

Tesis Doctoral

Dinámica e interrelación entre reconsolidación y extinción de la memoria en el cangrejo Chasmagnathus

Pérez-Cuesta, Luis María

2010

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

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

Cita tipo APA:

Pérez-Cuesta, Luis María. (2010). Dinámica e interrelación entre reconsolidación y extinción de la memoria en el cangrejo Chasmagnathus. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pérez-Cuesta, Luis María. "Dinámica e interrelación entre reconsolidación y extinción de la memoria en el cangrejo Chasmagnathus". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Dinámica e interrelación entre
reconsolidación y extinción de la memoria
en el cangrejo *Chasmagnathus***

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

Autor:

Lic. Luis María Pérez-Cuesta

Director de tesis y consejero de estudios:

Dr. Héctor Maldonado

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, 2010 –

Dinámica e interrelación entre reconsolidación y extinción de la memoria en el cangrejo *Chasmagnathus*

Resumen

La reconsolidación y la extinción de la memoria son dos procesos mnésicos funcionalmente relacionados, ya que ambos están involucrados en el procesamiento y almacenamiento de nueva información relacionada con un aprendizaje anterior. Sin embargo, ambos procesos están basados en mecanismos muy distintos. Mientras que la reconsolidación involucra una desestabilización y reestabilización de la traza del aprendizaje original, la extinción genera una nueva traza que compite con la anterior. Trabajos previos de nuestro laboratorio revelaron por primera vez una relación mecánica entre reconsolidación y extinción, mostrando que la presentación de un estímulo condicionado (CS) puede inducir uno u otro proceso dependiendo de su duración.

En este trabajo revelamos nuevas características paramétricas que determinan la inducción de la reconsolidación y la extinción, la cinética con la que estos procesos ocurren, y un hipotético mecanismo que los vincula, que tiene lugar tras el fin del CS. Encontramos que (a) durante toda la presentación del CS la memoria original permanece intacta y consolidada, mostrando que ni reconsolidación ni extinción son inducidas hasta la terminación del CS, independientemente de su duración, (b) la presentación de un único refuerzo (US) durante la exposición al CS tiene la capacidad de prevenir la inducción tanto de la extinción como de la reconsolidación, (c) la extinción de la memoria ocurre pocos segundos después del fin del CS, y (d) reconsolidación y extinción son inducidos de forma mutuamente excluyente tras un único CS, pero ambos procesos pueden dispararse por sendos CSs y desarrollarse simultáneamente. Como resultado, presentamos un modelo que integra estos hallazgos, reflejando la dinámica e interrelación entre los procesos de reconsolidación y extinción de la memoria.

Palabras clave: memoria, reconsolidación, extinción, síntesis de proteínas, invertebrado.

Dynamics and interrelationship of memory reconsolidation and extinction in the crab *Chasmagnathus*.

Abstract

Memory reconsolidation and extinction are two functionally related memory processes, since they are both involved in the processing and storage of new information related to a previous learning. However, both processes are based on very different mechanisms. Reconsolidation involves a destabilization and a restabilization of the original memory trace, whereas extinction generates a new memory trace that competes with the former. Previous work from our laboratory showed for the first time that there is a mechanistic relationship between reconsolidation and extinction, since a single conditioned stimulus (CS) exposure could trigger one or the other process depending on its duration.

Here we disclose new parametric conditions for the triggering of reconsolidation and extinction, the kinetics of these processes, and an hypothetic mechanism operating after CS offset that links both mnesic process. We have found that (a) during the entire CS presentation the original memory remains intact and consolidated, showing that neither reconsolidation nor extinction are triggered before CS termination, regardless of its duration, (b) a single reinforcement (US) presentation during CS exposure is able to prevent both reconsolidation and extinction triggering, (c) memory extinction is triggered a few seconds after CS offset, and (d) triggering of reconsolidation and extinction is mutually exclusive when a single CS is presented, but both processes can be serially triggered by respective CS presentations, and develop simultaneously. As result, we present a model integrating these findings, showing the dynamics and interrelationship of memory reconsolidation and extinction.

Key words: memory, reconsolidation, extinction, protein synthesis, invertebrate.

Publicaciones

Una parte de los resultados de esta Tesis ha sido incluida en las siguientes publicaciones:

- Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. (2004).
Pedreira ME, Pérez-Cuesta LM, Maldonado H.
Learning and Memory, 11:579-585.
- Memory is not extinguished along with CS presentation but within a few seconds after CS-offset. (2007).
Pérez-Cuesta LM, Hepp Y, Pedreira ME, Maldonado H.
Learning and Memory, 14(1):101-108.
- Memory reconsolidation and extinction in the crab: mutual exclusion or coexistence? (2009).
Pérez-Cuesta LM, Maldonado H.
Learning and Memory, 16(11):714-721.

Los resultados presentados en las Figuras 2.12 y 2.13 han formado parte del Seminario de Licenciatura de Luis María Pérez-Cuesta:

“Participación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA en la Reconsolidación y en la Extinción de la Memoria”.

Director: Dr. Héctor Maldonado

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.

Defensa: septiembre de 2004.

Índice

INTRODUCCIÓN GENERAL	8
1 – Aprendizaje y memoria	9
2 – Consolidación de la memoria.....	15
3 – Reconsolidación de la memoria.....	20
4 – Extinción de la memoria.....	27
5 – Modelo experimental:	
Paradigma de Memoria contexto-señal en el cangrejo.....	30
6 – Relación Reconsolidación-Extinción	33
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	41
Objetivos	42
Marco teórico e hipótesis de trabajo.....	43
Definiciones	46
Abreviaturas y denominaciones frecuentes.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS	49
CAPÍTULO I – El refuerzo y el <i>mismatch</i>	59
1 – Rol del refuerzo sobre el proceso de	
<i>labilización y reconsolidación de la memoria</i>	
1.1 – Introducción	60
1.2 – Resultados	61
1.3 – Discusión	67
<i>Rol del refuerzo</i>	68
<i>Rol del fin de la re-exposición</i>	68
2 – Rol del refuerzo sobre el proceso de extinción de la memoria	
2.1 – Introducción.....	70
2.2 – Resultados.....	72
2.3 – Discusión.....	79
<i>Rol del refuerzo, antes y después del fin de la re-exposición</i> ...	79

CAPÍTULO II	
- El fin del CS y el destino de la vieja memoria	81
1 – Dinámica de la extinción de la memoria	
1.1 – Introducción	82
1.2 – Resultados	85
1.3 – Discusión	108
<i>La adquisición de la memoria de extinción</i>	108
<i>El rol del refuerzo</i>	110
<i>Mecanismos de la adquisición y</i>	
<i>la consolidación de la extinción</i>	112
2 – Dinámica de la labilización de la memoria	
2.1 – Introducción	114
2.2 – Resultados	116
2.3 – Discusión	119
<i>La inducción de la labilización de la memoria</i>	119
CAPÍTULO III	
- Reconsolidación y extinción de la memoria:	
¿mutua exclusión o coexistencia?	121
1 – Introducción	122
2 – Resultados	125
3 – Discusión	136
DISCUSIÓN GENERAL	140
1 – El refuerzo y el mismatch	141
2 – El fin del CS y el destino de la vieja memoria	151
3 – Reconsolidación y extinción de la memoria:	
mutua exclusión o coexistencia	154
REFERENCIAS	169

Agradecimientos

A Wendy, por lo mejor de mi vida.

A mi viejo, por apoyarme siempre, de cerca o desde lejos, y por creer en mí.

Al clan Béguelin, Sonia, Raúl, Mami Elsa, Zenón, Silvia, León, Facundo, Manuela, Yuquita, Matías, Marien, Fernando, Iñaki, Arantxa, Pedro, Carla, Heidi, José, Mercedes, Victoria y Guido, mi nueva familia, por tanto afecto.

A Ernesto, mi tío. Por sus valores que siempre permanecen.

A Luis Javier, mi segundo padre (y mi mecenas), por ayudarme a llegar hasta acá.

A Perla, mi segunda madre, por haber estado siempre.

A los amigos de siempre, el Turco, Tristán y el Eluzón, Romi, Mari-Pauni.

A Carla, Jay y Dani, por su amistad, los 42º, el 747 despegando y la vuelta al mundo.

A Héctor, por ser un gran maestro durante estos nueve años, formador de científicos y formador de grupos, por permitir aprender, por trabajar con la puerta abierta y estar siempre abierto a propuestas e iniciativas. Por sus valores en defensa de la universidad pública.

A Euge, por su imprescindible apoyo y contribución sustancial para este trabajo.

A Artur, por toda la ayuda y consejos, y por la lectura y comentarios quirúrgicos del manuscrito.

A Ángel, nuestro gurú electromecánico, por su paciencia inagotable, por hacer que lo imposible sea real, y por los asados en la vieja época!

A Silvia, Lau, Mache, MartínK, Jimena, Luciano, CeciK, Adrián, Yani, MartínC, CeciF, LauraR, Emi, Rami, Fer, Marian, Noe, Sol, VeroDelaf, Gisela, Ángel, Bea, Gabi, Ana, Marga, Tincho, JuliSz, Viole, JuliM, Damián, Mechi, Florencia, Luis, VeroC y Pedro, por hacer del laboratorio un lugar agradable todos los días, donde dan ganas de estar y de laburar, y por las tortas de los viernes!

A Héctor, Euge, Artur, Daniel, Ale, por favorecer un clima de trabajo y convivencia, en el que las jerarquías no se notan (bien entendido, claro), y por ser los principales responsables de que, antes que ser un grupo de trabajo, seamos un grupo humano.

A todos, por ser el afectuoso grupo de personas que son, dentro y fuera del Laboratorio.

A Lidia y toda la troupe de IFM, por todas las productivas discusiones con mate y medialunas en la cancha de tenis.

A los alumnos, que hacen pensar.

A la Universidad pública.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1 - Aprendizaje y memoria

Una característica universal de los animales es la capacidad de formar representaciones internas del medio exterior mediante experiencias sensoriales. En este proceso de conocimiento, los individuos aprenden acerca de la presencia de los distintos estímulos que los rodean, y acerca de las relaciones existentes entre estos estímulos. Esta capacidad cognitiva permite a los animales hacer predicciones acerca de relaciones de contingencia, lo que les provee de grandes ventajas, ya que puede producir cambios adaptativos en el comportamiento.

Definiremos entonces a un aprendizaje como la adquisición de información del entorno durante una experiencia comportamental, y a la memoria como la capacidad de retener esa información en el tiempo, manteniéndola disponible para ser eventualmente recuperada, o *evocada*, en el futuro. Ampliaremos este concepto señalando que esta información, la representación interna, se encuentra codificada en circuitos neuronales en forma de patrones espacio-temporales de actividad adquiridos mediante cambios en las propiedades reactivas de las neuronas como producto del aprendizaje (Dudai 2002a).

Niveles de análisis y fases de la memoria

Como se desprende de esta definición, existen distintos niveles de análisis en una memoria, que presentan una relación jerárquica entre sí. En particular, podemos distinguir tres niveles en su estudio: un nivel comportamental, un nivel de sistema o neural, y un nivel celular y molecular. En otras palabras, puede estudiarse cómo una memoria se manifiesta comportamentalmente, cómo esto está codificado en circuitos neuronales, y cómo las neuronas cambian sus conexiones y sus

propiedades reactivas para formar o modificar estos circuitos, y también cómo estas conexiones son mantenidas en el tiempo.

La existencia en el sistema nervioso de una memoria funcionalmente operativa implica lógicamente que ésta ha pasado primero por distintas etapas o fases: en primer lugar, ha sido adquirida mediante un proceso de aprendizaje, durante una experiencia comportamental, luego, ha sido almacenada en el sistema nervioso y, por último, permanece disponible para ser utilizada, es decir, puede ser evocada. Esto último implica que el comportamiento de un individuo es susceptible de ser afectado por esta memoria. Por ejemplo, un animal que aprendió que un lugar determinado es peligroso, si lo recuerda, lo evitará en el futuro. Este cambio comportamental de evidente valor adaptativo, es una de las herramientas fundamentales para el estudio de la memoria: esto es su *expresión*, es decir, su manifestación comportamental.

Para el estudio de la memoria y sus mecanismos biológicos, se utiliza una gran variedad de modelos animales, desde insectos y crustáceos hasta roedores y primates. En todos ellos, típicamente, se somete a los individuos a una sesión de entrenamiento en la que estos aprenden una tarea que produce un cambio en el comportamiento. Pasado cierto tiempo, se evalúa comportamentalmente si los animales retienen la memoria adquirida en el entrenamiento. Durante este intervalo entre la adquisición y la evaluación de la memoria, distintas intervenciones y tratamientos pueden poner de manifiesto los mecanismos celulares y moleculares que sirven su adquisición, almacenamiento y evocación.

Los abordajes *in vivo* más generalizados incluyen la administración de fármacos que inhiben específicamente alguna función enzimática, transmisión sináptica, vías de señalización celular, biosíntesis de macromoléculas, etc.; estimulaciones y registros electrofisiológicos en neuronas o poblaciones de neuronas particulares;

lesiones discretas en determinadas regiones del sistema nervioso; o simples manipulaciones comportamentales. Asimismo, el empleo de distintos métodos bioquímicos de detección de moléculas específicas en tejidos de animales entrenados en alguna tarea permite el establecimiento de correlaciones neurales, celulares y moleculares con la memoria formada.

Tipos de aprendizaje y condicionamiento

Se distinguen básicamente dos tipos de aprendizaje: el asociativo y el no asociativo. El aprendizaje no asociativo consiste en la simple percepción de los distintos estímulos del medio y el conocimiento de su existencia y sus características. El aprendizaje asociativo, en cambio, consiste en el establecimiento de relaciones, o asociaciones, entre estos estímulos, lo que permite al individuo formular predicciones. Éste es el principio básico del condicionamiento, un fenómeno cognitivo descrito por primera vez en 1927, por Ivan Pavlov.

En sus clásicos experimentos con perros, Pavlov observó que si se presenta al individuo, en forma repetida, un estímulo emocionalmente neutro (el timbre) seguido inmediatamente de otro estímulo emocionalmente relevante (alimento), se produce una asociación entre ambos estímulos de modo que el primero pasa a tener un valor predictivo, anticipatorio, del segundo. Es decir, el individuo aprende una relación de contingencia entre ambos estímulos. Esto se evidencia porque al presentar sólo el primer estímulo, el ahora *estímulo condicionado* (*conditioned stimulus*, CS), comienza a producirse en el animal una respuesta comportamental (salivación) que hasta entonces sólo era producida por el segundo estímulo, el *estímulo incondicionado* (*unconditioned stimulus*, US). De este modo, lo que antes era una *respuesta incondicionada*, es decir, producida siempre por el US, ahora se convierte en una *respuesta condicionada*: una respuesta producida por el CS, sólo después de que la asociación tuvo lugar. Este tipo de

condicionamiento se denomina *clásico* o *pavloviano*, y representa un ejemplo de cómo los animales aprendemos las relaciones existentes entre los estímulos que nos rodean.

En 1957, Burrhus Skinner describió un tipo de condicionamiento cualitativamente distinto, en el que el individuo, en lugar de aprender que el CS predice la llegada del US, aprende que él mismo debe llevar a cabo una acción para que ocurra algo particular (por ejemplo, recibir una recompensa o evitar un castigo). Entonces, la asociación establecida es una relación de contingencia entre su acción (respuesta operante) y la consecuencia de ésta. Este tipo de condicionamiento es conocido como *operante* o *instrumental*, y representa un ejemplo de cómo los animales aprendemos las consecuencias de nuestras propias acciones.

Otra forma de clasificar los condicionamientos es de acuerdo a la naturaleza del componente emocional que motiva el aprendizaje. Éste es un aspecto muy importante, ya que la motivación es un fuerte modulador del aprendizaje (Cahill & McGaugh 1996; McGaugh 2000). En laboratorio es prácticamente imposible lograr que un animal aprenda y realice una tarea si no está motivado, por ejemplo, por hambre, sed o miedo. En el condicionamiento, este componente emocional, se encuentra comprendido en el valor del US, también llamado *refuerzo*.

Se distinguen entonces en este sentido, dos tipos de condicionamiento: el *apetitivo* y el *aversivo*. En un condicionamiento apetitivo, sea clásico o instrumental, el animal está motivado a retener la asociación de estímulos porque ésta implica la predicción de una recompensa, o refuerzo positivo. Así, el individuo puede aprender que un estímulo determinado predice la llegada de alimento o agua, o que él debe presionar tal o cual palanca para recibirlos. En un condicionamiento aversivo, en cambio, el animal aprende que el estímulo en cuestión predice la llegada de un castigo, o refuerzo negativo. Típicamente un tono audible, un flash de luz o un contexto espacial determinado predicen la llegada de un shock eléctrico en las

patas u otro estímulo de peligro. Instrumentalmente, el animal puede aprender que debe moverse, cambiar de lugar (o evitar hacerlo) para no recibir la descarga.

Basados en estos tipos de condicionamiento, existe una gran cantidad de protocolos de entrenamiento y evaluación de la memoria en modelos animales, *paradigmas comportamentales*, utilizados para el estudio del aprendizaje y la memoria, y de sus distintas fases, mecanismos y sustratos biológicos.

Soporte biológico y mecanismos celulares y moleculares de la memoria

La hipótesis fisiológica siempre subyacente al estudio de la formación de una nueva memoria es la de la *plasticidad sináptica* (Martin & Morris 2002). En otras palabras, el aprendizaje induciría cambios selectivos en los pesos sinápticos (eficiencia de la sinapsis) de conexiones neuronales particulares, así como el establecimiento de nuevas conexiones. De esta forma, la codificación de la nueva memoria consistiría en la remodelación de circuitos neurales como producto de estos cambios en sus conexiones, con la consecuente modificación del patrón espacio-temporal de actividad neural. El almacenamiento de esta memoria estaría dado por la estabilización a largo término de las conexiones involucradas (Bailey *et al.* 1996; Dudai 2002a).

En apoyo a esta hipótesis, se han descrito numerosas correlaciones entre el aprendizaje de una tarea y modificaciones en el sistema nervioso a nivel sináptico (Colley *et al.* 1990; Bailey *et al.* 1996; Yin & Tully 1996; Silva *et al.* 1998; Malenka & Nicoll 1999; Müller 2000). También, en estudios electrofisiológicos *in vitro*, se han observado cambios en los pesos sinápticos como función de la actividad en forma específica (Bliss & Lømo 1973; Shors & Matzel 1997; Sweatt

1999). Por otra parte, estudios electrofisiológicos *in vivo* han mostrado fuertes correlaciones entre cambios comportamentales producto de un aprendizaje con cambios en el patrón de actividad durante la respuesta en una única neurona (Tomsic *et al.* 2003).

Los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la plasticidad sináptica, y por lo tanto a la memoria, han sido estudiados extensamente durante las últimas décadas, y hoy se conocen una gran cantidad de eventos celulares y moleculares necesarios para llevar a cabo esta remodelación de las sinapsis y, por extensión, de los circuitos neurales. A continuación veremos la dinámica con la que ocurren estos fenómenos que subyacen la adquisición y el almacenamiento de las memorias.

2 - Consolidación de la memoria

Durante más de un siglo ha prevalecido la idea de que una memoria, tras su adquisición, atraviesa un período de labilidad antes de conformarse de un modo estable y permanente en el sistema nervioso (McGaugh 2000). Este período de labilidad está definido operacionalmente por la sensibilidad de la memoria recién adquirida a diversos agentes amnésicos experimentales como, por ejemplo, intervenciones farmacológicas o comportamentales. Con el solo paso del tiempo, la memoria adquirida es gradualmente estabilizada en el sistema nervioso, con lo que se vuelve permanente a largo término, por períodos que pueden extenderse de días a años, o incluso a toda la vida del individuo. Una vez conformada en este estado estable, la memoria es insensible a los agentes antes mencionados (McGaugh 1966; Squire & Alvarez 1995). Este proceso de estabilización de la memoria a largo término es conocido como *consolidación de la memoria*.

La teoría de la consolidación fue formulada por primera vez por Müller y Pilzecker en 1900, y desde entonces una vasta cantidad de resultados experimentales le han dado forma y sustento teórico. En líneas generales, la teoría postula que toda nueva memoria, inicialmente lábil, es gradualmente consolidada, tras lo cual puede permanecer a largo término por tiempo indefinido. Este postulado lleva implícito el concepto de que el fenómeno de consolidación ocurre una sola vez, tras la adquisición de la memoria (Dudai 2002a).

En los experimentos que generaron esta teoría, los autores observaron que si a un grupo de personas que acaba de memorizar una lista de ítems se le presenta un agente distractor, como puede ser otra tarea de memorización, al evaluar la retención de la primera se verá que este grupo presenta mayores dificultades para recordar la lista que otro grupo de personas a quienes no se le presentó el distractor. Asimismo, se observó que si el distractor es gradualmente demorado respecto de la primera memorización, el efecto amnésico se pierde,

también en forma gradual. Estos experimentos evidenciaron por primera vez la existencia de una ventana temporal de labilidad del orden de unas pocas horas, y desde entonces numerosos trabajos, principalmente en roedores pero también en muchos otros modelos animales, mostraron resultados en el mismo sentido utilizando una gran diversidad de agentes amnésicos.

