.S., Harris-Warrick, R.M. & Kravitz, E.A. (1980) Serotonin and Octopamine Produce Opposite Postures in Lobsters. *Science* **208**, 76-79.
- Locatelli, F., Maldonado, H. & Romano, A. (2002) Two critical periods for cAMP-dependent protein kinase activity during long-term memory consolidation in the crab Chasmagnathus. *Neurobiol Learn Mem* 77, 234-49.
- Ma, P.M., Beltz, B.S. & Kravitz, E.A. (1992) Serotonin-containing neurons in lobsters: their role as gain-setters in postural control mechanisms. *J Neurophysiol* **68**, 36-54.
- Maldonado, H. (2002) Crustacean as model to investigate memory illustrated by extensive behavioral and physiological studies in Chasmagnathus. In *The crustacean nervous system*, pp. 314-327. Edited by K. Wiese. Berlin: Springer.
- Maldonado, H. (2008) La memoria animal. Adquisición, persistencia y olvido. Buenos Aires: Eudeba.
- Maldonado, H., Romano, A. & Tomsic, D. (1997) Long-term habituation (LTH) in the crab Chasmagnathus: a model for behavioral and mechanistic studies of memory. Braz J Med Biol Res 30, 813-26.
- Martin-Soelch, C., Linthicum, J. & Ernst, M. (2007) Appetitive conditioning: neural bases and implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev* 31, 426-40.
- McEwen, B. & Sapolski, R. (1995) Stress and cognitive function. *Curr. Opin Neurobiol* 5, 205-216.
- McGaugh, J.L. (2000) Memory--a century of consolidation. Science 287, 248-51.
- McGaugh, J.L. (2006) Make mild moments memorable: add a little arousal. *Trends Cogn Sci* **10**, 345-7.
- McGaugh, J.L. & Izquierdo, I. (2000) The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 208-10.
- McGaugh, J.L. & Roozendaal, B. (2002) Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 12, 205-10.
- McMahon, A., Patullo, B.W. & Macmillan, D.L. (2005) Exploration in a T-maze by the crayfish Cherax destructor suggests bilateral comparison of antennal tactile information. *Biol Bull* 208, 183-8.
- **Menzel, R.** (2007) Phylogeny and evolution: on comparing species at mutliple levels. In *Science of Memory: Concepts*
- pp. 371-375. Edited by H.L. Roediger, Y. Dudai & S.M. Fitzpatrick. Oxford University Press.

- Menzel, R. & Giurfa, M. (2001) Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. Trends Cogn Sci 5, 62-71.
- Menzel, R. & Muller, U. (2001) Neurobiology. Learning from a fly's memory. Nature 411, 433-4.
- Menzel, R., Wittstock, S. & Sugawa, M. (1990) Chemical codes of learning and memory in honey bees. In *The biology of memory*, pp. 335-360. Edited by L. Squire & E. Lindenlaub. Stuttgart: Schattauer.
- Merlo, E., Freudenthal, R., Maldonado, H. & Romano, A. (2005) Activation of the transcription factor NF-kappaB by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. *Learn Mem* 12, 23-9.
- Miller, C.A. & Sweatt, J.D. (2006) Amnesia or retrieval deficit? Implications of a molecular approach to the question of reconsolidation. *Learn Mem* 13, 498-505.
- Misanin, J.R., Miller, R.R. & Lewis, D.J. (1968) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* **160**, 554-5.
- Mishkin, M. (1982) A memory system in the monkey. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 298, 83-95.
- Murchison, C.F., Zhang, X.Y., Zhang, W.P., Ouyang, M., Lee, A. & Thomas, S.A. (2004) A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell* 117, 131-43.
- Myers, K.M. & Davis, M. (2002) Behavioral and neural analysis of extinction. Neuron 36, 567-84.
- Nader, K., Schafe, G.E. & Le Doux, J.E. (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**, 722-6.