Inicialmente los tratamientos amnésicos aplicados eran sistémicos e inespecíficos, como, por ejemplo, un shock electroconvulsivo (Duncan 1949; McGaugh 1966). Pero con el desarrollo de la farmacología, se fueron ensayando agentes amnésicos cada vez más específicos; en particular, drogas que bloquean específicamente distintos procesos moleculares. Así, comenzaron a revelarse los distintos eventos moleculares involucrados en la consolidación de la memoria, en función de la capacidad del bloqueante de provocar un efecto amnésico durante el período de labilidad.

Un segundo hallazgo de primordial importancia fue que generalmente el efecto amnésico encontrado era evidente sólo si se evaluaba la memoria uno o más días después, pero no pocas horas después de la adquisición e interferencia (Agranoff *et al.* 1965; Geller *et al.* 1969). Esto condujo a la noción de que, para una misma memoria, había en el sistema nervioso dos representaciones (a) cualitativamente distintas, ya que una era susceptible a la interrupción observada y la otra no, y (b) con distinto curso temporal, siendo que se encontraba una *memoria de corto término* (en este caso, insensible al tratamiento) y una *memoria de largo término* (afectada por el tratamiento). Sólo esta idea de dos representaciones, basadas en mecanismos y/o sustratos distintos, explicaría el hecho que un tratamiento amnésico no pudiera afectar la memoria inmediatamente después de aplicado (ni durante las horas subsiguientes) pero sí lo hiciera en el largo término (e.g. al día siguiente) (Fig. **I.1**).

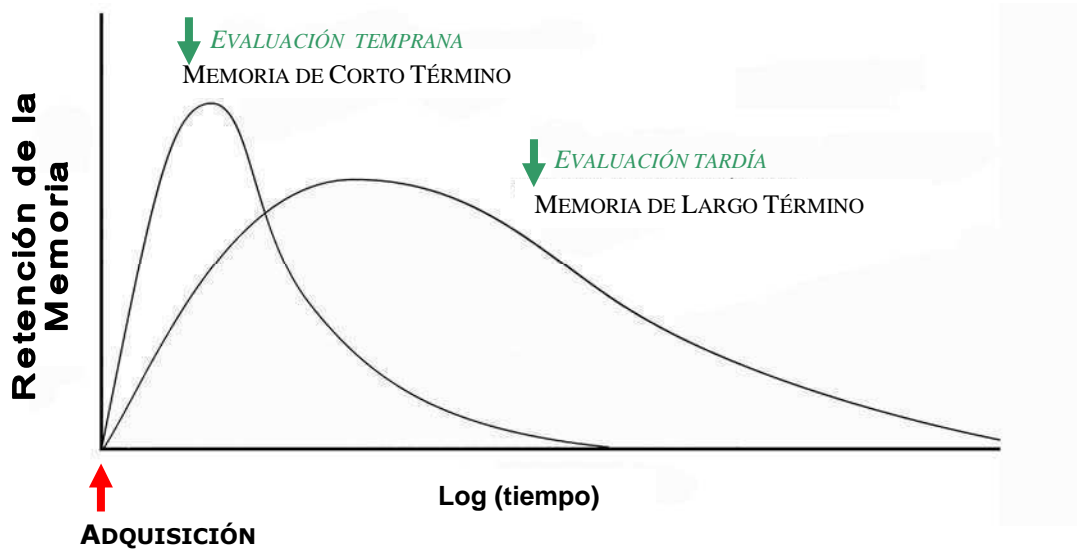


Figura I.1: Modelo de dos memorias con distinto curso temporal. De acuerdo al modelo de dos memorias con distinto curso temporal, se puede afectar la memoria de largo término y, dependiendo del momento de la evaluación, se encontrará o no un efecto amnésico. Si se bloquea la memoria de corto término, se verá retención a largo término sólo si ambas memorias son independientes.

Adaptado de McGaugh 2000.

En 1949, Donald Hebb postuló un modelo de dos memorias en serie: una memoria de corto término cuya consolidación daría lugar a una memoria de largo término, planteando así una relación de dependencia entre ambas representaciones. Aunque consecuentemente con esta hipótesis, se ha demostrado en repetidas ocasiones que el bloqueo de la memoria de corto término impide también la de largo término (Gibbs & Ng 1984), hoy se conocen fármacos capaces de impedir selectivamente la memoria de corto término sin afectar la de largo término (Emptage & Carew 1993; Izquierdo *et al.* 1998), lo que abogaría por dos procesos en paralelo, es decir, dos representaciones independientes. No obstante, este aspecto aun hoy sigue en discusión (McGaugh 2000).

A lo largo de un siglo de estudio, la consolidación de la memoria ha demostrado ser un fenómeno universal, respecto de los tipos de memoria, de las especies y de los paradigmas comportamentales en los

que ha sido puesta a prueba (McGaugh 2000; Dudai 2004). Asimismo, los mecanismos celulares y moleculares involucrados en este proceso, dentro de su diversidad, en su gran mayoría han mostrado ser igualmente universales (Tully *et al.* 1994; Abel & Kandel 1998; Tully 1998; Alberini 1999; Müller 2000; Menzel 2001; Maldonado 2002).

Hoy se conoce toda una serie de eventos moleculares que ocurren en las sinapsis, y que también involucran a los núcleos de estas neuronas, al momento de la formación y consolidación de la memoria. Algunos de estos eventos descritos involucran distintos receptores de membrana, señalizaciones mediadas por calcio, AMPc, cascadas de quinasas y activación de factores de transcripción, culminando con la expresión de distintos genes (Huang & Kandel 1995; Dudai 1996; Bernabeu *et al.* 1997; Abel *et al.* 1998; Schafe *et al.* 1999; McGaugh 2000; Locatelli *et al.* 2002). El más universal de los eventos moleculares descritos en la consolidación de la memoria es sin duda la síntesis proteica (Agranoff *et al.* 1965; McGaugh & Alpern 1966; Pedreira *et al.* 1995; Pedreira *et al.* 1996; McGaugh 2000; Dudai 2004).

De este modo, al referirse a una memoria de largo término, generalmente se hace alusión a una memoria que perdura al menos 24 horas, y depende para su establecimiento de la síntesis proteica, entre otros eventos moleculares. En cambio, por una memoria de corto término se entiende una memoria que no perdura más que unas pocas horas y es independiente de la síntesis proteica.

Esta universalidad trae consigo importantes implicancias. A lo largo de la evolución, parecen haberse seleccionado siempre los mismos mecanismos básicos de la memoria, independientemente del grado de complejidad del sistema nervioso en las distintas especies. Por lo tanto, la gran diversidad de tipos y capacidades de memoria que conocemos reside a nivel de las propiedades emergentes del sistema y no a nivel de los mecanismos básicos celulares y moleculares que lo conforman (Maldonado 2002). Esta afirmación destaca la utilidad de los sistemas simples, como la mayoría de los invertebrados, para el estudio de los

distintos procesos implicados en la formación y consolidación de la memoria.

Es necesario aclarar que en la literatura el término *consolidación* no sólo es usado para referirse al fenómeno que estamos describiendo, por el cual una memoria es estabilizada durante un período de unas pocas horas. En algunas memorias particulares se ha observado que durante un período post-adquisición del orden de las semanas, se produce una transferencia de la memoria desde circuitos en donde reside inicialmente hacia circuitos localizados en regiones distintas del cerebro, en particular desde el hipocampo hacia la corteza (e.g. Debiec *et al.* 2002). Se ha propuesto que este proceso representa una estabilización ulterior que ocurre en estas memorias, por lo que también es llamado *consolidación*, aunque para diferenciarlo del proceso anterior, en este caso se hace referencia a *consolidación de sistemas* (Debiec *et al.* 2002; Dudai 2004), mientras que el primero es diferenciado llamándolo *consolidación sináptica* (Dudai 2004) o *consolidación celular* (Debiec *et al.* 2002). En este trabajo, al referirnos a la consolidación y la estabilización a largo término de la memoria, haremos alusión en todos los casos a la consolidación sináptica.

3 - Reconsolidación de la memoria

Hacia fines de los años '60, esta visión dominante de la dinámica de almacenamiento de la memoria en la que ésta avanza indefectiblemente hacia un estado de progresiva estabilización, comenzó a ser desafiada por los resultados de distintos trabajos. Estos trabajos mostraban que al presentar a animales con una memoria previamente consolidada una experiencia relacionada con el aprendizaje original, i.e., un *recordatorio* del entrenamiento, se producía un retorno de esta memoria al estado lábil, con lo que podía ser vulnerada nuevamente mediante los mismos agentes amnésicos que disrumpían la consolidación, tras la adquisición de la memoria. Se mostró asimismo que tras esta *re-labilización*, la memoria debía atravesar un nuevo período de consolidación, o *reconsolidación*, para poder permanecer nuevamente a largo término (Misanin *et al.* 1968).

Estos resultados experimentales cuestionaban de este modo uno de los postulados principales de la teoría de la consolidación: su dinámica. Así, la consolidación no tendría lugar una única vez, tras la adquisición de la memoria, sino que podría ocurrir múltiples veces.

En base a estos hallazgos, Donald Lewis (1979) formuló una teoría según la cual la memoria no seguiría una dinámica unidireccional, desde un estado inicial lábil hacia un estado final consolidado, como una función del tiempo, sino que tendría una dinámica bidireccional, pudiendo pasar también del estado consolidado al estado lábil, como una función de la actividad mnésica. Así, Lewis hizo hincapié, más que en la existencia de distintos estadios sucesivos de la memoria, en la existencia de distintos *estados*. Distinguió entonces un estado *activo*, en el que la memoria se encontraba lábil y por lo tanto sensible a agentes amnésicos, y un estado *inactivo*, estable, en el que la memoria era resistente a dichos agentes (Fig. **I.2**).

A pesar de lo revolucionario del descubrimiento y de su importancia tanto teórica como clínica, (Sara 2000a; Nader *et al.* 2000b; Dudai 2002a, 2004), por distintos motivos relacionados en parte

con la poca especificidad de los agentes amnésicos aplicados entonces, y también por la fuerza del dogma establecido, estos trabajos y muchos otros que les siguieron fueron mayormente ignorados durante las siguientes tres décadas, y con ello, la hipótesis de una re-labilización o *reactivación* de la memoria consolidada fue relegada.

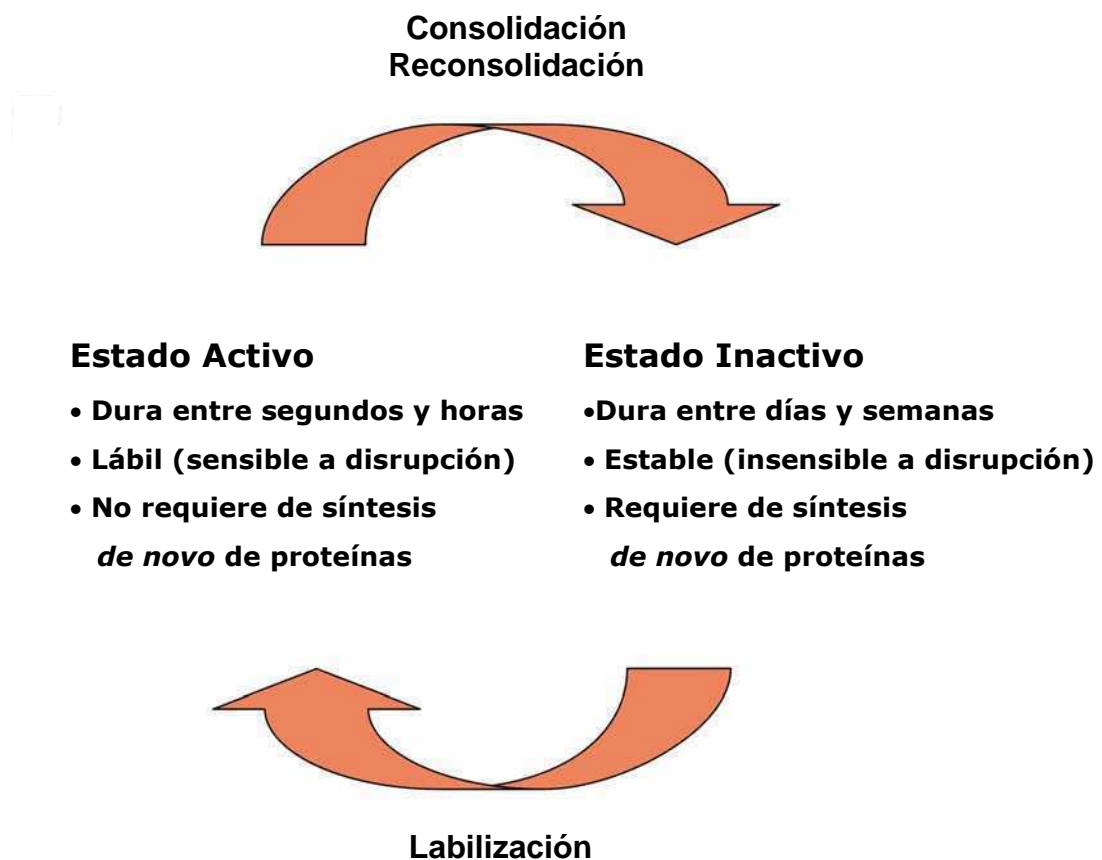


Figura I.2: Modelo de una memorias con dos posibles estados. El estado activo y el estado inactivo son análogos a la memoria de corto término y la memoria de largo término, respectivamente. De acuerdo a este modelo, una memoria puede tener una dinámica bidireccional, pasando de un estado a otro en función de la actividad mnésica.

Adaptado de Nader 2003.

Entre las objeciones experimentales, se encuentran algunos resultados contradiciendo los hallazgos originales (Dawson & McGaugh 1969; Squire *et al.* 1976), o resultados mostrando sólo una amnesia transitoria (Mactutus *et al.* 1979). Éste es el caso de la *recuperación espontánea* de la memoria, fenómeno que a veces se encuentra pasado cierto tiempo tras la presentación del recordatorio y la intervención amnésica. Se ha observado en algunos casos que, si se interfiere con una memoria durante su reconsolidación y se la evalúa un día después de la intervención, ésta muestra un efecto amnésico; pero si, en cambio, se la evalúa dos o más días después, se evidencia una recuperación de la respuesta condicionada (retención de la memoria). Entonces, la objeción está fundamentada en que si eventualmente se logra evidenciar retención, la amnesia observada en un primer momento no sería producto de una verdadera pérdida de la memoria (a causa de una reconsolidación impedida) sino de un efecto transitorio, probablemente sobre su expresión (Miller & Matzel 2000; Nadel & Land 2000; Dudai 2002b). Este argumento parece bastante contundente; sin embargo, resultados similares se han obtenido también al impedir la consolidación original de la memoria, tras su adquisición, y han sido frecuentemente atribuidos a un efecto parcial de la interferencia (Lewis *et al.* 1968; Quartermain *et al.* 1972; Miller *et al.* 1974). Posteriormente, con la proliferación de estudios sobre los mecanismos de la extinción de la memoria, distintos trabajos comenzaron a observar también que la presentación de un CS no reforzado, *per se* un recordatorio del entrenamiento, en lugar de inducir la labilización de la memoria original inducía sólo su extinción, y distintos agentes amnésicos en lugar de impedir la reconsolidación impedían la consolidación de la extinción, produciendo a nivel comportamental un resultado opuesto al postulado por la hipótesis de la reconsolidación (Berman & Dudai 2001; Vianna *et al.* 2001).

Por su parte, la principal objeción teórica a la hipótesis de la reconsolidación reside en el desconcertante sentido biológico y valor adaptativo del regreso de una memoria consolidada al estado lábil por

su mera evocación, producto de un recordatorio. Esta labilización no sólo implica que la memoria vuelve a ser transitoriamente vulnerable, poniéndose en riesgo ante potenciales interferencias, sino que además, por el simple hecho cotidiano de ser evocada, requiere una nueva inversión energética incluyendo transcripción génica y síntesis proteica para su reconsolidación y re-estabilización en el sistema nervioso.

No obstante esta escasa aceptación inicial de la hipótesis de la reconsolidación, durante los años siguientes numerosos trabajos continuaron desarrollándose dentro de este marco teórico alternativo como una corriente marginal, sin ser tenida en cuenta por el grueso de la comunidad científica de este campo (Lewis *et al.* 1972; Lewis & Bregman 1973; Mactutus *et al.* 1979; Judge & Quartermain 1982; Richardson *et al.* 1982; Bucherelli & Tassoni 1992). Entre otros se destacan los de Susan Sara, quien caracterizó varios de los eventos moleculares involucrados en los mecanismos de la reconsolidación de la memoria. Con sus trabajos, Sara mostró en distintos modelos de memoria con roedores, apetitivos y aversivos, que la presentación de un recordatorio labilizaba la memoria consolidada, y que la memoria podía ser impedida tras su labilización mediante la administración antagonistas específicos de receptores NMDA, y antagonistas de receptores beta-adrenérgicos (Przybylski & Sara 1997; Przybylski *et al.* 1999; Sara 2000a). De este modo, comenzó a evidenciarse por un lado una recurrencia en la reconsolidación de la memoria de distintos eventos que tienen lugar durante la consolidación original, como la participación de determinados receptores, moduladores y vías de señalización (Przybylski & Sara 1997; Rouillet & Sara 1998; Przybylski *et al.* 1999; Sara *et al.* 1999; Kelly *et al.* 2003). Por otro lado, comenzó a vislumbrarse con estos trabajos un posible valor adaptativo del fenómeno de reconsolidación de la memoria: al labilizarse la memoria por algún estímulo relacionado, ésta volvería a ser susceptible a la acción de moduladores u otros agentes endógenos, pudiendo la vieja memoria cobrar un nuevo valor o

significado dependiendo del nuevo contexto cognitivo en el que fue labilizada. Del mismo modo, se propuso que el sistema permitiría la integración de terceros estímulos en el contexto de una vieja memoria, mediante este proceso de labilización y reconsolidación (Sara 2000a; Nader *et al.* 2000b; Sara 2000b; Dudai 2002b).

Estos postulados constituyeron entonces una formulación más completa y revisada de la teoría de la reconsolidación de la memoria, allanando el camino hacia su aceptación.

Como consecuencia de la acumulación de varios trabajos influyentes, y en particular gracias al alto impacto de una publicación de Nader *et al.* (2000a), el tema cobró un renovado interés y la hipótesis de la reconsolidación comenzó a ser revisada en forma generalizada. En ese trabajo se realizaron experimentos con roedores como los que originalmente mostraron esta labilización de la memoria consolidada, pero con la diferencia de que las intervenciones que actuaban como agentes amnésicos eran ahora mucho más específicas: en los trabajos originales el tratamiento aplicado, sistémico e inespecífico, consistía típicamente en la aplicación de un shock electroconvulsivo (Misanin *et al.* 1968; Lewis *et al.* 1972), o de hipotermia (Mactutus *et al.* 1979; Richardson *et al.* 1982), mientras que en estos nuevos estudios se aplicaba una infusión de anisomicina, un inhibidor de la síntesis proteica, directamente dirigida a la amígdala, es decir, a circuitos del cerebro ahora identificados como sitio de formación de esa memoria en particular (Phillips & LeDoux 1992). Al igual que los trabajos originales, estos experimentos mostraron que el efecto amnésico logrado sobre la vieja memoria consolidada, dependía de su labilización previa por la presentación de un recordatorio del entrenamiento.

Con esta publicación, ha comenzado entonces una nueva ola de trabajos estudiando el fenómeno de la reconsolidación de la memoria y sus mecanismos en distintos modelos animales y paradigmas comportamentales (e.g. Taubenfeld *et al.* 2001; Debiec *et al.* 2002; Kida *et al.* 2002; Pedreira *et al.* 2002; Tronel & Sara 2002; Child *et al.*

2003; Eisenberg *et al.* 2003; Kelly *et al.* 2003; Sangha *et al.* 2003; Boccia *et al.* 2004; Morris *et al.* 2006; Rossato *et al.* 2006), que en la última década ha producido un conocimiento sustancial de diversos mecanismos moleculares y neurofisiológicos involucrados en este fenómeno de re-estabilización de la memoria, comenzando a establecerse un nuevo marco teórico de la dinámica del almacenamiento de la memoria.

Los estudios de los mecanismos moleculares que subyacen este proceso, como hemos mencionado, han mostrado en muchos casos un alto grado de solapamiento con los que subyacen la consolidación, insinuando una suerte de recapitulación de eventos moleculares, como activación de receptores, cascadas de señalización, factores de transcripción, expresión génica y síntesis de proteínas, específicos y comunes a ambos procesos (Sara 2000a; Nader 2003). En particular, al igual que en la consolidación, la síntesis proteica ha mostrado ser un requerimiento ubicuo para la reconsolidación de las memorias (Fig. **I.2**) (Judge & Quartermain 1982; Taubenfeld *et al.* 2001; Kida *et al.* 2002; Pedreira *et al.* 2002; Child *et al.* 2003). No obstante, en otros casos también se han encontrado diferencias, en los eventos moleculares que participan en la reconsolidación (Taubenfeld *et al.* 2001; Lee *et al.* 2004), o en el grado en que estos son requeridos (Debiec *et al.* 2002), o en las regiones del cerebro en las que son necesarios (Bahar *et al.* 2004), o en su ventana temporal de acción (Mactutus *et al.* 1979; Judge & Quartermain 1982).

Un fenómeno de importancia central en este proceso de reconsolidación es la desestabilización de la memoria previamente consolidada. Hasta hace pocos años se desconocía completamente los mecanismos moleculares que subyacen este fenómeno, por lo que esta labilización de la memoria era postulada meramente como una condición lógica necesaria, evidenciada por el efecto amnésico de disrumpir la reconsolidación. Sólo recientemente comenzaron a revelarse algunos de los mecanismos involucrados en este proceso,

como la ubiquitinación de proteínas post-sinápticas y el requerimiento de la actividad del proteasoma (Lee *et al.* 2008), evidenciando que la labilización constituiría un proceso de activa degradación de proteínas. Si bien no se conoce el curso temporal del proceso de labilización, ni la naturaleza de su acoplamiento con los procesos funcionales a la re-estabilización de la memoria, la reconsolidación, en el trabajo citado se mostró que hay procesos de ubiquitinación y degradación durante al menos 1 – 2 h después de la presentación del recordatorio. Por lo tanto, aunque como condición lógica la labilización podría postularse como un evento previo a la reconsolidación, es posible que ambos procesos tengan cierto grado de solapamiento.

4 - Extinción de la memoria

Un fenómeno mnésico relacionado con la reconsolidación de la memoria es la *extinción*. Se conoce como extinción de la memoria al proceso por el cual una respuesta condicionada decae en su frecuencia o intensidad por la presentación repetida del estímulo condicionado (CS) sin el refuerzo, o estímulo incondicionado (US) (Pavlov 1927; Falls *et al.* 1992; Rescorla 2001; Santini *et al.* 2001; Myers & Davis 2002). Mientras que algunos autores han propuesto que la extinción estaría dada por una destrucción o borrado de la asociación original «CS-US» (Rescorla & Wagner 1972; McClelland 1985), hoy la visión más extendida del fenómeno propone que la extinción no consistiría en una pérdida, u “olvido”, de esta asociación original, sino en una nueva asociación «CS-no US», adquirida como consecuencia de la exposición al CS sin reforzar, y que comienza a controlar el comportamiento (Brooks & Bouton 1994; Myers & Davis 2002). En otras palabras, no se trataría de un *desaprendizaje* sino de un *reaprendizaje*, producto de una nueva experiencia. Esta “persistencia silenciosa” de la memoria original puede evidenciarse por distintos fenómenos comportamentales, considerados características diagnósticas inherentes a la extinción (Bouton 2002; Myers & Davis 2002):

- (a) Recuperación espontánea: la respuesta condicionada original puede recuperarse pasado cierto tiempo desde que la extinción tuvo lugar.
- (b) Readquisición y ahorro (*saving*): al repetir el entrenamiento original después de haber extinguido la memoria (re-entrenamiento), ésta requiere para volver a expresarse una menor cantidad de ensayos que los requeridos originalmente (“ahorro” de entrenamiento), evidenciando entonces una facilitación del aprendizaje producto de una persistencia en el sistema de esta memoria original tras la extinción.

- (c) Reinstalación (*reinstatement*): tras la extinción, la respuesta condicionada original puede recuperarse o ser *reinstalada* por la presentación del US solo, que, dado que no está acompañado por el CS, no tiene ningún valor asociativo. Es decir, no opera como un re-entrenamiento.
- (d) Renovación (*renewal*): la respuesta condicionada original puede recuperarse si la memoria es evaluada en un contexto distinto al de su extinción.

Si se considera los momentos de entrenamiento o evaluación, como distintos *contextos temporales*, este último aspecto puede explicar también la recuperación espontánea (Bouton 1988, 1993, 2002).

Por otro lado, si se impide selectivamente la consolidación de la memoria de extinción, sin afectar su adquisición, mediante la administración de agentes amnésicos como los ya descritos, al evaluar la memoria comportamentalmente se observa una retención de la memoria original (Falls *et al.* 1992; Pedreira & Maldonado 2003). Este hecho provee evidencias de que, a pesar de la adquisición de la memoria de extinción, la memoria original permanece intacta.

A nivel de mecanismos celulares y moleculares, la formación de la memoria de extinción y su consolidación son fenómenos menos estudiados que los de la adquisición y consolidación de la memoria original. No obstante, varios trabajos han mostrado ciertas coincidencias en los eventos celulares y moleculares que subyacen estos dos procesos (e.g. Lu *et al.* 2001; Santini *et al.* 2001), lo que es coherente con el concepto de que la extinción es un nuevo aprendizaje asociativo (Pavlov 1927; Berman & Dudai 2001; Myers & Davis 2002). No obstante el hecho de que a pesar de la extinción la vieja memoria CS-US permanece intacta aunque sin expresarse, algunos trabajos en los que se estudian los mecanismos de la extinción han mostrado que ocurrirían

eventos moleculares antagónicos a los que ocurren durante la adquisición y consolidación de la memoria CS-US, como la despotenciación sináptica y la activación de fosfatasa, compatibles con una visión de un desaprendizaje (Lin *et al.* 2003a; Lin *et al.* 2003b; Lin *et al.* 2003c). Otros autores han propuesto que la ocurrencia de estos fenómenos tipo-desaprendizaje podría depender del momento en que tiene lugar la presentación del CS no reforzado, i.e., el entrenamiento de extinción, respecto del entrenamiento CS-US, postulando que una extinción temprana, durante o cercana a la consolidación de la memoria CS-US, podría involucrar este tipo de fenómenos (Myers *et al.* 2006).

5 - Modelo experimental:

Paradigma de Memoria contexto-señal en el cangrejo

El modelo de memoria del cangrejo *Chasmagnathus* se basa en un aprendizaje asociativo de miedo al contexto, en el que los animales relacionan un estímulo visual de peligro (EVP) con el contexto en el que éste les es presentado (Maldonado 2002). Ante el EVP, una figura que se desplaza por encima del individuo, los animales presentan inicialmente una robusta respuesta de escape. La presentación repetida del EVP, típicamente en un entrenamiento de 15 ensayos con un intervalo entre ensayos (ITI) de 3 min, produce un decremento de esta respuesta de escape, que es sustituida por una respuesta de congelamiento (*freezing*) al pasaje del EVP, un tipo de respuesta defensiva cualitativamente distinto. Este decremento en la respuesta de escape, que puede ser cuantificado, persiste al menos una semana y provee una herramienta de detección de la retención de esta memoria de largo término. De esta forma, cuando en la evaluación la comparación estadística de la respuesta de animales entrenados (sometidos al pasaje repetido de la figura), con la de animales controles no entrenados (que están siendo enfrentados a la figura por primera vez), revela diferencias significativas, definimos operacionalmente que existe una retención de la memoria del entrenamiento (Fig. **1.3**).

Esta memoria es llamada “memoria contexto-señal” (MCS), ya que en el entrenamiento los cangrejos asocian el EVP (la señal) al contexto del entrenamiento. Esta asociación se evidencia cuando, al evaluar la memoria, sólo se observa retención si la evaluación se lleva a cabo en el mismo contexto espacial del entrenamiento. Al evaluar los animales en un contexto distinto, estos responden al EVP del mismo modo que los animales no entrenados, es decir que no muestran retención. De esta forma, como en cualquier condicionamiento de miedo al contexto, en este paradigma de memoria el contexto del entrenamiento opera como CS, y es asociado al EVP, que opera como refuerzo (US). Otras características diagnósticas del carácter asociativo

de esta memoria son la inhibición latente por pre-exposición al contexto del entrenamiento, y la extinción por re-exposición a este contexto (Tomsic *et al.* 1998).

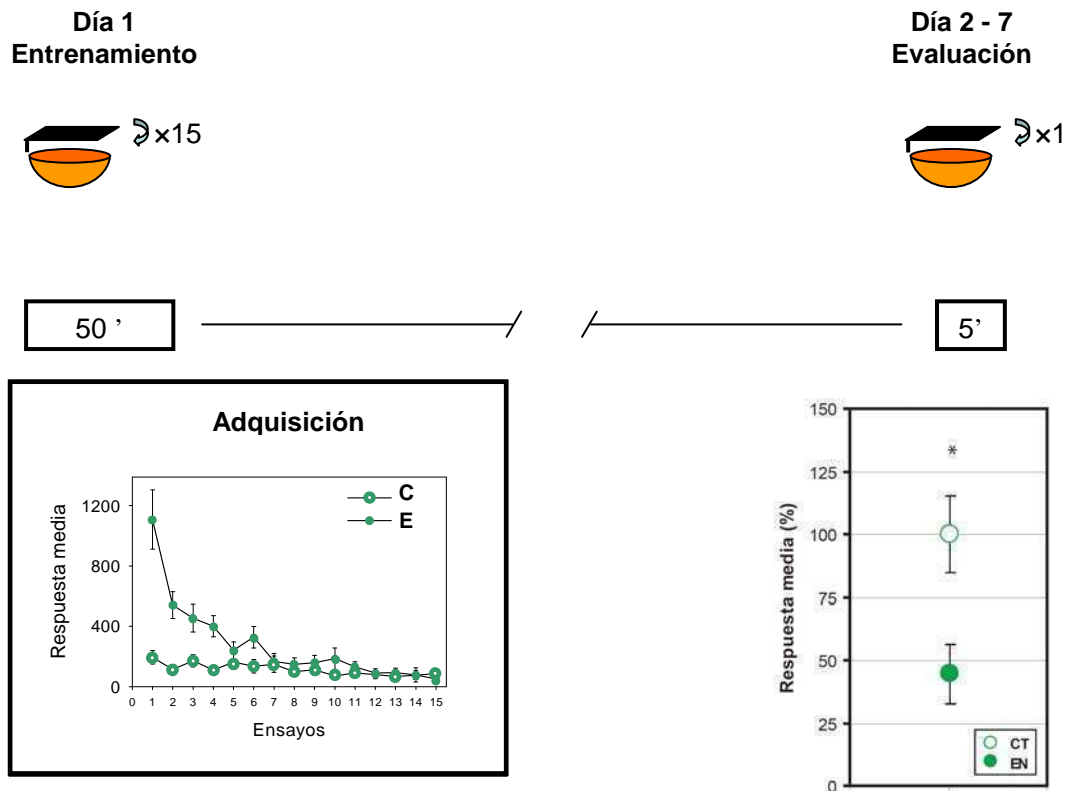


Figura I.3: Protocolo de entrenamiento y evaluación de largo término. Los rectángulos abiertos representan los períodos de exposición al contexto y sus duraciones, durante las sesiones de entrenamiento, y evaluación. El bol naranja representa el actómetro (contexto de entrenamiento, CS). La figura negra representa la presencia del EVP (US), indicándose el número de ensayos, durante las sesiones de entrenamiento y evaluación. Abajo se observan típicas curvas de adquisición de esta memoria, y nivel de respuesta de grupos control no entrenados (CT) vs entrenados (EN). Para una descripción detallada, ver Materiales y Métodos.

Es necesario remarcar que en este paradigma no se mide la respuesta que los animales muestran al CS, el contexto, sino que la respuesta medida en la evaluación es la que los cangrejos ejecutan ante el pasaje del US, el EVP. En este sentido, el paradigma es de algún

modo similar al paradigma de potenciación del sobresalto por miedo (*fear potentiated startle*) en roedores (Lin *et al.* 2001; Myers *et al.* 2006), en el que no se mide la respuesta comportamental al CS (luz), sino a un estímulo aversivo en presencia del CS.

Este modelo de memoria contexto-señal ha sido extensamente estudiado y caracterizado en nuestro laboratorio. La consolidación de la MCS está mediada por receptores glutamatérgicos tipo NMDA (Troncoso & Maldonado 2002), la vía de señalización del AMPc y PKA (Romano *et al.* 1996a; Romano *et al.* 1996b; Locatelli *et al.* 2001; Locatelli *et al.* 2002), MAPKs (Feld *et al.* 2005), IKK (Merlo *et al.* 2002) el factor de transcripción NF- κ B (Freudenthal *et al.* 1998; Freudenthal & Romano 2000) y requiere de la síntesis *de novo* de proteínas (Pedreira *et al.* 1995; Pedreira *et al.* 1996; Hermitte *et al.* 1999). Además, es modulada por angiotensinas (Delorenzi *et al.* 1996; Delorenzi *et al.* 2000) y acetilcolina (Beron de Astrada & Maldonado 1999). Por su parte, una re-exposición breve (5 min) al contexto del entrenamiento induce la labilización y reconsolidación de esta memoria, y este proceso depende de la actividad de receptores tipo-NMDA, y de la síntesis proteica (Pedreira *et al.* 2002). Por último, la extinción de esta memoria puede ser lograda por una re-exposición al contexto del entrenamiento sin reforzar de al menos 1 h de duración (Tomsic *et al.* 1998; Pedreira & Maldonado 2003), y esta extinción cumple con distintas características diagnósticas del fenómeno, como recuperación espontánea y reinstalación por presentación de un refuerzo no asociado al contexto (Merlo & Romano 2008; Hepp *et al.* 2010).

6 – Relación Reconsolidación-Extinción

La reconsolidación y la extinción de la memoria son dos procesos mnésicos basados en mecanismos muy distintos, pero que a su vez guardan una estrecha relación funcional.

Como vimos anteriormente, la reconsolidación de la memoria involucra una desestabilización (labilización) y la re-estabilización subsiguiente de la vieja memoria consolidada, la memoria CS-US (Nader *et al.* 2000a; Sara 2000a). Por su parte, la extinción de la memoria está dada por la formación de una nueva memoria que inhibe transitoriamente la expresión de la memoria original, pero sin disrumpirla. Es decir que, aunque transitoriamente no se exprese, la vieja memoria eventualmente re-emerge (Pavlov 1927; Myers & Davis 2002).

A pesar de involucrar mecanismos distintos la reconsolidación y la extinción son procesos funcionalmente relacionados, dado que ambos están involucrados en el procesamiento y almacenamiento de nueva información relacionada con un aprendizaje anterior. En el caso de la reconsolidación, se ha mostrado que el fenómeno es inducido por la presentación de un estímulo que actúa como recordatorio del aprendizaje anterior, y se ha propuesto que esto sería funcional a la actualización de memorias previamente adquiridas y consolidadas (Nader *et al.* 2000a; Sara 2000b). En el caso de la extinción, mediante este proceso la expresión de un condicionamiento es inhibida como consecuencia de la presentación del estímulo condicionado sin reforzar. Por lo tanto, ambos procesos requieren para su inducción la presentación de un estímulo relacionado con la experiencia anterior. Y existe un estímulo en particular que relaciona a ambos procesos: el estímulo condicionado (CS).

Precisamente, esta particularidad fue objeto de un intenso debate hasta hace algunos años, en el marco de la discusión general de la hipótesis de la reconsolidación de la memoria. Como mencionamos anteriormente, uno de los puntos de desencuentro entre los distintos

grupos estudiando la potencialidad de una memoria consolidada de retornar al estado lábil, fue el efecto que la presentación de un CS no reforzado tenía sobre la memoria previamente consolidada. Mientras que algunos grupos encontraban que la re-exposición al CS, operativamente un ensayo de extinción, actuaba como recordatorio induciendo la labilización y reconsolidación de la memoria (Przybylski & Sara 1997; Nader *et al.* 2000a), otros grupos, muchas veces trabajando en otros modelos experimentales u otros paradigmas de memoria, encontraban que, en concordancia con la visión clásica, el CS inducía la extinción de la memoria sin labilizar la traza original (Berman & Dudai 2001; Vianna *et al.* 2001). Este último resultado experimental era interpretado como un rechazo a la hipótesis de la reconsolidación.

En 2003 esta discusión comenzó a ser zanjada cuando un trabajo de nuestro laboratorio demostró por primera vez que, en un mismo paradigma comportamental, un CS no reforzado tiene la capacidad de inducir reconsolidación o extinción de la memoria dependiendo de una característica paramétrica: su duración (Pedreira & Maldonado 2003). En este trabajo, se mostró que una re-exposición al contexto del entrenamiento (el CS) durante un período de tiempo corto (<1 hora) inducía en la memoria un estado de labilidad transiente, expresado como una sensibilidad a la cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis proteica, pero si la re-exposición era más larga (>1 hora) la vieja memoria permanecía consolidada y se inducía su extinción.

En términos experimentales, lo que se observó es que una inyección de CHX tiene la capacidad de disrumpir la vieja memoria (CS-US) o la nueva memoria de extinción (CS-no US) en función de la duración de la re-exposición (Fig. **I.4**). Estos resultados mostraron que la inducción de extinción (y ausencia de reconsolidación) encontrada muchas veces como consecuencia de la presentación de un CS, no era necesariamente un rechazo a la hipótesis de la reconsolidación, sino

más bien una consecuencia de particularidades paramétricas de un fenómeno más complejo.

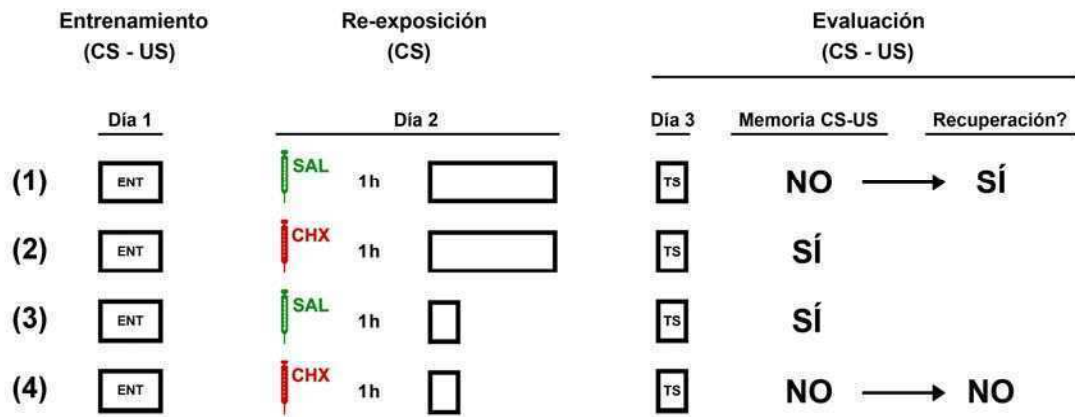


Figura I.4: Extinción y reconsolidación de la memoria contexto-señal en el cangrejo.

Una re-exposición de larga duración al contexto del entrenamiento (CS) induce extinción de la memoria CS-US (1) mientras que una re-exposición corta no (3). La administración de cicloheximida bloquea la consolidación de la extinción tras una re-exposición larga, descubriendo intacta a la vieja memoria (2), pero bloquea la reconsolidación de la vieja memoria cuando la re-exposición es corta (4). Evaluaciones posteriores (e.g. Día 4 ó 5) muestran que la memoria CS-US se recupera sólo en los casos en que fue extinguida (1). (Pedreira & Maldonado 2003; Merlo & Romano 2008; Hepp *et al.* 2010). Los rectángulos vacíos indican cierto tiempo de exposición al contexto. ENT: entrenamiento, TS: evaluación, SAL: salina, CHX: cicloheximida.

En poco tiempo, este hallazgo realizado en cangrejos recibió un gran apoyo al ser replicado por distintos laboratorios en una variedad de modelos experimentales en vertebrados, desde peces hasta roedores (Eisenberg *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2004; Lee *et al.* 2006), demostrando que se trata de un mecanismo mnésico evolutivamente conservado. Si bien este fenómeno se evidenció en paradigmas muy

diversos con protocolos variados, el común denominador en todos los casos fue que siempre que el CS se presentó con una duración o iteración insuficiente para inducir una extinción significativa a largo término, el proceso inducido fue la labilización y reconsolidación de la memoria original. Por el contrario, presentando el CS con duraciones o repeticiones suficientes para inducir extinción de largo término, la vieja memoria permaneció siempre consolidada.

Dada esta capacidad del CS de inducir tanto la reconsolidación como la extinción de la memoria, surgen algunas preguntas de particular interés para comprender cómo se relacionan estos dos procesos, y por qué ante la presencia de nueva información relacionada con una memoria preexistente el sistema opta por uno u otro proceso.

El primer interrogante que surge es si reconsolidación y extinción son dos procesos independientes o, por el contrario, están vinculados de algún modo. De los resultados mencionados se desprende que cuando un CS de corta duración induce labilización y reconsolidación la memoria no resulta extinguida. Y, recíprocamente, cuando un CS de larga duración induce la extinción de la memoria CS-US, ésta última, aunque no se expresa, permanece intacta y consolidada. Es decir que, o bien se induce un proceso, o bien se induce el otro. En otras palabras, reconsolidación y extinción aparecen como procesos mutuamente excluyentes, lo que sugiere que podría haber algún tipo de interacción entre estos procesos, o al menos algún mecanismo que los vincula.

Estas consideraciones llevaron a plantear en el cangrejo la hipótesis de un mecanismo mnésico tipo *switch* que, tras computada la duración del CS, lleva a la memoria hacia su labilización y reconsolidación, o hacia su extinción (Pedreira & Maldonado 2003). Planteado este mecanismo, surgen las preguntas de cuáles son los estímulos que inciden en esta “decisión” del sistema por uno u otro proceso mnésico, y en qué momento opera este mecanismo.