- Nathanson, J.A., Hunnicutt, E.J., Kantham, L. & Scavone, C. (1993) Cocaine as a naturally occurring insecticide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9645-8.
- Nelson, R.J. (2006) Biology of aggression. Oxford University Press.
- Orchard, I., Carlisle, J.A., Loughton, B.G., Gole, J.W. & Downer, R.G. (1982) In vitro studies on the effects of octopamine on locust fat body. *Gen Comp Endocrinol* 48, 7-13.
- **Osborne, R.H.** (1996) Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. *Pharmacol Ther* **69**, 117-42.
- Panksepp, J.B., Yue, Z., Drerup, C. & Huber, R. (2003) Amine neurochemistry and aggression in crayfish. *Microsc Res Tech* **60**, 360-8.
- Parker, G.A. (1974) Assessment strategy and the evolution of fighting behaviour. *J Theor Biol* 47, 223-243.
- Patullo, B.W. & Macmillan, D.L. (2006) Corners and bubble wrap: the structure and texture of surfaces influence crayfish exploratory behaviour. *J Exp Biol* **209**, 567-75.
- Pedreira, M.E., Dimant, B. & Maldonado, H. (1996) Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab Chasmagnathus. *Pharmacol Biochem Behav* **54**, 611-7.
- Pedreira, M.E., Dimant, B., Tomsic, D., Quesada-Allue, L.A. & Maldonado, H. (1995) Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab Chasmagnathus. *Pharmacol Biochem Behav* **52**, 385-95.
- Pedreira, M.E. & Maldonado, H. (2003) Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* **38**, 863-9.
- Pedreira, M.E., Perez-Cuesta, L.M. & Maldonado, H. (2002) Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab Chasmagnathus: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. J Neurosci 22, 8305-11.
- Pedreira, M.E., Perez-Cuesta, L.M. & Maldonado, H. (2004) Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. *Learn Mem* 11, 579-85.
- Pelz, C., Gerber, B. & Menzel, R. (1997) Odorant intensity as a determinant for olfactory conditioning in honeybees: roles in discrimination, overshadowing and memory consolidation. *J Exp Biol* 200, 837-47.

- Pereyra, P., De La Iglesia, H.O. & Maldonado, H. (1996) Training-to-testing intervals different from 24 h impair habituation in the crab Chasmagnathus. *Physiol Behav* **59**, 19-25.
- Pereyra, P., Gonzalez Portino, E. & Maldonado, H. (2000) Long-lasting and contextspecific freezing preference is acquired after spaced repeated presentations of a danger stimulus in the crab Chasmagnathus. *Neurobiol Learn Mem* 74, 119-34.
- **Pflüger, H.-J. & Stevenson, P.A.** (2005) Evolutionary aspects of octopaminergic systems with emphasis on arthropods. *Arthropod Structure and Development* **34**, 379-396.
- Pimley, R. & Stafford, K. (1985) Octopamine distributionin the Tsetse fly Glossina morisans. . *Comp. Biochem. Physiol.* **81C**, 297-301.
- Pophof, B. (2002) Octopamine enhances moth olfactory responses to pheromones, but not those to general odorants. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol 188, 659-62
- Pravosudov, V.V., Mendoza, S.P. & Clayton, N.S. (2003) The relationship between dominance, corticosterone, memory, and food caching in mountain chickadees (Poecile gambeli). *Horm Behav* 44, 93-102.
- Prier, K., Beckman, O. & Tublitz, N. (1994) Modulating a modulator: biogenic amines at subthreshold levels potentiate peptide-mediated cardioexcitation of the heart of the tobacco hawkmoth Manduca sexta. *J Exp. Biol* 197, 377-391.
- Przybysławski, J., Roullet, P. & Sara, S.J. (1999) Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* 19, 6623-8.
- **Rescorla, R.A.** (1988) Pavlovian conditioning. It's not what you think it is. *Am Psychol* **43**, 151-60.