Abordaremos primero la segunda cuestión, acerca de cuándo ocurriría este mecanismo de decisión, para luego considerar qué estímulos ocurren con anterioridad a este momento. La hipótesis planteada, al proponer que se requiere el cómputo de la duración del CS, lleva implícita la visión de que el switch no ocurre *durante* la re-exposición al contexto sino recién una vez que ésta ha finalizado, con la remoción de los animales. Es decir, tanto la labilización y reconsolidación como la extinción no ocurrirían durante la re-exposición sino que recién serían inducidas una vez finalizada la re-exposición. Esta asunción está basada en el siguiente razonamiento. Si se sostuviera el argumento opuesto, es decir que al presentar una re-exposición corta la memoria se labiliza *durante* la re-exposición, sería necesario considerar que lo mismo ocurre al inicio de una re-exposición larga, dado que inicialmente ambas experiencias son idénticas. Sin embargo, la administración de CHX previo a una re-exposición larga bloquea la consolidación de la extinción inducida por esta re-exposición, pero no es capaz de afectar la memoria original. Es decir, 24 horas después la memoria original emerge intacta, evidenciando que en todo momento permaneció consolidada (Pedreira & Maldonado 2003) (Fig. **I.4**). Por otra parte, en lo que a la extinción respecta, también existen antecedentes de nuestro laboratorio que sugieren que la extinción no se dispararía durante el período de re-exposición. En estos trabajos previos se observó que no se evidencia extinción de la memoria si se evalúa a los animales antes de ser retirados del contexto tras una re-exposición larga, incluso de 12 ó 24 horas de duración (Lozada *et al.* 1990; Tomsic *et al.* 1998). Estos antecedentes por lo tanto apoyan la hipótesis de que *durante* la re-exposición al contexto no se dispara ninguno de los dos procesos. Bajo esta hipótesis, es necesario entonces considerar a la re-exposición al contexto como un período de tiempo durante el que se crean las condiciones necesarias para la subsiguiente inducción de la labilización y reconsolidación o de la extinción de la memoria, tras el fin de la re-exposición.

Dado que este switch ocurriría recién tras el fin de la re-exposición al contexto, nos preguntamos entonces qué procesos ocurren previo a este momento, es decir durante la re-exposición, de los que podría depender la inducción de la reconsolidación o de la extinción. Un proceso que tiene lugar durante la re-exposición es la evocación de la memoria CS-US. Las distintas características diagnósticas del carácter asociativo de esta memoria evidencian que los animales la evocan al ser re-expuestos al contexto del aprendizaje, el CS (Dudai 2002b). En este paradigma de memoria, podemos citar entre estas características diagnósticas la contexto-especificidad en la evaluación, la inhibición latente por pre-exposición al contexto y, por supuesto, la extinción por re-exposición al contexto (Tomsic *et al.* 1998; Pedreira & Maldonado 2003). Por otra parte, sabemos que la evocación de la memoria es un evento necesario tanto para su labilización y reconsolidación, como para su extinción, ya que sin re-exposición al contexto ninguno de estos procesos puede ocurrir (Pedreira *et al.* 2002; Pedreira & Maldonado 2003). De hecho, es la evocación de una memoria en particular la que determina la especificidad del proceso mnésico inducido. Así, al presentar un recordatorio que induce reconsolidación e inyectar un agente amnésico como los inhibidores de la síntesis proteica sólo la memoria evocada resulta disrumpida, mientras que memorias no relacionadas con el recordatorio son preservadas (Nader *et al.* 2000a; Debiec *et al.* 2002; Debiec *et al.* 2006). En resumen, con la re-exposición al contexto la memoria CS-US es evocada, y esta evocación es necesaria tanto para la labilización y reconsolidación como para la extinción de esta memoria.

Distintos trabajos en la literatura han propuesto que la memoria resulta labilizada y reconsolidada como consecuencia de su evocación durante el recordatorio (Nader *et al.* 2000a; Sara 2000b). Sin embargo, como mencionamos antes, durante un entrenamiento de extinción la memoria CS-US permanece todo el tiempo consolidada, a pesar de ser evocada. Esto implica que aunque la evocación de la memoria es necesaria, no bastaría para inducir su labilización y reconsolidación. En

otras palabras, la evocación de la memoria aparece como una condición necesaria pero no suficiente para inducir la labilización y reconsolidación. Lo mismo podemos afirmar acerca de la extinción, ya que se requiere que la memoria sea evocada mediante la re-exposición al CS pero esto no es condición suficiente. Por el contrario, existen determinados factores que previenen la extinción, como por ejemplo el refuerzo (Pavlov 1927). Por consiguiente, la evocación de una memoria sería un proceso necesario pero no suficiente tanto para su labilización y reconsolidación como para su extinción.

Recapitulando, la reconsolidación y la extinción en el cangrejo requerirían (a) una fase inicial de evocación de la memoria que ocurre como consecuencia de la re-exposición al CS, (b) un evento que actuaría como disparador de uno u otro proceso (hipotéticamente, el fin del CS), y (c) una fase de (re)estabilización de la traza mnésica mediante una serie de eventos moleculares que incluyen a la síntesis de proteínas. En el caso de la reconsolidación, esta fase produce la re-estabilización de la traza original (CS-US), y en el caso de la extinción, la estabilización de la nueva traza (CS-no US).

El rol de la evocación en el proceso de reconsolidación de la memoria tiene por lo tanto una importancia central para la comprensión de la funcionalidad de este fenómeno, que sigue siendo objeto de intenso debate. Como hemos visto, la reconsolidación parece ser un proceso mnésico evolutivamente conservado, y parece haber también cierta universalidad respecto de los tipos de memoria susceptibles de sufrir este proceso (Alberini 2005; Lee 2009). Sin embargo, uno de los puntos más discutibles acerca de la funcionalidad de este proceso es la proposición de que cada vez que una memoria consolidada es evocada debe atravesar un nuevo episodio de reconsolidación (Debiec *et al.* 2002). Por esto, resulta de gran interés el estudio de las condiciones paramétricas para la inducción de este proceso mnésico, lo que contribuiría a la comprensión de su valor funcional.

Otro aspecto de interés respecto de la reconsolidación y la extinción de la memoria es el mecanismo hipotético que vincularía a ambos procesos. El hecho de que la reconsolidación y la extinción y su consolidación requieran de algunos eventos moleculares en común, inherentes a la (re)estabilización a largo término de las memorias en general, como la biosíntesis de macromoléculas, ha sido propuesto como una posible explicación de la mutua exclusión de estos dos procesos mnésicos, argumentando que esto podría deberse a una competencia por estos mecanismos o por recursos moleculares comunes (Debiec *et al.* 2002; Nader 2003). Resulta por lo tanto de interés el estudio de este mecanismo de mutua exclusión entre reconsolidación y extinción de la memoria, y en particular el estudio de la posibilidad de que ambos procesos puedan bajo alguna condición ocurrir simultáneamente. Esta posibilidad, vedada de acuerdo a la hipótesis de la mutua exclusión, implicaría que la traza de una memoria que está siendo extinguida resulte a su vez labilizada y por lo tanto susceptible de ser modificada.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos

El objetivo general de este trabajo será determinar qué características presentan y cómo se relacionan las distintas fases de los procesos de reconsolidación y de extinción de la memoria contexto-señal en el cangrejo *Chasmagnathus*. En las distintas secciones de esta tesis, estudiaremos las condiciones paramétricas para la ocurrencia de estos dos procesos, y estudiaremos la dinámica de las fases de evocación, labilización y reconsolidación de la memoria CS-US, y las fases de evocación CS-US, extinción, y consolidación de la memoria de extinción. Asimismo, estudiaremos cómo se vinculan los procesos de reconsolidación y extinción.

Para esto, se plantean los siguientes objetivos particulares. En primer lugar, en base a la hipótesis de que la reconsolidación de la memoria sería funcional a la incorporación de información nueva relacionada con la vieja memoria, buscaremos determinar si episodios de evocación de la vieja memoria que no traen nueva información son igualmente capaces de producir la labilización y reconsolidación de la memoria consolidada. En particular, evaluaremos el papel de la inclusión del refuerzo durante el recordatorio, con lo que esta experiencia comportamental confirmaría la relación entre estímulos ocurrida durante el entrenamiento, en lugar de contradecirla. Asimismo, el efecto de la presentación del refuerzo también será explorado en el marco de un entrenamiento de extinción, ya que este efecto nunca ha sido estudiado sobre la memoria de extinción en el cangrejo *Chasmagnathus*.

En segundo lugar, en base a la hipótesis de que reconsolidación y extinción se disparan sólo después de finalizado el CS, se buscará determinar cuánto tiempo después de este evento comportamental la memoria resulta labilizada o extinguida.

Por último, dado que reconsolidación y extinción parecen ser procesos mutuamente excluyentes, se estudiará si esta característica está dada por una eventual interacción de exclusión entre ambos procesos o una restricción intrínseca a estos procesos que impida que ocurran simultáneamente, o si, por el contrario, existe alguna condición bajo la cual una memoria pueda ser reconsolidada y extinguida al mismo tiempo.

Marco teórico e hipótesis de trabajo

En esta tesis estudiaremos la ocurrencia de distintos procesos mnésicos utilizando un abordaje comportamental y farmacológico. El abordaje comportamental implica el análisis de la respuesta de los animales en el marco de un paradigma comportamental, el de la memoria contexto-señal (Maldonado 2002), cuya asunción central es que la experiencia del entrenamiento (CS-US) induce la formación de una memoria o traza mnésica que modifica el comportamiento, y que inicialmente se encuentra en un estado lábil, requiriendo de determinados mecanismos moleculares para persistir a largo término (consolidación). Una vez consolidada, esta traza puede eventualmente regresar al estado de labilidad como consecuencia de ciertas experiencias comportamentales, con lo que requiere nuevamente de determinados procesos moleculares para volver a establecerse a largo término (reconsolidación). Por otra parte, la memoria consolidada es también susceptible de ser extinguida mediante la adquisición de una nueva traza de significado antagónico (CS-no US), que coexiste y compite con la anterior, y que también requiere ser consolidada para establecerse a largo término.

Dado que este trabajo se centra en el estudio de los procesos de reconsolidación de la memoria CS-US, y la adquisición y consolidación de la nueva memoria CS-no US, para determinar la ocurrencia de estos dos procesos mnésicos recurrimos a un abordaje farmacológico, que

consiste en una interferencia en los mecanismos de (re)estabilización de estas trazas, y a la subsiguiente evaluación de los animales con el objeto de determinar la integridad de cada traza mediante la correlación con su expresión comportamental.

Si bien se ha mostrado que los mecanismos moleculares que subyacen la (re)estabilización a largo término de las trazas mnésicas no son necesariamente iguales, estos procesos comparten ciertos eventos moleculares como la síntesis de proteínas durante una ventana temporal del orden de las 4 – 6 h tras la experiencia que los induce. Por esto, solamente a modo operativo, definiremos a la reconsolidación de la memoria CS-US y a la consolidación de la memoria de extinción simplemente como procesos dependientes de la síntesis proteica, y consideraremos que una memoria que se expresa tras una inyección de CHX, no requirió de ninguno de estos procesos durante la ventana de acción de la droga. Por extensión, la labilización de la memoria CS-US queda definida como un proceso que genera a futuro un requerimiento irreversible de síntesis proteica para la persistencia de la memoria a largo término. La calidad de *irreversible* de este requerimiento supone que una vez inducida la labilización la memoria no puede ser re-estabilizada sino por medio de la síntesis proteica (reconsolidación).

Dado que la ocurrencia de los procesos mnésicos definidos siempre se pone de manifiesto mediante la evaluación comportamental de la memoria a largo término, que en este paradigma arroja un resultado de tipo todo-o-nada, retención o amnesia, estas definiciones *operativas* llevan implícita la visión de que la labilización, la reconsolidación y la extinción son procesos de todo-o-nada: O bien tras la administración de CHX se encuentra amnesia, por lo que se concluye que la labilización resultó inducida y la memoria requirió de la síntesis proteica, o bien se encuentra retención, por lo que la memoria no resultó labilizada y permaneció consolidada e insensible a la CHX. Por lo tanto, es necesario considerar que podrían haber situaciones intermedias que este abordaje no es capaz de detectar.

En los sucesivos experimentos de este trabajo someteremos a animales con una memoria del entrenamiento consolidada a una experiencia (recordatorio) que puede producir tres resultados distintos: (a) labilización y reconsolidación de la memoria CS-US, (b) extinción de la memoria CS-US, o (c) ningún efecto observable. Para la interpretación de los resultados, nos basaremos en las siguientes hipótesis.

(a) Labilización y reconsolidación de la memoria CS-US. Consideraremos a la labilización y a la reconsolidación de la memoria como dos procesos indisolubles, en el sentido que una experiencia que induce la reconsolidación de la memoria necesariamente induce su labilización previa (o simultánea). Del mismo modo, una memoria que resulta labilizada por una experiencia, necesariamente sigue el proceso de reconsolidación (salvo interferencia), así como una memoria recién adquirida sigue el proceso de consolidación. Por esto, en este trabajo cada vez que hagamos referencia a la ocurrencia de la labilización de la memoria, implícitamente consideraremos que la reconsolidación ha sido inducida, y viceversa. Si al evaluar a los animales 24 h después de una experiencia que induce la labilización (y reconsolidación), estos muestran memoria CS-US, asumiremos que la memoria fue reconsolidada. Asimismo, y de acuerdo con la definición operativa adoptada, si tras cierta experiencia comportamental contingente con la administración de CHX, los animales muestran memoria CS-US 24 h después, concluiremos que tal experiencia no indujo la labilización (ni por lo tanto tampoco la reconsolidación) de esta memoria. Es decir que esta memoria permaneció en todo momento consolidada, insensible a la CHX. Estas interpretaciones, ligadas a las definiciones propuestas, no consideran la posibilidad de que una experiencia comportamental que no induce la labilización de la memoria induzca de todos modos procesos moleculares similares a los que ocurren en la reconsolidación, incluyendo la síntesis proteica. Sin excluir la posibilidad de que estos eventos puedan ocurrir, al no ser necesarios para la persistencia a largo

término de la memoria consideraremos que no forman parte de la reconsolidación de esta traza.

(b) Extinción de la memoria CS-US. Consideraremos a la extinción de la vieja memoria (CS-US) como la adquisición de una nueva traza mnésica, de significado opuesto a la anterior (CS-no US), que a su vez necesita ser consolidada para establecerse a largo término. La expresión de esta nueva traza inhibe la expresión de la traza original, por lo que el resultado experimental es el mismo que ante una amnesia de la vieja memoria. No obstante, ambas situaciones pueden diferenciarse ya sea disrumpiendo la extinción o su consolidación farmacológicamente, o recurriendo a alguno de los cuatro procedimientos experimentales que permiten recuperar una memoria extinguida (recuperación espontánea, saving, renewal, reinstatement), con lo que vuelve a expresarse la vieja memoria CS-US.

(c) Sin efecto observable. La vieja traza no es afectada de modo observable por la experiencia comportamental, por lo que continúa consolidada y expresándose en todo momento como en ausencia de esta experiencia.

Definiciones

A continuación, más allá de los conceptos y las hipótesis de trabajo, definiremos el modo en que serán utilizados algunos términos en este trabajo. En particular, el término *extinción* es frecuentemente utilizado en la literatura con significados variados, refiriéndose con él tanto a la desaparición de la respuesta condicionada (el resultado experimental), a la memoria que subyace este fenómeno (el proceso mnésico) o al protocolo comportamental que le da lugar (el procedimiento experimental).

En primer lugar, en este trabajo nos referiremos a la memoria contexto-señal o memoria CS-US, adquirida como consecuencia del entrenamiento del Día 1, también como la *memoria original* o la *vieja memoria*, como contraposición a la memoria de extinción (la nueva memoria).

Por su parte, en referencia a la extinción, basándonos en la hipótesis de una competencia de trazas, usaremos los términos extinción de la memoria (o simplemente extinción) para referirnos a la formación (adquisición) de una nueva memoria CS-no US, i.e., la memoria de extinción, cuya expresión lleva a la supresión transiente de la expresión de la memoria CS-US. Es decir que en la desaparición de la respuesta condicionada estará implícita su atribución a la formación y expresión de esta nueva memoria. En cambio, nos referiremos al procedimiento experimental que lleva a la extinción como entrenamiento de extinción. Por otro lado, llamaremos consolidación de la (memoria de) extinción al proceso por el cual la memoria de extinción recién formada es estabilizada, dando lugar a una memoria de extinción de largo término.

El término *labilización*, por su parte, sólo hará referencia a la labilización de la vieja memoria CS-US.

A menudo haremos referencia a la *inducción* de los distintos procesos mnésicos: labilización, reconsolidación y extinción. Con este término nos referiremos a la conjunción de todas las condiciones necesarias y suficientes para la subsiguiente ocurrencia del proceso en cuestión, usándolo así de modo equivalente al término inglés *triggering*.

Abreviaturas y denominaciones frecuentes

Contexto estándar: arena experimental utilizada como contexto durante las sesiones de entrenamiento, re-exposición y evaluación, en todos los casos con la iluminación estándar, sólo desde arriba.

Contexto alternativo: misma arena experimental pero que en vez de ser iluminada desde arriba es iluminada sólo desde abajo, utilizada para interrumpir la re-exposición al contexto estándar durante tiempos breves, del orden de los minutos.

CHX: cicloheximida

CS: estímulo condicionado (*conditioned stimulus*)

CT: grupo control no entrenado

EEM: extinción de ensayos múltiples

EEU: extinción de ensayo único

EN: grupo entrenado

EVP: estímulo visual de peligro (US)

MCS: memoria contexto-señal

MK: MK-801

SAL: salina

US: refuerzo, o estímulo incondicionado (*unconditioned stimulus*)

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron cangrejos machos adultos, de la especie *Chasmagnathus granulatus*, con un diámetro de caparazón de entre 2,7 y 3,0 cm, con un peso de 17 gr aproximadamente (Fig. **M.1**).



Figura M.1: El cangrejo *Chasmagnathus granulatus*, sujeto experimental.

Los cangrejos fueron capturados en las rías de San Clemente del Tuyú, Provincia de Buenos Aires, a profundidades de < 1 m, entre los meses de enero y agosto. A su arribo al laboratorio los animales fueron alojados de a 20 individuos en cubas rectangulares de plástico (35 x 48 x 27 cm), con 1 – 2 cm de agua salobre (salinidad 10 – 14 ‰ p/v, pH= 7,4 – 7,6), a una temperatura de 22 – 24 °C, sujetos a un período de luz-oscuridad de 12-12 hs (luz de 7 a 19 hs). Tras la llegada al laboratorio, todos los animales pasaron por un período de reposo de al menos 48 hs y todos los experimentos fueron realizados dentro de los 10 días siguientes, entre las 8 y las 18 hs. Cada cangrejo fue utilizado en un solo experimento, y cada experimento fue realizado con animales

provenientes de una misma captura. Antes de cada experimento, los cangrejos pasaron por una prueba de selección en la que se los colocó sobre su dorso, y se descartaron aquellos que no recuperaron inmediatamente (<1 seg) su posición normal. La lógica detrás de esta selección es que los cangrejos que muestran tiempos de reacción largos muestran también una baja respuesta a una gran diversidad de estímulos, y generalmente terminan mostrando síntomas de salud deficiente. Normalmente menos del 5 % de los animales son descartados por este procedimiento.

Dispositivo experimental

El dispositivo experimental, llamado también *actómetro*, constituye el contexto del entrenamiento de los sujetos experimentales, que en el paradigma de memoria contexto-señal opera como estímulo condicionado (CS). El actómetro consiste de un contenedor de plástico opaco anaranjado, tipo bol, con paredes cóncavas de 12 cm de altura, base de 9 cm de diámetro y 23 cm de diámetro superior, con 0,5 cm (~ 50 ml) de agua salobre en su interior. Cada actómetro aloja a un solo sujeto experimental al mismo tiempo. Este contenedor tiene adherido bajo su base un dispositivo piezoeléctrico que registra las vibraciones producidas por el movimiento del cangrejo en su interior, las convierte en señales eléctricas y las envía a una computadora para su procesamiento. Asimismo, el dispositivo cuenta con una pantalla opaca negra rectangular (28 x 7,5 cm) ubicada horizontalmente de forma tangencial, 12 cm por encima del contenedor. Esta pantalla constituye el estímulo visual de peligro (EVP), que en el paradigma de memoria opera como estímulo incondicionado (US). La pantalla, operada mediante un motor controlado por una computadora, se mueve horizontalmente a velocidad angular constante ($\omega=72^\circ/\text{seg}$) describiendo un ángulo de 90° que barre el espacio por encima del actómetro. Cada ensayo de la sesión de entrenamiento o de evaluación

consiste de dos ciclos de movimiento de ida y vuelta de la pantalla, cada ciclo seguido de un intervalo de 2 seg sin estimulación, con una duración total de 9 seg (Fig. **M.2**).

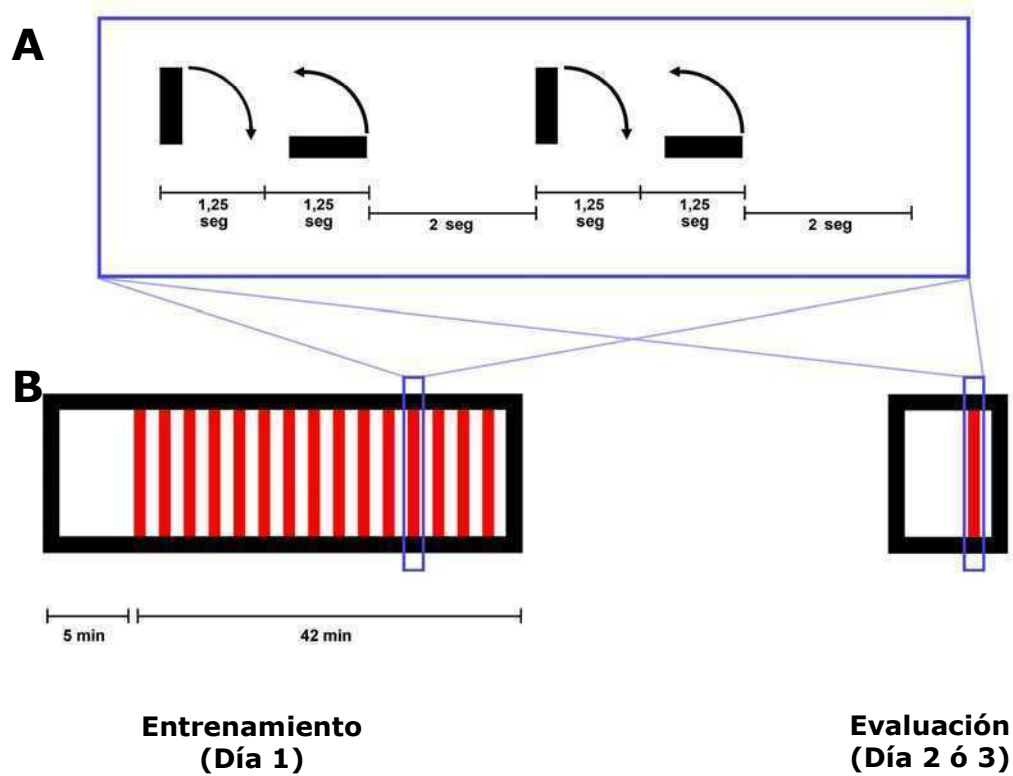


Figura M.2: **(A)** Cinética del pasaje de la pantalla durante los 9 seg de un ensayo. **(B)** Esquema de las sesiones de entrenamiento y evaluación. Las barras rojas representan el pasaje de la pantalla (9 seg) y los espacios blancos entre barras, el intervalo entre ensayos (171 seg).

Durante estos 9 seg, las vibraciones producidas por la respuesta comportamental del cangrejo son registradas, traducidas a unidades arbitrarias e integradas por una computadora.

El contexto experimental puede ser iluminado de dos modos distintos. La iluminación estándar está dada por una lámpara incandescente de 5 W que provee una luz indirecta desde arriba de cada actómetro. Ésta es la iluminación utilizada siempre durante las sesiones de entrenamiento y evaluación, así como durante las re-exposiciones al

contexto del entrenamiento, y nos referimos al contexto iluminado de este modo como *contexto estándar*. Por otra parte, el contexto puede ser alternativamente iluminado desde debajo del contenedor, por una lámpara incandescente de 5 W. Esta luz se transluce a través del contenedor y deja en penumbras al espacio que se encuentra por encima de éste. Esta iluminación provee un entorno completamente diferente, y es utilizada para señalar un cambio de contexto por tiempos breves (≤ 15 min) sin la necesidad de manipular los animales. Denominamos al contexto iluminado de este modo *contexto alternativo* (Fig. **M.3**).

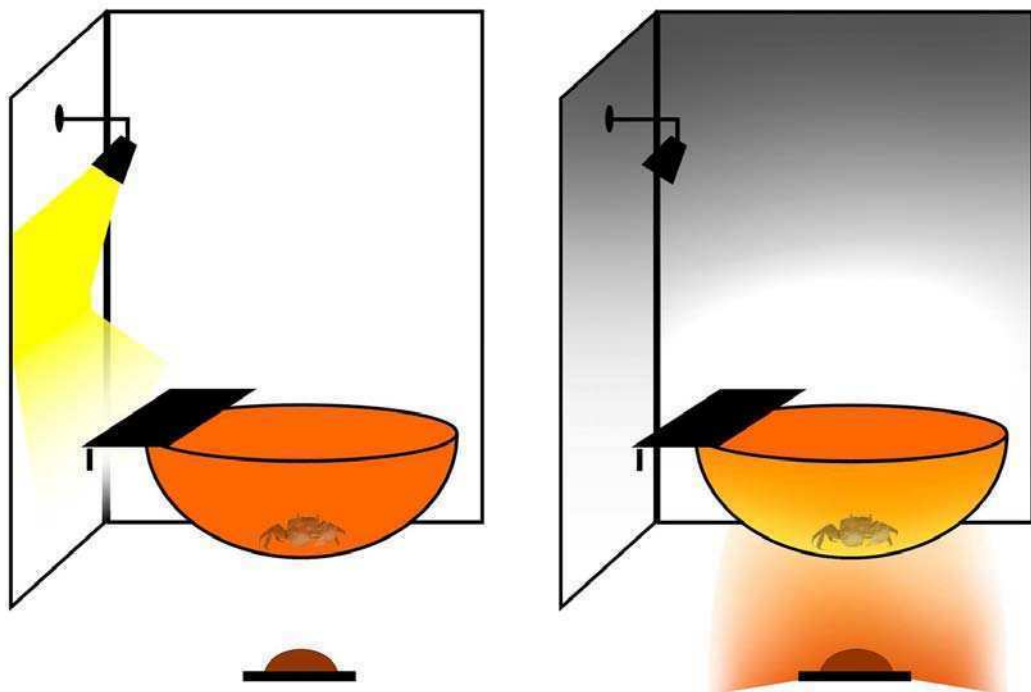


Figura M.3: Esquema del dispositivo experimental iluminado de las dos formas posibles, constituyendo el contexto estándar (izquierda) y el contexto alternativo (derecha).

La habitación experimental se encuentra a una temperatura de 22 – 24 °C, y cuenta con 40 actómetros separados por tabiques de madera, donde los cangrejos son entrenados, tratados o evaluados simultáneamente. Asimismo, la habitación cuenta con cajoneras tenuemente iluminadas donde los animales son alojados entre sesiones en contenedores individuales con agua salobre (sal. 10 – 14 ‰ p/v).

Protocolos experimentales

Procedimiento general:

En cada experimento, antes del entrenamiento se formaron dos grupos de cangrejos (n= 30 a 40 animales por grupo) por cada tratamiento experimental: un grupo que recibirá el entrenamiento (EN) y un grupo no entrenado que actuará como control (CT). En todos los experimentos de este trabajo, los cangrejos fueron entrenados y evaluados en el mismo contexto, el contexto del entrenamiento iluminado desde arriba (contexto estándar), que opera como CS. Invariablemente, en el Día 1 los animales sólo recibieron la sesión de entrenamiento (Fig. M.2). En los distintos experimentos, en el Día 2 los animales fueron re-expuestos una o más veces ya sea al contexto estándar, al contexto iluminado desde abajo, a un contexto diferente, o a una sucesión de los anteriores (Fig. M.3). En algunos casos las re-exposiciones en el contexto estándar incluyeron el pasaje del estímulo visual de peligro (EVP), y en algunos casos estuvieron precedidas o seguidas de una inyección de salina (SAL), cicloheximida (CHX) o MK-801 (MK). Por último, los animales fueron evaluados en el contexto estándar.

Sesión de entrenamiento:

En todos los casos, en el Día 1 los cangrejos fueron colocados en el contexto estándar y, tras 5 min de tiempo de adaptación, recibieron

15 ensayos del pasaje de la pantalla, el EVP (US), con un intervalo entre ensayos de 171 seg. Simultáneamente, los cangrejos que actuaron como controles no entrenados fueron expuestos al mismo contexto pero sin recibir el EVP. En adelante, los controles no entrenados siguieron idéntico protocolo que los cangrejos entrenados. La duración total de la sesión de entrenamiento es de 50 min. A continuación, los animales fueron alojados individualmente en recipientes ubicados dentro de cajoneras con iluminación tenue hasta la sesión siguiente.

Sesión de re-exposición:

Re-exposiciones: En todos los casos, en el Día 2 los cangrejos fueron re-expuestos al contexto estándar durante distintos tiempos de acuerdo a cada experimento. En algunos casos, los animales recibieron dos re-exposiciones al contexto estándar. Salvo cuando se indica, en los casos en que ambas re-exposiciones estuvieron separadas por 15 min o menos, los animales no fueron retirados del dispositivo entre exposiciones sino que se les presentó una iluminación diferente, que opera como un cambio de contexto virtual (contexto alternativo, con iluminación desde abajo, ver más arriba Dispositivo experimental). En los casos en que las re-exposiciones estuvieron separadas por tiempos mayores, los cangrejos fueron alojados individualmente en las cajoneras hasta la re-exposición siguiente.

Inyecciones: en algunos casos, los cangrejos recibieron una inyección de SAL, MK-801, o CHX, ya sea antes o después de la(s) re-exposición(es).

EVP: en algunos experimentos, la re-exposición al contexto estándar co-terminó con la presentación de un EVP. Este estímulo, además de operar como un refuerzo, constituye un ensayo de evaluación de la memoria.

Sesión de evaluación:

La evaluación de la retención de la memoria tuvo lugar en el Día 2, tras la(s) re-exposición(es), y/o en el Día 3, y/o en el Día 4, de acuerdo a lo indicado en cada experimento.

En todos los casos la evaluación consistió de la cuantificación de las vibraciones producidas por la respuesta comportamental de los cangrejos únicamente durante los 9 seg de duración de la presentación de un EVP (un ensayo) (Fig. M.2), a continuación de un período de permanencia en el contexto estándar de al menos 5 min. En los casos en que los animales ya se encontraban en el contexto estándar (Día 2, re-exposición) se presentó directamente el EVP. En los casos en que se encontraban en otro contexto o en las cajoneras, se los ubico primero en el contexto estándar durante 5 min (adaptación) y luego se les presentó el EVP. Por último, en los casos en que los animales se encontraban en el contexto alternativo (i.e., dentro del mismo contexto físico, pero con la iluminación alternativa), el contexto estándar se presentó durante 9 seg ó 5 min antes del ensayo de evaluación, según se indica en los experimentos particulares.

Soluciones, drogas e inyecciones

El agua salobre utilizada para alojar a los animales, fue preparada con sal marina artificial (Marinex) a una concentración del 12 ‰ p/v con agua de red filtrada y declorada. La solución fisiológica de crustáceos (salina, SAL) inyectada como tratamiento control, o utilizada como solución vehículo de las drogas inyectadas se preparó de acuerdo a Hoeger y Florey (1989). La cicloheximida y el MK-801 [(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,d] cyclohepten-5,10-imine], fueron comprados a Sigma Co. Ambas drogas fueron diluidas directamente en solución salina, y administradas en un volumen de 50 µl por animal mediante una inyección dada a través de la membrana cefalotorácica-

abdominal dorsal, controlando la profundidad de penetración a 4 mm mediante una camisa colocada en la aguja de la jeringa, de modo de asegurar la liberación de la solución inyectada en el saco pericárdico.

Análisis estadístico

A través de todo este trabajo, el análisis estadístico de los datos estuvo dirigido a evaluar una predicción básica, emergente del extenso trabajo de nuestro laboratorio con el paradigma de memoria contexto-señal. En estos experimentos, invariablemente se encuentra una diferencia significativa (prueba 't', $p < 0,05$) entre la respuesta de grupos entrenados y controles no entrenados (CT>EN), en el ensayo de evaluación hasta 5 días después del entrenamiento, siempre que cada grupo consista de más de 30 cangrejos, y que se los entrene con 15 ó más ensayos espaciados 3 minutos. La misma diferencia significativa siempre se mantiene cuando los cangrejos son inyectados con SAL. De acuerdo con estos antecedentes, se predijo una diferencia significativa (CT>EN) en el ensayo de evaluación, y por lo tanto, los presentes resultados fueron analizados mediante comparaciones planeadas a priori (Rosenthal & Rosnow 1985; Howell 1987), previo efecto significativo general en un análisis de varianza (ANOVA) de un factor ($\alpha < 0,05$). De este modo, una diferencia significativa entre un grupo entrenado y su respectivo control no entrenado es considerado operacionalmente como retención de la memoria. En cada experimento las comparaciones planeadas se hicieron de la siguiente manera: en la sesión de evaluación se contrastó (a) la respuesta de grupos de animales no entrenados versus entrenados de un mismo tratamiento experimental, para evaluar retención de la memoria, y (b) la respuestas entre grupos de animales no entrenados pero sometidos a tratamientos diferentes, en un mismo experimento, para evaluar efectos inespecíficos del tratamiento sobre los niveles de respuesta de los animales. Este último contraste no mostró diferencias significativas en ningún experimento de

este trabajo. Todos los puntajes de las respuestas se muestran como media \pm la media del error estándar, normalizados a los valores de la media de la respuesta de un grupo control no entrenado. Los datos se analizaron usando Statistica '99 (Windows 6.1 software package; StatSoft Inc., Tulsa, OK).

CAPÍTULO I

El refuerzo y el *mismatch*

1 – Rol del refuerzo sobre el proceso de labilización y reconsolidación de la memoria

1.1 – Introducción

En la literatura se ha planteado frecuentemente que al presentar un recordatorio la memoria consolidada es “reactivada” o labilizada como consecuencia de su evocación (Nader *et al.* 2000a; Sara 2000b). Podría resultar dudoso el valor adaptativo del retorno de una memoria consolidada al estado lábil, poniéndose en riesgo ante potenciales interferencias, por el mero hecho cotidiano de ser evocada. Por otra parte, resulta también anti-intuitivo, incluso desde un punto de vista energético, que con cada evento de evocación una memoria vuelva a requerir un aporte metabólico tan significativo, incluyendo transcripción génica y síntesis proteica.

No obstante, como ya mencionamos, existen evidencias de que la memoria no resulta labilizada como consecuencia de la evocación *per se*, como ocurre por ejemplo durante su extinción. De este modo, resulta de gran interés para la comprensión de la funcionalidad del fenómeno de reconsolidación estudiar si existen, además de la extinción, otras condiciones en que una memoria evocada no resulta labilizada.

Considerando el valor funcional propuesto para la consolidación original de la memoria como ventana temporal de integración de información contingente (McGaugh 2000), el valor adaptativo del fenómeno de reconsolidación de la memoria surgiría más claramente para los casos en que en el recordatorio exista nueva información significativa para ser incorporada a la vieja memoria. Por contraposición, podría plantearse como hipótesis que una experiencia comportamental que evoque la memoria original pero que no aporte nueva información podría ser inocua respecto de su capacidad de labilizar la memoria consolidada.

En los estudios previos del laboratorio sobre la reconsolidación de la memoria contexto-señal en el cangrejo, el recordatorio presentado consistió siempre en una re-exposición no reforzada al contexto del entrenamiento (CS) (Pedreira *et al.* 2002; Pedreira & Maldonado 2003). Como experiencia comportamental, la inclusión de un refuerzo (US) durante la re-exposición al contexto tendría un valor informacional cualitativamente distinto para el animal, en relación a lo aprendido originalmente, dado que al presentar el refuerzo la relación entre estímulos sería la misma que en el entrenamiento. Por lo tanto, basándonos en la hipótesis propuesta, nos preguntamos si una re-exposición corta al contexto en la que se incluye el refuerzo es capaz de inducir la labilización y reconsolidación de la memoria.

1.2 – Resultados

Esta primera serie de experimentos tiene como objetivo evaluar si la inclusión del refuerzo en la re-exposición al contexto evita que la memoria contexto-señal resulte labilizada.

Para evaluar el efecto de la inclusión del refuerzo durante el recordatorio sobre la inducción de la labilización de la memoria, en los siguientes dos experimentos entrenamos cangrejos usando el paradigma de memoria contexto-señal (Día 1), y 24 horas después los re-expusimos durante 5 min al contexto del entrenamiento, incluyendo o no un refuerzo a último momento de la re-exposición (Día 2). Para evidenciar si la memoria resultó labilizada, 2 horas después de la re-exposición, i.e., dentro de la ventana temporal de la reconsolidación, los animales fueron inyectados con salina (SAL) o con 15 µg del inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida (CHX). Esta dosis de CHX inhibe la síntesis proteica en aproximadamente un 90 % por más de 2 horas, y es suficiente para bloquear la consolidación y la reconsolidación de la memoria en el cangrejo cuando es inyectada hasta 4 h después del entrenamiento o de la re-exposición, respectivamente (Pedreira *et al.*

1995; Pedreira *et al.* 2002; Pedreira & Maldonado 2003). Finalmente, los cangrejos fueron evaluados 24 horas más tarde, colocándolos en el contexto del entrenamiento y presentándoles 5 min después un ensayo de evaluación (Día 3) (Fig. 1.1A y 1.2A). Aquí y en todos los experimentos de esta tesis, la respuesta comportamental de cada grupo de animales entrenados (EN) se compara con la de un grupo control no entrenado (CT) corrido simultáneamente, y que por lo demás pasó por idéntico protocolo experimental que el grupo entrenado.

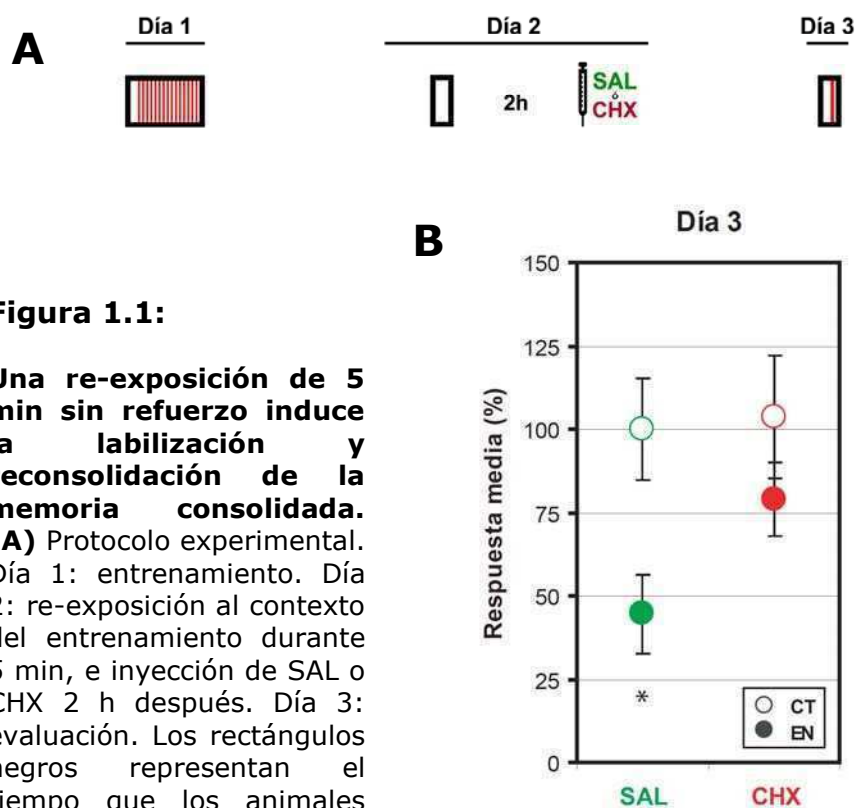


Figura 1.1:

Una re-exposición de 5 min sin refuerzo induce la labilización y reconsolidación de la memoria consolidada.

(A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento durante 5 min, e inyección de SAL o CHX 2 h después. Día 3: evaluación. Los rectángulos negros representan el tiempo que los animales transcurren en el contexto del entrenamiento (CS), y las rayas rojas representan el pasaje de la figura (US)

durante el entrenamiento (sólo grupos entrenados, 15 ensayos) y durante la evaluación (1 ensayo). El ícono de la jeringa representa el momento de la inyección, indicándose el tiempo transcurrido desde la re-exposición. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación en el Día 3 (media \pm SEM), normalizada respecto de la respuesta media del grupo control no entrenado inyectado con SAL (SAL-CT). ANOVA $F(3,116)=3.52$, $p<0.01$. SAL-CT>SAL-EN: $p<0.001$. CHX-CT~CHX-EN: $p=0.23$. CT: grupo control no entrenado. EN: grupo entrenado. Aquí y en todos los experimentos de esta tesis, $n= 30$ a 40 animales por grupo.

De acuerdo a la predicción, aquellos grupos de animales cuya memoria hubiera resultado labilizada como consecuencia de la re-exposición (Día 2), en el caso de haber recibido una inyección de CHX la reconsolidación resultaría impedida por lo que deberían mostrar amnesia a largo término (Día 3), mientras que de haber recibido SAL deberían reconsolidar la memoria labilizada y por lo tanto mostrar retención de la memoria CS-US. Por su parte, aquellos grupos de animales cuya memoria hubiera permanecido en todo momento consolidada, y consecuentemente insensible a la CHX, deberían mostrar retención a largo término en todos los casos.