- Riemensperger, T., Voller, T., Stock, P., Buchner, E. & Fiala, A. (2005) Punishment prediction by dopaminergic neurons in Drosophila. *Curr Biol* **15**, 1953-60.
- Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (1996) Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 228-36.
- **Roeder, T.** (1995) Pharmacology of the octopamine receptor from locust central nervous tissue (OAR3). *Br J Pharmacol* **114**, 210-6.
- Roeder, T. (1999) Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol* **59**, 533-61.
- Roeder, T. (2005) Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu Rev Entomol* 50, 447-77.
- Roeder, T., Degen, J. & Gewecke, M. (1998) Epinastine, a highly specific antagonist of insect neuronal octopamine receptors. *Eur J Pharmacol* **349**, 171-7.
- Roeder, T., Seifert, M., Kahler, C. & Gewecke, M. (2003) Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism. *Arch Insect Biochem Physiol* **54**, 1-13.
- Romano, A., Delorenzi, A., Pedreira, M.E., Tomsic, D. & Maldonado, H. (1996a) Acute administration of a permeant analog of cAMP and a phosphodiesterase inhibitor improve long-term habituation in the crab Chasmagnathus. *Behav Brain Res* 75, 119-25.
- Romano, A., Locatelli, F., Delorenzi, A., Pedreira, M.E. & Maldonado, H. (1996b) Effects of activation and inhibition of cAMP-dependent protein kinase on long-term habituation in the crab Chasmagnathus. *Brain Res* 735, 131-40.
- Romano, A., Locatelli, F., Freudenthal, R., Merlo, E., Feld, M., Ariel, P., Lemos, D., Federman, N. & Fustinana, M.S. (2006) Lessons from a crab: molecular mechanisms in different memory phases of Chasmagnathus. *Biol Bull* 210, 280-8.
- Rosenthal, R. & Rosnow, R. (1985) Contrast analysis focused comparisons in the analysis of variance. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Rosenzweig, M. (1998) Historical Perspectives on the development of the biology of memory. In Neurobiology of learning and memoryEdited by J. Martinez & R. Kesner. Academic Press.
- Roullet, P. & Sara, S. (1998) Consolidation of memory after its reactivation: involvement of beta noradrenergic receptors in the late phase. *Neural Plast* **6**, 63-8.

- Salinska, E., Bourne, R.C. & Rose, S.P. (2004) Reminder effects: the molecular cascade following a reminder in young chicks does not recapitulate that following training on a passive avoidance task. *Eur J Neurosci* 19, 3042-7.
- Sandeman, D.C. (1967) The vascular circulation in the brain, optic lobes and thoracic ganglia of the crab Carcinus. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **168**, 82-90.
- Sandoz, J.C., Hammer, M. & Menzel, R. (2002) Side-specificity of olfactory learning in the honeybee: US input side. *Learn Mem* 9, 337-48.
- Sara, S.J. (2000a) Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. Learn Mem 7, 73-84.
- Sara, S.J. (2000b) Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nat Rev Neurosci* 1, 212-3.
- Scavone, C., McKee, M. & Nathanson, J.A. (1994) Monoamine uptake in insect synaptosomal preparations. *Insect Biochem Mol Biol* **24**, 589-97.
- Schneider, H., Trimmer, B.A., Rapus, J., Eckert, M., Valentine, D.E. & Kravitz, E.A. (1993) Mapping of octopamine-immunoreactive neurons in the central nervous system of the lobster. *J Comp Neurol* 329, 129-42.
- Schroll, C., Riemensperger, T., Bucher, D., Ehmer, J., Voller, T., Erbguth, K., Gerber, B., Hendel, T., Nagel, G., Buchner, E. & Fiala, A. (2006) Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in Drosophila larvae. *Curr Biol* 16, 1741-7.
- Schultz, W. (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 7, 191-7.
- Schulz, D.J. & Robinson, G.E. (1999) Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. *J Comp Physiol [A]* **184**, 481-8.