En el experimento en el que los cangrejos fueron re-expuestos al contexto del entrenamiento sin refuerzo (Fig. 1.1), los resultados muestran que los animales inyectados con SAL, en el Día 3 mostraron retención de la memoria, expresada como una respuesta significativamente menor en el grupo entrenado (EN-SAL) respecto de su grupo control no entrenado (CT-SAL), mientras que aquellos que recibieron una inyección de CHX resultaron amnésicos, es decir no se observaron diferencias significativas entre las respuestas de los grupos EN-CHX y CT-CHX (Fig. 1.1B, ver estadística en el epígrafe). Por otra parte, al igual que en el resto de los experimentos de este trabajo, no se detectaron diferencias significativas entre las respuestas de los grupos no entrenados, CT-SAL y CT-CHX, lo que permite descartar efectos inespecíficos de la droga sobre la respuesta de los animales. El hecho de que la memoria haya resultado impedida a largo término como consecuencia de la administración de CHX evidencia que la memoria resultó labilizada, y esto es consistente con trabajos anteriores del laboratorio, en los que se demostró que esta labilización es consecuencia de la re-exposición al contexto del entrenamiento (Pedreira *et al.* 2002).

Sin embargo, en el experimento en el que los cangrejos siguieron idéntico protocolo pero incluyendo un refuerzo a último momento de la re-exposición (Fig. 1.2), los animales mostraron retención de la

memoria tanto en el Día 2 como en el Día 3, independientemente de la inyección recibida (Fig. 1.2B). Esta retención de largo término en el Día 3 evidencia que la memoria permaneció consolidada a pesar de la re-exposición al contexto, ya que la administración de CHX no tuvo un efecto amnésico.

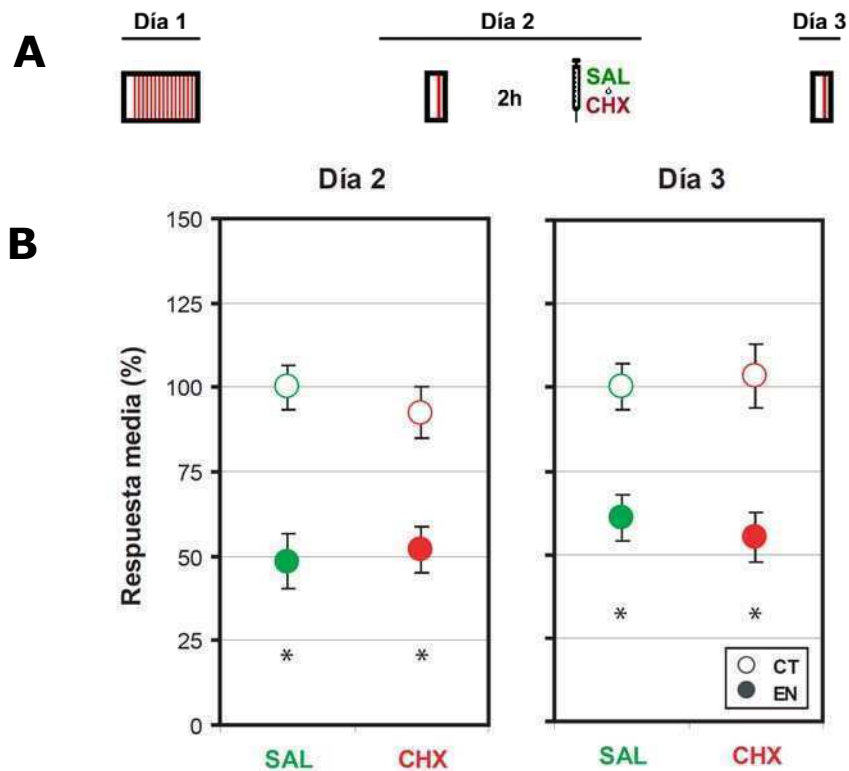


Figura 1.2: La inclusión de un refuerzo antes del fin de la re-exposición de 5 min impide la labilización y reconsolidación de la memoria. **(A)** Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento durante 5 min incluyendo un refuerzo, e inyección de SAL o CHX 2 h después. Día 3: evaluación. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2 (izq.) y en el Día 3 (der.), normalizada respecto de la respuesta media del grupo SAL-CT. Día 2: ANOVA $F(3,156)=13.10$, $p<10^{-6}$. SAL-CT>SAL-EN: $p<0.0001$. CHX-CT>CHX-EN: $p<0.0001$. Día 3: ANOVA $F(3,156) = 12.26$, $p<10^{-6}$. SAL-CT>SAL-EN: $p<0.0001$. CHX-CT>CHX-EN: $p<0.0001$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 1.1.

Estos resultados nos permitirían concluir que la inclusión del refuerzo previno la inducción de la labilización y reconsolidación de la memoria. Sin embargo, es necesario considerar que la inyección de CHX

dada para poner a prueba el estado de labilidad de la memoria fue administrada 2 horas después de la re-exposición. A pesar de que en trabajos previos se mostró que la CHX produce un efecto amnésico cuando es administrada hasta 4 horas después de una re-exposición no reforzada (Pedreira *et al.* 2002), en este caso podría argumentarse que el efecto del refuerzo fue inducir una reconsolidación más acelerada, o sumaria, de modo que la inyección de CHX podría haber llegado tarde para disrumpir el proceso de reconsolidación.

Para evaluar esta posibilidad, repetimos este último experimento pero administrando las inyecciones de SAL o CHX inmediatamente después de la re-exposición reforzada al contexto del entrenamiento (Fig. **1.3A**). Los resultados obtenidos fueron idénticos a los del experimento anterior. Es decir, tanto los cangrejos inyectados con SAL como los inyectados con CHX mostraron retención de la memoria en el Día 2 y en el Día 3 (Fig. **1.3B**). Este último resultado deja poco margen para una interpretación en términos de una reconsolidación sumaria. Concluimos por lo tanto que mientras que una re-exposición al contexto sin refuerzo induce la labilización de la memoria, una re-exposición reforzada no es capaz de inducirla.

Estas conclusiones nos permiten hacer la siguiente predicción. El experimento anterior mostró que al presentarse una re-exposición reforzada (que en este paradigma constituye una sesión de evaluación), la memoria aparece intacta (retención en el Día 2) y consolidada (retención en el Día 3). Si se presenta esta misma re-exposición reforzada pero precedida de una re-exposición sin refuerzo, que induce la labilización y reconsolidación de la memoria, debería observarse a la memoria intacta (retención en el Día 2) pero lábil (amnesia en el Día 3). Para evaluar esto es necesario administrar CHX dentro de la ventana de labilidad inducida por la primera re-exposición. Para esto se realizó el siguiente experimento. Los cangrejos entrenados en el Día 1 fueron sometidos en el Día 2 a una primera re-exposición de 5 min sin refuerzo, y 4 horas después a una segunda re-exposición de 5 min

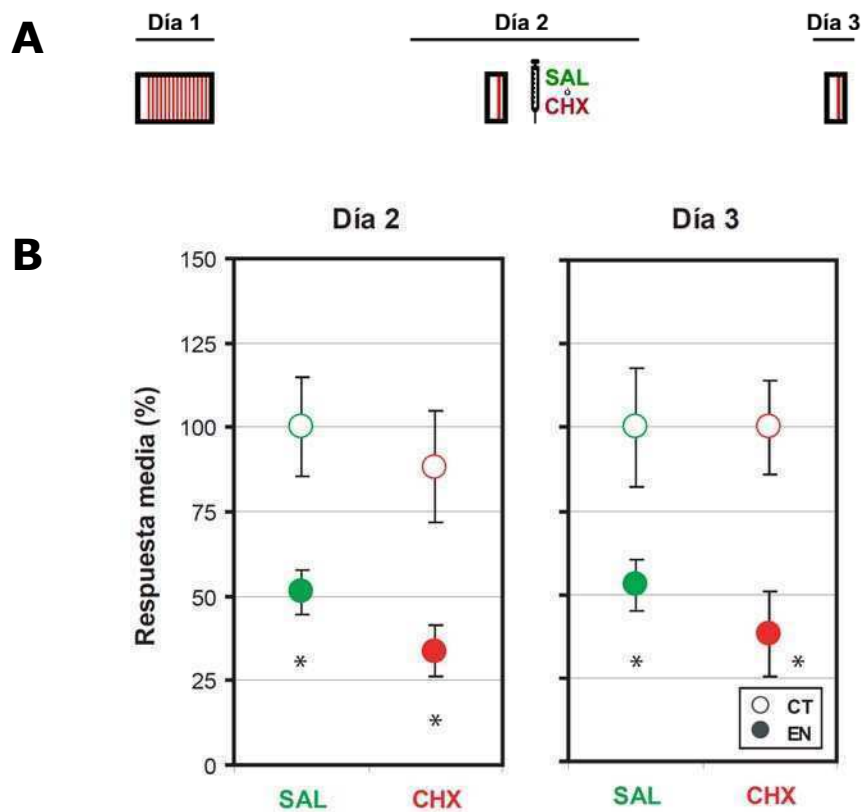


Figura 1.3: El efecto del refuerzo no es producir una reconsolidación sumaria. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento durante 5 min incluyendo un refuerzo, e inyección de SAL o CHX inmediatamente después. Día 3: evaluación. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2 y en el Día 3, normalizada respecto de la respuesta media del grupo SAL-CT. Día 2: ANOVA $F(3,116) = 6.79, P < 0.001$. SAL-CT>SAL-EN: $p < 0.01$. CHX-CT>CHX-EN: $p < 0.01$. Día 3: ANOVA $F(3,116) = 5.62, P < 0.01$. SAL-CT>SAL-EN: $p < 0.01$. CHX-CT>CHX-EN: $p < 0.01$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 1.1.

reforzada y seguida inmediatamente de una inyección de SAL o CHX. Finalmente, todos los cangrejos fueron evaluados al día siguiente (Día 3) (Fig. 1.4A). En concordancia con la predicción, la evaluación del Día 2 mostró retención en todos los animales (memoria intacta), y la evaluación del Día 3 mostró retención en los animales inyectados con SAL pero amnesia en aquellos inyectados con CHX (memoria lábil al momento de la inyección) (Fig. 1.4B).

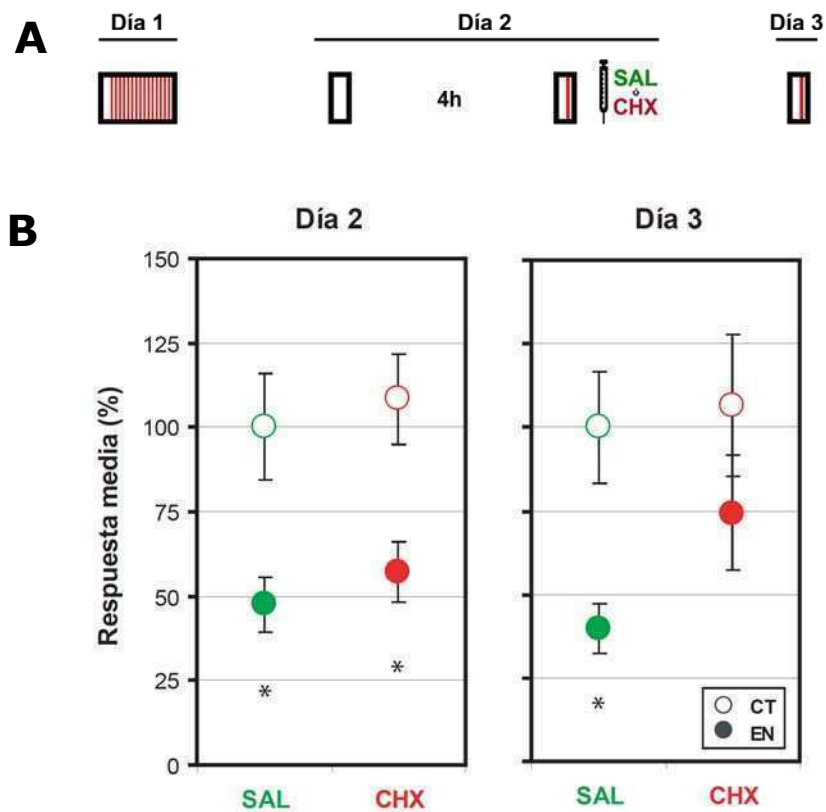


Figura 1.4: El refuerzo presentado 4 h después de una re-exposición de 5 min no revierte el proceso de labilización y reconsolidación de la memoria. **(A)** Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: doble re-exposición al contexto del entrenamiento durante 5 min, primero sin refuerzo y 4 h después con refuerzo, e inyección de SAL o CHX inmediatamente después. Día 3: evaluación. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2 y en el Día 3, normalizada respecto de la respuesta media del grupo SAL-CT. Día 2: ANOVA $F(3,124) = 5.97$, $P < 0.001$. SAL-CT>SAL-EN: $p < 0.01$. CHX-CT>CHX-EN: $p < 0.01$. Día 3: ANOVA $F(3,124) = 3.49$, $P < 0.02$. SAL-CT>SAL-EN: $p < 0.01$. CHX-CT~CHX-EN: $p = 0.16$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 1.1.

1.3 – Discusión

Este conjunto de resultados nos lleva a dos conclusiones principales en relación al rol del refuerzo y al rol del fin de la re-exposición en la labilización de la vieja memoria.

Rol del refuerzo

La primera conclusión es que la inclusión de un refuerzo antes del fin de la re-exposición previene la inducción de la labilización de la memoria y su subsiguiente reconsolidación. Estos resultados revelan entonces una segunda característica paramétrica de la experiencia comportamental requerida para inducir la labilización y reconsolidación de la memoria contexto-señal en el cangrejo *Chasmagnathus*. De este modo, de acuerdo a los antecedentes (Pedreira & Maldonado 2003) y a estos resultados la inducción de la labilización y reconsolidación de esta memoria requiere una re-exposición al contexto del entrenamiento de corta duración (<1 h) y sin refuerzo.

Este hallazgo resulta de particular interés para la comprensión del valor funcional del proceso de labilización y reconsolidación de la memoria, ya que por un lado aporta nueva evidencia de que la memoria consolidada no está regresando al estado lábil con la mera evocación. Y por otro lado, muestra que la calidad y significado de la información presentada podría ser un factor relevante para la inducción de este proceso.

Rol del fin de la re-exposición

Una segunda conclusión central a partir de estos resultados es que el hecho de encontrar que la memoria no se labiliza como consecuencia de la inclusión de un refuerzo provee un apoyo adicional a la hipótesis de que la labilización de la memoria no ocurre durante sino después de la re-exposición al contexto. Dado que la única diferencia entre la experiencia que induce la labilización y la que no la induce es un evento que tiene lugar a último momento de la re-exposición (el refuerzo), podemos arribar a esta conclusión siguiendo un razonamiento análogo al presentado anteriormente (ver Introducción, Sección 6) respecto de la re-exposición larga: si la memoria resultara labilizada

durante la re-exposición (corta) sin refuerzo, también debería resultar labilizada *durante* la re-exposición con refuerzo. Y suponer esto último sería equivalente a asumir que la memoria puede (como consecuencia del refuerzo) ser re-estabilizada mediante un mecanismo independiente de la síntesis proteica, ya sea porque la memoria es re-estabilizada en presencia de CHX, o porque es re-estabilizada antes de que la droga pueda hacer efecto, esto es, en un período de tiempo tan breve (entre el refuerzo y la inyección) que sería difícilmente compatible con la síntesis *de novo* de proteínas (ver Fig. 1.3). Si bien esta re-estabilización sumaria es una posibilidad lógica, tal mecanismo no ha sido descrito nunca.

Adicionalmente, el último experimento de esta serie muestra también que a las 4 horas post re-exposición el refuerzo *per se* no tiene la capacidad de revertir el proceso de labilización, o producir la re-estabilización sumaria de una memoria lábil (Fig. 1.4). Por el contrario, aquí podemos observar que la memoria labilizada por la primera re-exposición continúa siendo sensible a una inyección de CHX administrada con posterioridad al refuerzo.

En resumen, estos resultados apoyan la hipótesis de que la memoria permanece consolidada durante la re-exposición al contexto y que tras salir del contexto, si el refuerzo no ocurrió, se dispara la labilización y reconsolidación de la memoria.

En la Discusión General abordaremos las implicancias que estos resultados tienen respecto del valor funcional del fenómeno de reconsolidación de la memoria, y cómo estos hallazgos se relacionan con los resultados obtenidos en otros modelos de memoria.

2 – Rol del refuerzo sobre el proceso de extinción de la memoria

2.1 – Introducción

En la sección anterior mostramos que la inclusión de un refuerzo durante la re-exposición corta es capaz de prevenir la inducción de la labilización y subsiguiente reconsolidación de la memoria contexto-señal. Estos resultados fueron interpretados en términos del valor del refuerzo en el significado de la experiencia comportamental de la re-exposición respecto de aquella del entrenamiento.

Existen diversos elementos para suponer que, análogamente, la presentación de un refuerzo antes del final de una re-exposición larga tendría un efecto similar sobre la extinción, es decir, prevenir la extinción de la memoria. En diversos paradigmas comportamentales se ha mostrado que la extinción de una memoria requiere de la presentación no reforzada del CS (e.g. Pavlov 1927). Dado que la extinción de una memoria CS-US se produciría como consecuencia de una nueva asociación CS-no US, la presentación contingente del US conspiraría contra la formación de esta asociación.

No obstante, en el cangrejo *Chasmagnathus* el efecto del refuerzo sobre la extinción de la memoria nunca ha sido estudiado. Si bien cabe esperar que la presentación del refuerzo conspira contra la extinción de la memoria CS-US (la memoria contexto-señal), no está claro si un único refuerzo es capaz de revertir los efectos de una larga re-exposición al contexto no reforzada. Una posibilidad sería que se establezca una competencia entre las dos asociaciones, CS-US versus CS-no US, cuyo resultado dependa, por ejemplo, del tiempo de re-exposición no reforzada. Otra posibilidad podría ser que el refuerzo directamente tenga un efecto restrictivo para la inducción del proceso, como se observó que lo tiene respecto de la reconsolidación.

Por otro lado, en relación al mecanismo que hipotéticamente vincularía a la reconsolidación y la extinción, resulta de gran interés

estudiar si el proceso de extinción ocurre simultáneamente con la re-exposición al contexto o si, al igual que el de reconsolidación, se dispara recién una vez finalizada la re-exposición. Esta última hipótesis, que puede parecer anti-intuitiva, se basa en un llamativo antecedente de nuestro laboratorio (Tomsic *et al.* 1998). En aquel trabajo se observó que presentando una re-exposición no reforzada al contexto de 12 h de duración, si se evalúa la memoria antes de retirar a los animales del contexto no se evidencia extinción. En otras palabras, no se observó una extinción intra-sesión. En un trabajo anterior, Lozada *et al.* (1990) observaron el mismo fenómeno al final de una re-exposición no reforzada de 24 h. No obstante, en adelante nos referiremos preferentemente al trabajo de Tomsic *et al.* al citar los antecedentes ya que allí el entrenamiento de extinción fue realizado sobre una memoria CS-US ya consolidada (comenzando 12 h post-entrenamiento, extinción tardía), una situación experimental más relacionada con la del presente trabajo, mientras que en el estudio de Lozada *et al.* los animales directamente permanecieron en el contexto durante 24 h tras el entrenamiento (extinción temprana). Estos dos tipos de extinción han mostrado estar basados en mecanismos diferentes (Cain *et al.* 2005; Myers *et al.* 2006).

Para comprender estos resultados en términos experimentales es necesario tener en mente que en este paradigma comportamental la evaluación de la memoria requiere de la presentación del refuerzo. Por lo tanto no es posible evaluar la memoria repetidamente durante el entrenamiento de extinción como comúnmente se hace en otros paradigmas. De este modo, en los trabajos citados se presentó un refuerzo antes del final de la re-exposición, observándose retención de la vieja memoria (CS-US). No obstante, no se estudió el efecto de esta presentación del refuerzo sobre la extinción, lo que requeriría una nueva sesión de evaluación posterior. Por otra parte, Pedreira y Maldonado (2003) mostraron que una re-exposición no reforzada de una duración de 1 hora o más, induce la extinción de la memoria, aunque esto se evidenció evaluando la memoria a largo término.

En resumen, el conjunto de antecedentes indica que una re-exposición larga al contexto del entrenamiento no induciría una extinción intra-sesión, pero sí una extinción de largo término.

Nos preguntamos entonces si, al igual que la reconsolidación, la extinción de la memoria en el cangrejo requiere del fin de la re-exposición al contexto y si la presentación de un único refuerzo tiene la capacidad de impedir la inducción de este proceso mnésico.

2.2 – Resultados

El objetivo de esta serie de experimentos es evaluar el efecto que tienen el refuerzo y el fin de la re-exposición sobre el proceso de extinción de la memoria, tanto en el día de la re-exposición (Día 2) como a largo término (Día 3).

Para inducir la extinción de la memoria realizamos re-exposiciones al contexto del entrenamiento de 2 h de duración. Elegimos este valor de tiempo por encontrarse más lejos de lo que podríamos denominar la “duración umbral” de la re-exposición (45 min – 1 h), por debajo de la cual dejaría de inducirse extinción para inducirse reconsolidación (Pedreira & Maldonado 2003). De este modo, esperamos reducir las probabilidades de encontrar efectos ambiguos o poco claros, propios de una situación límite. Para evaluar el efecto de la inclusión de refuerzo se realizaron re-exposiciones de 2 h, incluyendo o no el refuerzo a último momento, y seguidas de una inyección de SAL o CHX de modo de monitorear asimismo el estado de labilidad o estabilidad de la memoria ante esta nueva situación experimental.

En primer lugar, evaluamos el efecto de la presentación de un refuerzo al final de una re-exposición larga sobre la memoria de extinción. Para esto, en dos experimento distintos entrenamos

cangrejos en el Día 1 y en el Día 2 los re-expusimos durante 2 h al contexto del entrenamiento, incluyendo o no un refuerzo a último momento de la re-exposición. En ambos experimentos, 2 h después administramos una inyección de SAL o 15 μ g de CHX. Finalmente, todos los animales fueron evaluados 24 h después (Día 3) (Figs. **1.5A** y **1.6A**). Los trabajos previos han mostrado que esta dosis de CHX administrada 1 h antes ó 2 h después de una re-exposición larga no reforzada bloquea la consolidación de la memoria de extinción (Pedreira & Maldonado 2003).

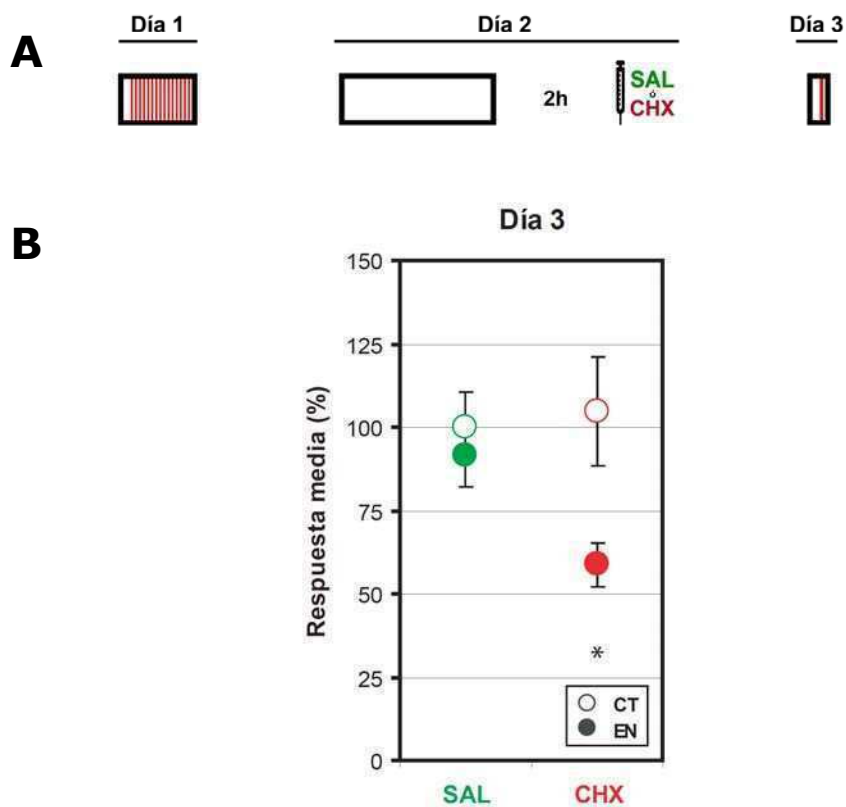


Figura 1.5: Una re-exposición de 2 h sin refuerzo induce la extinción de largo término de la memoria CS-US. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento sin refuerzo durante 2 h, e inyección de SAL o CHX 2 h después. Día 3: evaluación. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 3, normalizada respecto de la respuesta media del grupo SAL-CT. ANOVA $F(3,116) = 4.83$, $P < 0.01$. SAL-CT~SAL-EN: $p=0.5$. CHX-CT>CHX-EN: $p<0.001$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 1.1.

De acuerdo a la predicción, en el Día 3 los animales inyectados con SAL deberían mostrar extinción o retención de la memoria CS-US, de acuerdo a si el protocolo experimental en cuestión (con o sin refuerzo) fue efectivo para inducir la extinción a largo término de la memoria. Por su parte, los animales inyectados con CHX deberían mostrar amnesia o retención, de acuerdo a si la vieja memoria resultó o no labilizada, respectivamente, e independientemente de si el protocolo indujo extinción. Recordemos que, en estos animales, si la memoria resulta extinguida esta extinción no se manifestará a largo término a causa de la CHX (Pedreira & Maldonado 2003).

En el experimento en el que los cangrejos no recibieron el refuerzo durante la re-exposición del Día 2 (Fig. 1.5), los resultados del Día 3 muestran que aquellos animales que fueron inyectados con SAL, extinguieron la memoria CS-US, mientras que los que recibieron CHX mostraron retención de la vieja memoria (Fig. **1.5B**). Este resultado concuerda con los antecedentes (Pedreira & Maldonado 2003), y es consistente con un bloqueo de la consolidación de la memoria de extinción por parte de la CHX, evidenciándose en su lugar la vieja memoria que permaneció consolidada.

Por su parte, en el experimento en el que a los animales sí se les presentó el refuerzo co-terminando con la re-exposición del Día 2 (Fig. 1.6), los resultados mostraron retención de la vieja memoria, tanto en el Día 2 como en el Día 3, e independientemente de la inyección recibida (Fig. **1.6B**). Estos resultados nos permiten sacar tres conclusiones. Primero, de los grupos inyectados con SAL puede inferirse que la inclusión del refuerzo previno la extinción de largo término que de otro modo se hubiera observado en el Día 3 (e.g. Fig. 1.5). Segundo, la falta de efecto amnésico de la CHX *sobre la vieja memoria* (Día 3) evidencia que ésta permaneció en todo momento consolidada. Por último, la evaluación del Día 2 muestra que, en concordancia con el trabajo de Tomsic *et al.* (1998), antes del fin de la re-exposición la memoria CS-US no se encuentra aún extinguida. Por lo tanto, los resultados de estos dos experimentos muestran que también para la

inducción de la extinción se requiere el fin de la re-exposición (no se observa extinción intra-sesión) y el no refuerzo.

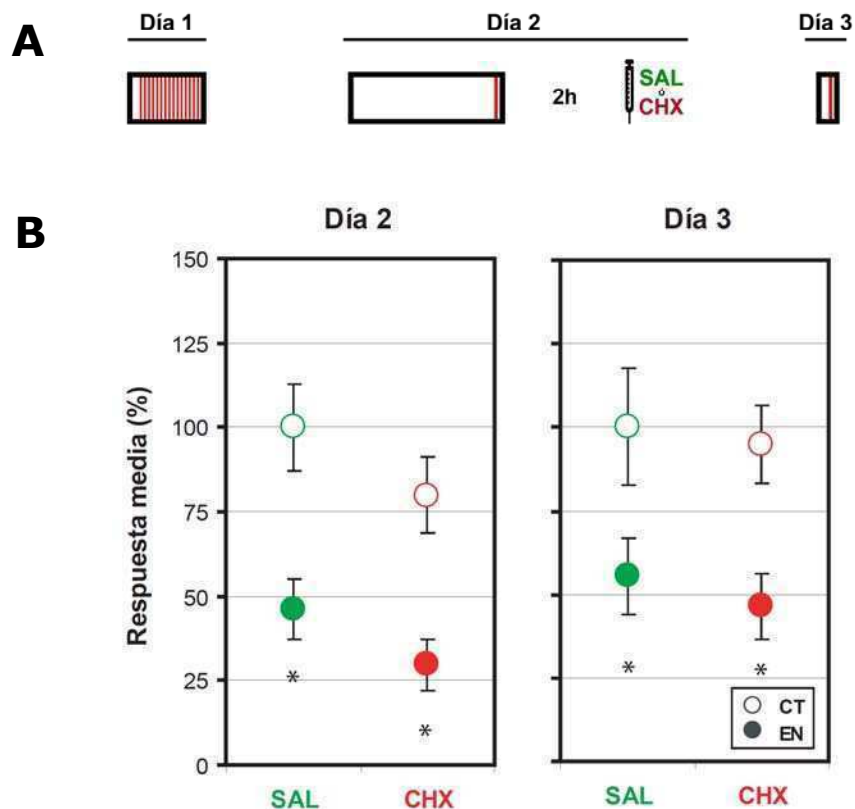


Figura 1.6: La inclusión de un refuerzo antes del fin de la re-exposición de 2 h impide la extinción de largo término de la memoria CS-US. **(A)** Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento durante 2 h, con refuerzo, e inyección de SAL o CHX 2 h después. Día 3: evaluación. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en los Días 2 y 3, normalizada respecto de la respuesta media del grupo SAL-CT. Día 2: ANOVA $F(3,128) = 10.1$, $P < 5 \times 10^{-5}$. SAL-CT > SAL-EN: $p < 0.001$. CHX-CT > CHX-EN: $p < 0.001$. Día 3: ANOVA $F(3,128) = 4.25$, $P < 0.01$. SAL-CT > SAL-EN: $p < 0.01$. CHX-CT > CHX-EN: $p < 0.01$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 1.1.

Alternativamente, podría pensarse que, si bien la *inducción* de la extinción (entendida como la conjunción de las condiciones necesarias y suficientes para que la extinción ocurra) requiere una re-exposición mínima de sólo 1 hora (Pedreira & Maldonado 2003), el proceso de

formación y expresión de esta memoria podría requerir de un tiempo mayor, motivo por el cual no es detectada aún a las 2 h (Fig. 1.6) pero sí en el Día 3 (Fig. 1.5). Bajo esta hipótesis alternativa, entonces, no se estaría evidenciando una extinción intra-sesión a causa de la cinética intrínseca al proceso, y no porque el fin de la re-exposición sea un factor determinante. Para poner a prueba la hipótesis de que el fin de la re-exposición *per se* es determinante para la inducción de la extinción, es decir que este evento forma parte de esa conjunción de condiciones necesarias, evaluamos a continuación el efecto de este evento, el fin de la re-exposición, sobre la extinción de la memoria. El abordaje experimental consistió en re-exponer en el Día 2 a los cangrejos al contexto del entrenamiento incluyendo o no una interrupción de esta re-exposición antes de la evaluación. De este modo, si el fin de la re-exposición *per se* es un evento necesario para la extinción, esperamos que la memoria se encuentre extinguida sólo en aquellos animales cuya re-exposición resultó interrumpida. Caso contrario, todos los animales deberían mostrar retención de la vieja memoria. Adicionalmente, este experimento nos permitirá evaluar si la memoria de extinción ya se expresa a tiempos más cortos, menores a 24 h.

Con este objetivo, utilizamos simultáneamente dos grupos distintos de cangrejos entrenados (Día 1), con sus respectivos controles no entrenados, que en el Día 2 siguieron distintos protocolos comportamentales. El primer grupo (re-exposición continua, CONT), en el Día 2 fue re-expuesto al contexto del entrenamiento durante un período ininterrumpido de 6 h y recibió un ensayo de evaluación antes del fin de la re-exposición. Simultáneamente, el segundo grupo (re-exposición interrumpida, INT), en el Día 2 fue re-expuesto sin refuerzo durante un período de sólo 2 h, y 4 h después (transcurridas en otro contexto) fue colocado nuevamente en el contexto del entrenamiento y después de 5 min recibió un ensayo de evaluación, en el mismo momento que el primer grupo. Finalmente, todos los cangrejos fueron evaluados nuevamente 24 h después, en el Día 3 (Fig. 1.7A).

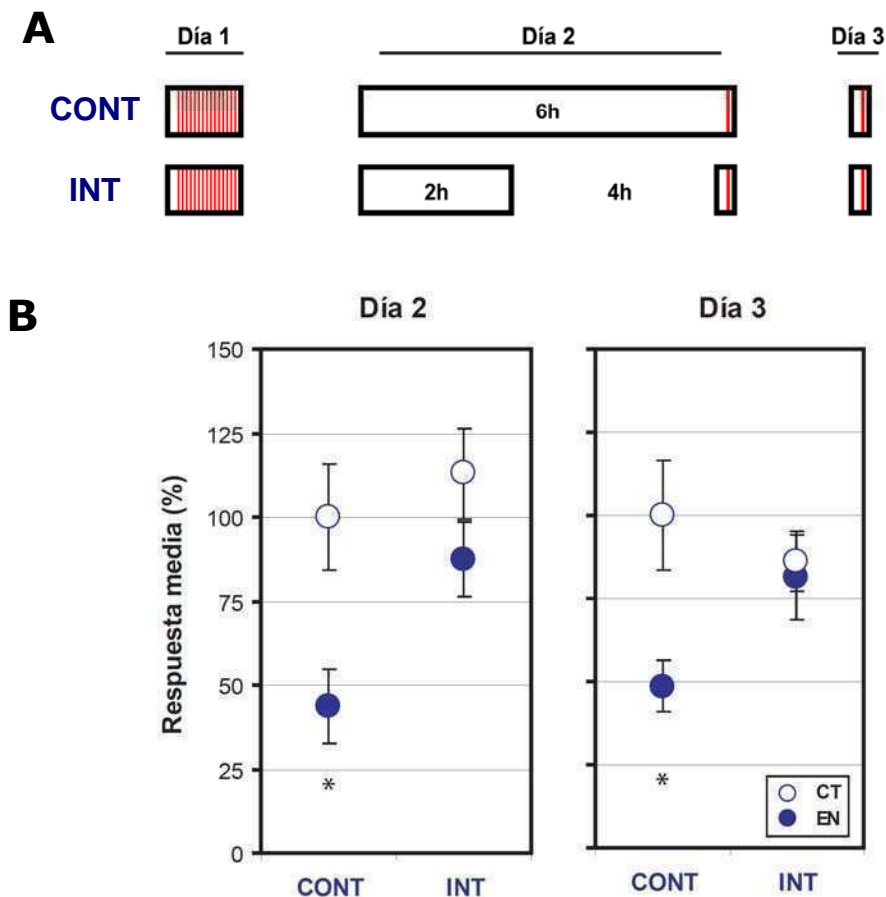


Figura 1.7: El fin de la re-exposición es necesario para la extinción de la memoria CS-US. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento durante 6 h con refuerzo (CONT), o bien durante 2 h sin refuerzo y, 4 h después, nuevamente 5 min con refuerzo (INT). Día 3: evaluación. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en los Días 2 y 3, normalizada respecto de la respuesta media del grupo CONT-CT. Día 2: ANOVA $F(3,156) = 5.09, P < 0.01$. CONT-CT>CONT-EN: $p < 0.01$. INT-CT~INT-EN: $p = 0.16$. Día 3: ANOVA $F(3,156) = 3.21, P < 0.02$. CONT-CT>CONT-EN: $p < 0.01$. INT-CT~INT-EN: $p = 0.79$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 1.1.

En los resultados del Día 2 (Fig. 1.7B) observamos que el grupo re-expuesto de forma continua (CONT) presenta retención de la memoria CS-US. Esto demuestra una vez más que una evaluación presentada dentro del período de re-exposición es incapaz de revelar una extinción intra-sesión, incluso tras un período tan largo como 6 h. Este resultado está en línea con aquel del experimento anterior (Fig.

1.6) y con los antecedentes de Tomsic *et al.* (1998). Por su parte, el grupo que pasó 4 h fuera del contexto del entrenamiento (INT), mostró en la evaluación que la memoria CS-US ya estaba extinguida. De este modo, los resultados sugieren que si el grupo CONT no muestra extinción esto no se debe a que la memoria de extinción no tuvo tiempo de formarse y expresarse durante la extensa re-exposición dado que a igual tiempo transcurrido, el grupo INT sí muestra extinción. Los resultados apoyan entonces la hipótesis de la necesidad de la salida del contexto. Por lo tanto, concluimos que, además de una larga duración de la re-exposición y la no ocurrencia del refuerzo, el fin de la re-exposición es una condición necesaria para la inducción de la extinción de la memoria. Asimismo podemos concluir que la extinción puede expresarse ya a las 4 hs después del fin de la re-exposición.

Finalmente, en el Día 3 el grupo CONT mostró una vez más retención CS-US, mientras que el grupo INT volvió a revelar una memoria extinguida. Es decir, el patrón de resultados fue el mismo que en el Día 2. Los resultados de la evaluación del Día 3 nos llevan a otras dos conclusiones. La primera es que, al igual que en el experimento anterior (Fig. 1.6), la inclusión del refuerzo antes del fin de la re-exposición (grupo CONT) no sólo revela que no hubo extinción intra-sesión sino que además, como refuerzo, actúa impidiendo la subsiguiente extinción de la memoria, tras la salida del contexto. Incluso en este caso, tras una extensa re-exposición de 6 h. Alternativamente, tanto en el experimento anterior como en éste podría argumentarse que, aún presentando el refuerzo la memoria CS-US resulta extinguida *tras* la salida del contexto, pero que la retención observada en el Día 3 se debe a que la memoria CS-US fue de algún modo rescatada a largo término por efecto del refuerzo del Día 2, ya sea operando como re-entrenamiento o reinstalando la vieja memoria (reinstatement). La segunda conclusión que se extrae de los resultados del Día 3, sin embargo, se opone a esta interpretación alternativa: el resultado observado en el grupo INT demuestra que una vez que la

memoria resultó extinguida, la presentación posterior de un único refuerzo en el contexto del entrenamiento no es suficiente para que la memoria CS-US sea rescatada 24 h después. Por el contrario, una vez que la extinción fue inducida tras la re-exposición larga, a pesar del refuerzo posterior ésta persiste a largo término. Por lo tanto, de los resultados del Día 3 concluimos que el refuerzo opera impidiendo que la extinción se dispare.

2.3 – Discusión

Rol del refuerzo, antes y después del fin de la re-exposición

Dos conclusiones centrales emergen de esta segunda serie de experimentos.

En primer lugar, se evidencia que también en el marco de una re-exposición larga al contexto del entrenamiento la ausencia o presencia del refuerzo juega un papel clave, habilitando o impidiendo la inducción de la extinción de la memoria, del mismo modo que ocurre con la reconsolidación en el marco de una re-exposición corta.

En segundo lugar, la presencia misma del refuerzo en su papel de evaluador de la memoria nos muestra que tras una larga re-exposición al contexto, de hasta incluso 6 h de duración, la memoria CS-US permanece intacta y expresada hasta tanto la re-exposición no concluya. Es decir que el fin de la re-exposición al contexto es un evento necesario para la inducción de la extinción de la memoria.

Dentro del marco teórico propuesto en la literatura (Myers & Davis 2002), podría pensarse que durante el entrenamiento de extinción tiene lugar un fenómeno basado en una competencia cuantitativa entre dos asociaciones, CS-no US durante la larga re-exposición y, eventualmente, CS-US si se incluye un refuerzo. Sin embargo, en estos

experimentos, el hecho de que un único refuerzo presentado antes del fin de la re-exposición tenga la capacidad de contrarrestar un entrenamiento de extinción de hasta 6 h (Fig. 1.7, Día 3, CONT) llevaría quizás a pensar en un efecto del refuerzo más bien de tipo cualitativo sobre la experiencia ocurrida, en términos de habilitar o no habilitar a modo de todo-o-nada el proceso de extinción de la memoria. Apoya esta hipótesis el hallazgo de que si la presentación del refuerzo ocurre una vez que la memoria ya resultó extinguida no se evidencia efecto alguno sobre la memoria de extinción a largo término (Fig. 1.7, Día 3, INT), incluso con una re-exposición mucho más breve que en el caso anterior (2 h vs 6 h). Es decir, una vez inducida la extinción, el refuerzo no es capaz de revertir los efectos de una re-exposición de “apenas” 2 h. Bajo esta hipótesis, entonces, no tiene el mismo valor un refuerzo presentado una vez que la memoria resultó extinguida que un refuerzo presentado antes de que la extinción se dispare. En otras palabras, el refuerzo adquiere características cualitativamente distintas de acuerdo a si es presentado antes o después del fin de la re-exposición. Estas últimas conclusiones ponen en relieve no sólo el papel central del refuerzo sino además, una vez más, la importancia del fin de la re-exposición como factor determinante de la inducción de la extinción, ya que demuestran que el factor determinante es la relación temporal entre refuerzo y fin de la re-exposición.

En la Discusión General integraremos estos resultados con aquellos obtenidos en la sección anterior y propondremos una interpretación acerca de la implicancia de estos hallazgos en relación a los procesos de reconsolidación y extinción de la memoria.

CAPÍTULO II

El fin del CS y el destino de la vieja memoria

1 – Dinámica de la extinción de la memoria

1.1 – Introducción

En el capítulo anterior concluimos que el fin de la re-exposición al contexto del entrenamiento es necesario para la inducción de la extinción, dado que al evaluar la memoria durante la re-exposición se observa invariablemente retención de la vieja memoria, la memoria CS-US. Considerando que la extinción de la memoria CS-US está dada por la adquisición de una nueva memoria CS-no US que inhibe la expresión de la anterior, esta conclusión implicaría que la adquisición de esta nueva memoria no ocurre mientras los animales permanecen en el contexto.