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S. & Heisenberg, M. (2003) Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in Drosophila. *J Neurosci* 23, 10495-502.
- Sinakevitch, I., Niwa, M. & Strausfeld, N.J. (2005) Octopamine-like immunoreactivity in the honey bee and cockroach: comparable organization in the brain and subesophageal ganglion. *J Comp Neurol* **488**, 233-54.
- Sinakevitch, I. & Strausfeld, N.J. (2006) Comparison of octopamine-like immunoreactivity in the brains of the fruit fly and blow fly. *J Comp Neurol* **494**, 460-75.
- Smith, A. & Nutt, D. (1996) Noradrenaline and attention lapses. *Nature* **380**, 291.
- Sneddon, L.U. & Swaddle, J.P. (1999) Asymmetry and fighting performance in the shore crab Carcinus maenas. *Anim Behav* 58, 431-435.
- Sneddon, L.U., Taylor, A.C., Huntingford, F.A. & Watson, D.G. (2000) Agonistic behaviour and biogenic amines in shore crabs Carcinus maenas. *J Exp Biol* **203**, 537-45.
- Sombati, S. & Hoyle, G. (1984a) Central nervous sensitization and dishabituation of reflex action in an insect by the neuromodulator octopamine. *J Neurobiol* 15, 455-80.
- Sombati, S. & Hoyle, G. (1984b) Generation of specific behaviors in a locust by local release into neuropil of the natural neuromodulator octopamine. *J Neurobiol* **15**, 481-506.
- Sosa, M. & Baro, D. (2002) Amine effects on aggression in the giant tropical freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii. In *The Crustacean Nervous System*, pp. 143-155. Edited by K. Wiese. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- **Spivak, E.D.** (1997) Cangrejos estuariales del Atlántico sudoccidental (25°-41°S) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Investig. mar.* **25**, 105-120.
- Spritzer, M.D., Meikle, D.B. & Solomon, N.G. (2004) The relationship between dominance rank and spatial ability among male meadow voles (Microtus pennsylvanicus). J Comp Psychol 118, 332-9.
- Steketee, J.D., Silverman, P.B. & Swann, A.C. (1989) Forebrain norepinephrine involvement in selective attention and neophobia. *Physiol Behav* **46**, 577-83.

- **Stern, M.** (1999) Octopamine in the locust brain: cellular distribution and functional significance in an arousal mechanism. *Microse Res Tech* **45**, 135-41.
- Stern, M. (2009) The PM1 neurons, movement sensitive centrifugal visual brain neurons in the locust: anatomy, physiology, and modulation by identified octopaminergic neurons. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 195, 123-37.
- Stevenson, P.A., Dyakonova, V., Rillich, J. & Schildberger, K. (2005) Octopamine and experience-dependent modulation of aggression in crickets. *J Neurosci* **25**, 1431-41.
- Stevenson, P.A., Hofmann, H.A., Schoch, K. & Schildberger, K. (2000) The fight and flight responses of crickets depleted of biogenic amines. *J Neurobiol* **43**, 107-20.
- Taubenfeld, S.M., Milekic, M.H., Monti, B. & Alberini, C.M. (2001) The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 4, 813-8.
- Thorpe, W. (1963) The concepts of learning and their relation to those of instinct. *Physiological Mechanism in Animal Behaviour Symposium. Soc. Exp. Biol* 4, 387-408.
- Tomsic, D., Massoni, V. & Maldonado, H. (1993) Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs: ontogenic, ecological and opioid modulation correlates *Journal of Comparative Physiology A* 173, 621-633.
- Tomsic, D., Romano, A. & Maldonado, H. (1998) Behavioral and mechanistic bases of long-term habituation in the crab Chasmagnathus. *Adv Exp Med Biol* **446**, 17-35.
- Tricarico, E. & Gherardi, F. (2007) Biogenic amines influence aggressiveness in crayfish but not their force or hierarchical rank. *Anim Behav* 74, 1715-1724.
- Troncoso, J. & Maldonado, H. (2002) Two related forms of memory in the crab Chasmagnathus are differentially affected by NMDA receptor antagonists. *Pharmacol Biochem Behav* 72, 251-65.
- Tronel, S., Feenstra, M.G. & Sara, S.J. (2004) Noradrenergic action in prefrontal cortex in the late stage of memory consolidation. *Learn Mem* 11, 453-8.
- Tully, T., Preat, T., Boynton, S.C. & Del Vecchio, M. (1994) Genetic dissection of consolidated memory in Drosophila. *Cell* **79**, 35-47.
- Unoki, S., Matsumoto, Y. & Mizunami, M. (2005) Participation of octopaminergic reward system and dopaminergic punishment system in insect olfactory learning revealed by pharmacological study. *Eur J Neurosci* 22, 1409-16.
- Unoki, S., Matsumoto, Y. & Mizunami, M. (2006) Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in mediating reward and punishment signals in insect visual learning. *Eur J Neurosci* **24**, 2031-8.
- Valzelli, L. (1973) The "isolation syndrome" in mice. *Psychopharmacologia* 31, 305-320.
- Vergoz, V., Roussel, E., Sandoz, J.C. & Giurfa, M. (2007) Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. *PLoS ONE* 2, e288.
- Virgin, C.E., Jr. & Sapolsky, R.M. (1997) Styles of male social behavior and their endocrine correlates among low-ranking baboons. *Am J Primatol* 42, 25-39.
- Vye, C., Cobb, J.S., Bradley, T., Gabbay, J., Genizi, A. & Karplus, I. (1997) Predicting the winningor losing of symmetrical contests in the American lobster Homarus americanus (Milne-Edwards). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 217, 19-29.
- Wagener-Hulme, C., Kuehn, J.C., Schulz, D.J. & Robinson, G.E. (1999) Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. *J Comp Physiol* [A] **184**, 471-9.
- Wang, Z., Hayakawa, Y. & Downer, R. (1990) Factor influencing cAMP and diacylglicerol levels in fat body of Locusta migratoria. *Insect Biochem Mol Biol* 20, 325-330.
- Watanabe, H. & Mizunami, M. (2007) Pavlov's cockroach: classical conditioning of salivation in an insect. *PLoS ONE* 2, e529.
- Whim, M. & Evans, P. (1988) Octopaminergic modulation of flight muscle in the locust. J. Exp. Biol 134, 247-266.
- White, N.M. & Milner, P.M. (1992) The psychobiology of reinforcers. *Annu Rev Psychol* 43, 443-71.

- White, S.A., Kasten, T.L., Bond, C.T., Adelman, J.P. & Fernald, R.D. (1995) Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8363-7.
- Whitlow, J.W. & Wagner, A.R. (1984) Memory and habituation. In *Habituation, sensitization, and behavior* pp. 103-153. Edited by V.S. Peeke & L. Petrinovich. New York: Academic Press.
- Wierenga, J.M. & Hollingworth, R.M. (1990) Octopamine uptake and metabolism in the insect nervous system. *J Neurochem* **54**, 479-89.
- Yeh, S.R., Musolf, B.E. & Edwards, D.H. (1997) Neuronal adaptations to changes in the social dominance status of crayfish. *J Neurosci* 17, 697-708.
- Zeil, J. & Zanker, J.M. (1997) A glimpse into crabworld. Vision Res 37, 3417-26.
- Zimmer-Faust, R.K., Tyre, J.E., Michel, W.C. & Case, J.F. (1984) Chemical mediation of appetitive feeding in a marine decapod crustacean: the importance of supression and synergism. *Biol Bull* 167, 339-353.
- Zulandt Schneider, R.A., Huber, R. & Moore, P.A. (2001) Individual and status recognition in the crayfish Ornectes rusticus: the effects of urine release on fight dynamics. *Behavior* 138, 137-153.