Este hallazgo va en contra de la visión más extendida del fenómeno, que comúnmente encuentra que la memoria CS-US es extinguida de forma gradual a lo largo del entrenamiento de extinción (extinción intra-sesión) (Pavlov 1927; Santini *et al.* 2001; Haselgrove & Pearce 2003; Lebron *et al.* 2004). Es necesario en este punto abordar las siguientes consideraciones. Si, en concordancia con lo que nuestros resultados muestran, el fin del CS tiene una relevancia central en la inducción de la extinción, se presentan dos situaciones muy distintas de acuerdo a si la extinción es inducida por un entrenamiento de *extinción de ensayos múltiples* o si es inducida por un entrenamiento de *extinción de ensayo único*. En el primer caso, al lograrse la extinción presentando en una sesión múltiples CSs no reforzados, la observación de una desaparición gradual de la respuesta condicionada no estaría en desacuerdo con nuestra hipótesis, ya que en cada ensayo sucesivo se estaría observando la extinción inducida por el ensayo anterior. En el segundo caso, en cambio, donde la extinción se logra por la presentación de un único CS no reforzado, a menudo de duración considerable, las observaciones en otros modelos de una extinción intra-sesión (e.g. Cain *et al.* 2002; Suzuki *et al.* 2004) requieren de otra explicación que las justifique.

Dada esta discrepancia, y con el fin de establecer la generalidad de nuestros hallazgos, nos propusimos abordar un estudio sistemático de la extinción de la memoria contexto-señal en el cangrejo como consecuencia de la re-exposición al contexto durante distintos períodos de tiempo, evaluando la memoria antes del fin de esta re-exposición o 24 h después.

Seguidamente, centraremos nuestro estudio en la fase de adquisición de la memoria de extinción. Si esta memoria es en efecto adquirida una vez finalizada la re-exposición, nos preguntamos entonces cuándo comienza este proceso, y cuánto tiempo demanda. Es decir, cuánto tiempo toma a la nueva memoria de extinción formarse y expresarse de modo que ya no se observe la memoria original. En el capítulo anterior observamos que esta extinción ya se expresa a las 4 h después del fin de la re-exposición (Fig. 1.7). Intentaremos entonces determinar cuál es el mínimo tiempo necesario tras la re-exposición para poder observar este fenómeno.

Luego, en el marco del estudio de las fases de la extinción, realizaremos un abordaje farmacológico con el fin de intentar disecar las fases de adquisición y de consolidación de la memoria de extinción. Trabajos anteriores de nuestro laboratorio han mostrado que la consolidación de esta memoria de extinción depende de la síntesis de proteínas, una característica universal de las memorias de largo término, durante un período menor a 6 h después del fin de la re-exposición al contexto (Pedreira & Maldonado 2003). Aunque la síntesis proteica es requerida generalmente sólo para la consolidación de las memorias y no así para su adquisición, hay antecedentes en la literatura de trabajos en ratas en los que se muestra un requerimiento de síntesis proteica para la expresión de la memoria de extinción a tiempos tan cortos como 20 min (Lin *et al.* 2003c). Por otra parte, dado que en este paradigma comportamental en cangrejos la adquisición de la memoria de extinción requiere de una experiencia comportamental con una

duración extensa, del orden de las horas, resulta de interés evaluar la posibilidad de que requiera de la síntesis de proteínas.

Otro mecanismo molecular de la extinción que ha sido frecuentemente observado en diversos trabajos en otros modelos es la actividad de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA, aunque los resultados varían respecto de si estos son requeridos para la adquisición o para la consolidación de la memoria de extinción. Por lo tanto, resulta de interés determinar cuál es el rol de estos receptores en la extinción en el cangrejo. La existencia de estos receptores en cangrejos ha sido evidenciada por métodos de inmunodetección (L. Pérez-Cuesta, comunicación personal; Y. Hepp, comunicación personal), y más indirectamente por el efecto amnésico de drogas que en vertebrados funcionan como antagonistas específicos, como MK-801 o AP5 (Pedreira *et al.* 2002; Troncoso & Maldonado 2002). Por este motivo, nos referiremos a ellos como receptores NMDA-like (NMDA_L). No obstante, la presencia de estos receptores en crustáceos ha sido frecuentemente observada en otros trabajos (Pfeiffer-Linn & Glantz 1991; Parnas *et al.* 1996; Burgess & Derby 1997; Schramm & Dudel 1997; Feinstein *et al.* 1998). En relación a su función en el cangrejo, se ha determinado previamente que tanto la consolidación como la reconsolidación de la memoria contexto-señal depende de estos receptores (Pedreira *et al.* 2002; Troncoso & Maldonado 2002). Por otra parte, experimentos previos (L. Pérez-Cuesta, Seminario de licenciatura, FCEN-UBA) han mostrado que esta extinción requiere de la actividad de receptores NMDA_L. En aquellos experimentos se encontró que el bloqueo de estos receptores mediante una inyección del antagonista no competitivo MK-801 no tenía efecto sobre la extinción de largo término cuando era administrada después de la re-exposición al contexto. Sin embargo, al administrarla antes de la re-exposición sí era capaz de impedir la extinción de largo término. Estos resultados son consistentes con un rol de estos receptores durante la adquisición y no durante la consolidación de la memoria de extinción. Sin embargo, al haber evaluado la memoria

recién a las 24 h resulta difícil descartar que el antagonista haya actuado en una fase muy temprana de la consolidación, no alcanzada por las inyecciones dadas inmediatamente después de la re-exposición. En el presente trabajo, complementaremos aquellos resultados estudiando el efecto de este antagonista sobre la extinción a corto término, para determinar si aquel efecto amnésico se debía a una interferencia sobre la adquisición o sobre la consolidación de esta memoria.

1.2 - Resultados

Una primera serie de experimentos tuvo como objetivo estudiar de modo sistemático la extinción de la memoria contexto-señal durante la presentación del CS, i.e., la re-exposición al contexto del entrenamiento, y a largo término en función del tiempo de re-exposición.

Es necesario recordar una vez más que en este paradigma comportamental la evaluación de la memoria requiere de la presentación del refuerzo (US) que, por otra parte, al ser presentado durante la re-exposición previene la extinción subsiguiente de esta memoria. Por lo tanto, si se desea evaluar el estado de la memoria en un momento dado de la re-exposición al contexto, ya no será posible evaluar nuevamente esa memoria. Por esto, a diferencia de otros paradigmas comportamentales, aquí se requiere de un experimento distinto por cada punto en el tiempo en el que se desee evaluar si la memoria se encuentra extinguida. De este modo, realizamos distintos experimentos en los que los cangrejos fueron re-expuestos al contexto del entrenamiento por distintos tiempos, y evaluamos el estado de la memoria, extinguida o no extinguida, en el momento anterior al fin de la re-exposición (Día 2), o 24 h después (Día 3).

De acuerdo a los antecedentes, al evaluar la memoria a largo término, debería encontrarse retención o extinción de la memoria

dependiendo del tiempo de re-exposición, de acuerdo a si éste fue suficiente o no para inducir la extinción de la vieja memoria (Pedreira & Maldonado 2003). Por su parte, de acuerdo a la hipótesis propuesta anteriormente, al evaluar la memoria antes del fin de la re-exposición (antes de que la extinción sea inducida) debería encontrarse siempre retención de la vieja memoria CS-US, independientemente del tiempo de re-exposición.

Para poner a prueba esta hipótesis, en distintos experimentos entrenamos cangrejos en el Día 1, y en el Día 2 los re-expusimos al contexto del entrenamiento durante 5 min, 1 h, 2 h ó 3 h, sin presentar el refuerzo en ningún momento. Por último, en el Día 3 evaluamos la memoria (Fig. **2.1A**). En el ensayo de evaluación se observa que los animales re-expuestos en el Día 2 por tiempos más cortos, 5 min ó 1 h, mostraron en el Día 3 retención de la vieja memoria, mientras que aquellos que en el Día 2 fueron re-expuestos durante tiempos mayores, 2 ó 3 h, mostraron una extinción de largo término (Fig. **2.1B**). Esta diferencia en el resultado experimental, retención o extinción, de acuerdo al tiempo de re-exposición está de acuerdo con los antecedentes (Pedreira & Maldonado 2003), aunque en aquel caso se había observado extinción de la memoria CS-US incluso con una re-exposición de 1 h. Esta diferencia podría deberse a que, como señalamos anteriormente, esta duración se encuentra cercana al umbral (45 min – 1 h) por debajo del cual el proceso inducido por la re-exposición es la reconsolidación de la memoria en lugar de la extinción (Pedreira & Maldonado 2003). El hecho de trabajar con poblaciones naturales puede contribuir a explicar esta discrepancia dado que factores ambientales, como pueden ser algunos cambios estacionales, podrían influir de modo de manifestarse pequeñas variaciones paramétricas en los fenómenos comportamentales descritos, que se hacen más evidentes en sus límites. Es por este motivo que, a partir de aquel estudio, habíamos decidido adoptar como protocolo estándar de entrenamiento de extinción un período de 2 h de re-exposición al

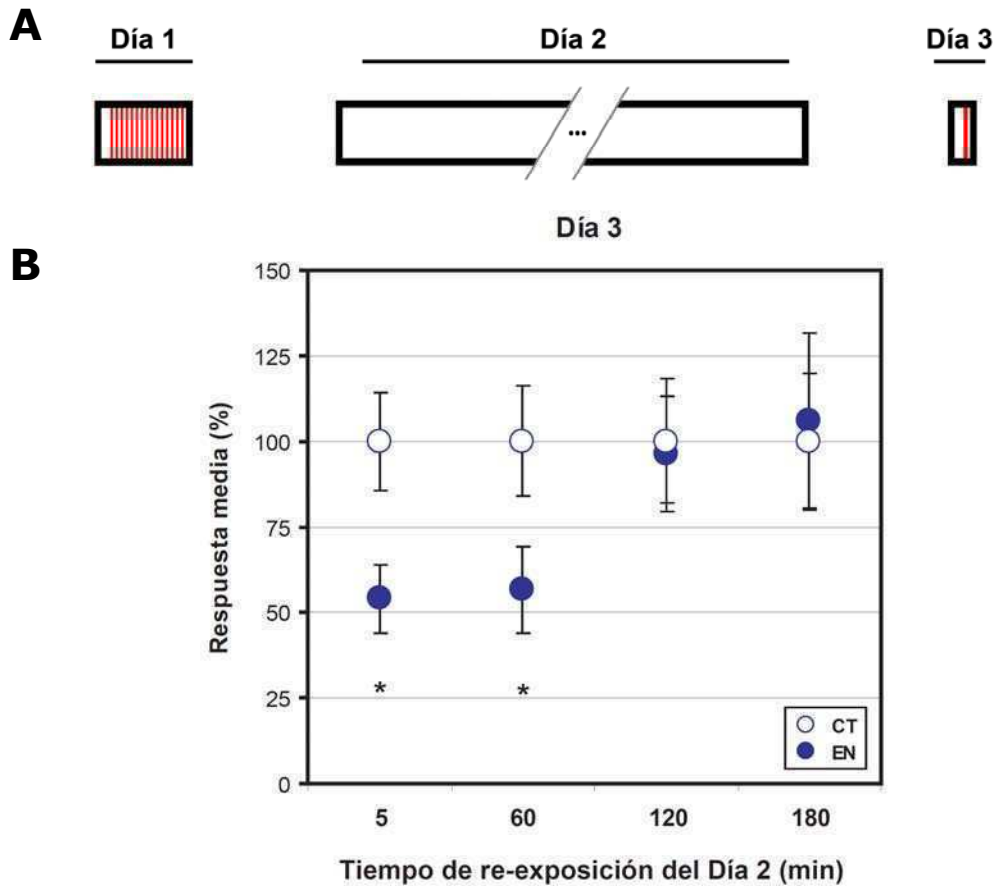


Figura 2.1: La extinción de largo término requiere una re-exposición no reforzada de más de 1 h de duración. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento sin refuerzo durante 5, 60, 120 ó 180 min. Día 3: evaluación. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 3, normalizada respecto de la respuesta media de cada grupo CT. 5min, CT>EN: $p=0.02$. 60min, CT>EN: $p<0.04$. 120min, CT~EN: $p=0.88$. 180min, CT~EN: $p=0.85$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 1.1.

contexto. No obstante, los experimentos en que el tiempo de re-exposición fue de 5 min, 1 h y 2 h fueron replicados dos veces (no se muestra). Los mismos resultados volvieron a obtenerse para los animales re-expuestos 5 min (CT>EN: $p<0,01$ y $p<0,03$), ó 2 h (CT~EN: $p=0,56$ y $p=0,75$), mientras que aquellos re-expuestos 1 h mostraron retención CS-US en una de las réplicas (CT>EN: $p<0,02$) y extinción en la otra (CT~EN: $p=0,55$). Estas variaciones en torno al límite son consistentes con la explicación propuesta.

Para evaluar el estado de la memoria *durante* la re-exposición, a estos mismos tiempos, repetimos los experimentos anteriores pero en lugar de evaluar la memoria en el Día 3 la evaluamos en el Día 2 mediante un ensayo (US) presentado antes del fin de una re-exposición de 5 min, 1 h, 2 h, 3 h, o incluso 6 h (Fig. 2.2A).

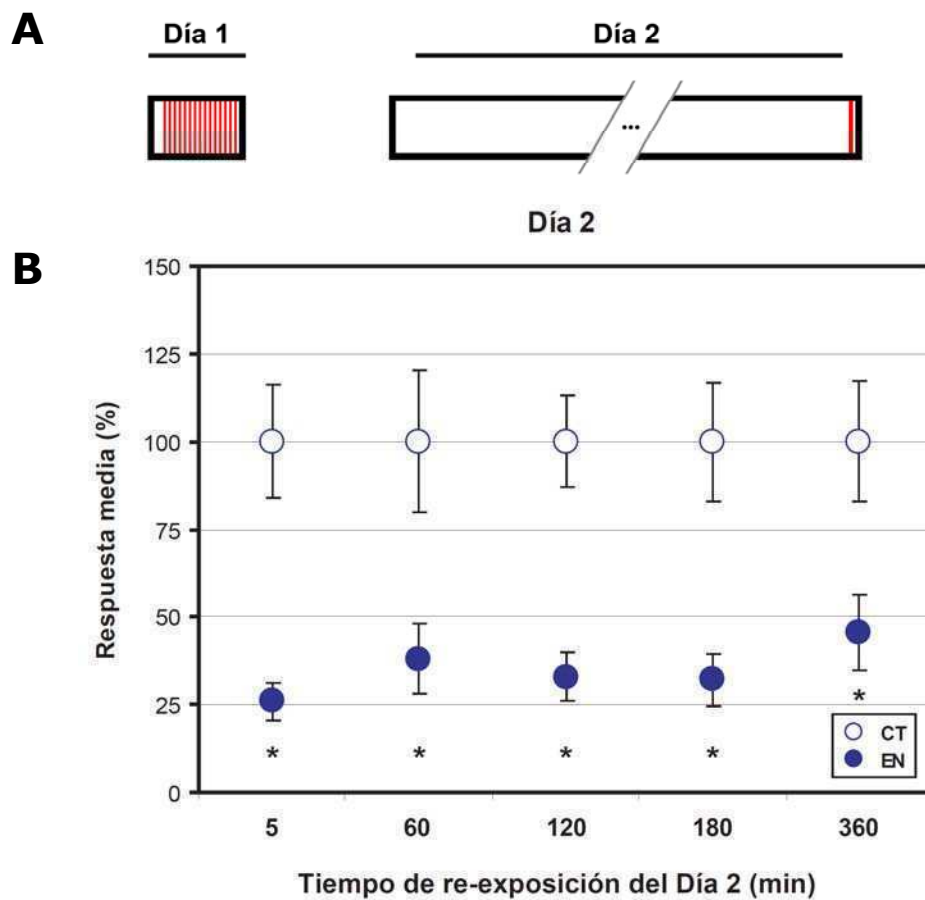


Figura 2.2: La extinción de la memoria nunca se expresa durante la re-exposición al contexto del entrenamiento, independientemente de su duración. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento durante 5, 60, 120, 180 ó 360 min, con refuerzo al final (evaluación). **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2, normalizada respecto de la respuesta media de cada grupo CT. 5min, CT>EN: $p < 0.0001$. 60min, CT>EN: $p < 0.007$. 120min, CT>EN: $p < 0.0001$. 180min, CT>EN: $p < 0.0004$. 360min, CT>EN: $p < 0.009$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 1.1.

A diferencia de los resultados observados a largo término, al evaluar la memoria durante la re-exposición se observó retención de la vieja memoria en todos los casos; es decir, no se evidenció extinción de la memoria, independientemente del tiempo de re-exposición al contexto (Fig. 2.2B). Estos resultados están de acuerdo con la predicción, y por lo tanto apoyan la hipótesis de que la extinción de la memoria no se dispara durante la re-exposición, sin importar su duración.

En resumen, esta última serie de experimentos muestra que la extinción de la memoria requiere de una re-exposición al contexto de larga duración, y que esta extinción no se evidencia inmediatamente antes del fin de la re-exposición (Fig. 2.2) pero sí 24 h después (Fig. 2.1). Estos resultados de las evaluaciones de largo término están de acuerdo con los antecedentes de nuestro laboratorio (Pedreira & Maldonado 2003), y los de las evaluaciones intra-sesión están de acuerdo con las conclusiones que obtuvimos en el capítulo anterior y con los antecedentes (Tomsic *et al.* 1998), mostrando que la extinción no es inducida durante sino recién después de una re-exposición larga al contexto.

En base a estas conclusiones, nos preguntamos entonces cuánto tiempo toma este proceso de adquisición y expresión de esta nueva memoria de extinción. Es decir, a partir de qué momento después del fin del CS puede encontrarse que la vieja memoria CS-US se encuentra extinguida. En este sentido, uno de los resultados del capítulo anterior (Fig. 1.7) muestra que 4 h después del fin de la re-exposición ya se evidencia una extinción de la vieja memoria.

El siguiente objetivo consistió en evaluar si esta memoria de extinción puede observarse a tiempos más cortos, del orden de los minutos. Para esto, en el siguiente experimento entrenamos a los cangrejos en el Día 1, y en el Día 2 los re-expusimos al contexto del entrenamiento durante 2 h y a continuación los retiramos y los

colocamos en un contexto diferente durante un período de 5 min. Seguidamente, volvimos a colocar a los animales en el contexto del entrenamiento y 5 min después les presentamos un ensayo de evaluación (grupo extinguido, EXT). Paralelamente, corrimos otro grupo de animales que siguió un protocolo idéntico pero con la sola diferencia de que un refuerzo fue incluido antes del fin de la re-exposición de 2 h (grupo reforzado, REF) (Fig. 2.3A). Este grupo experimental fue incluido

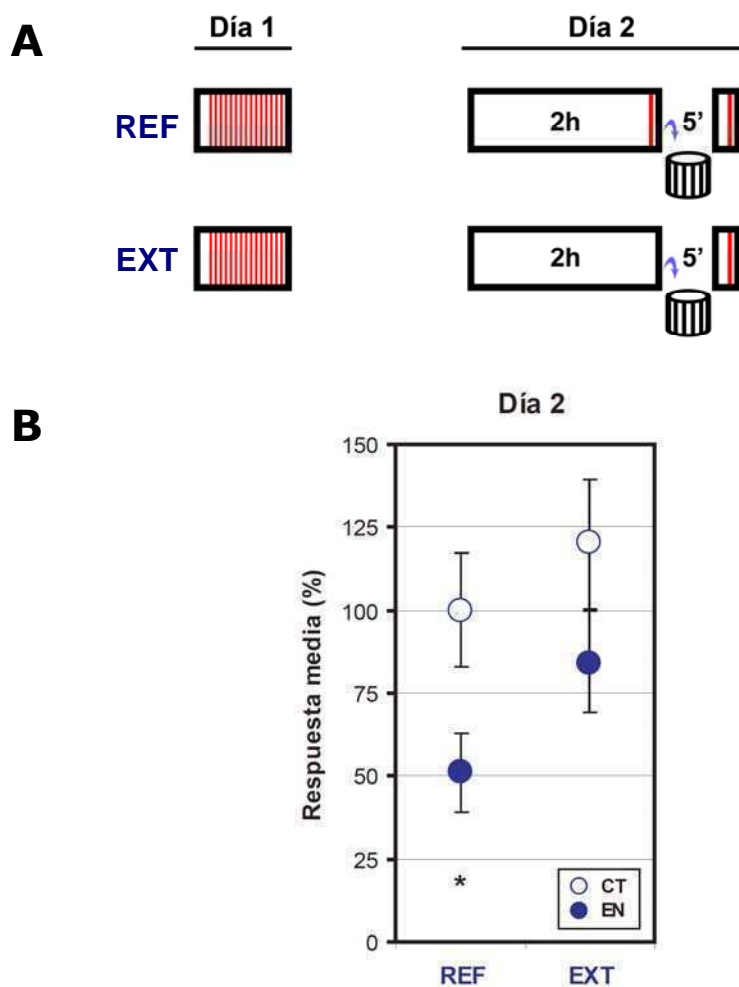


Figura 2.3: La extinción de la memoria se expresa 10 min después del fin de la re-exposición. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento durante 2h, con (REF) o sin refuerzo (EXT) al final. Tras 5 min en un contexto distinto todos los animales vuelven al contexto del entrenamiento y son evaluados. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2, normalizada respecto de la respuesta media del grupo REF-CT. ANOVA: $F(3,127) = 3.31, P < 0.022$. REF-CT > REF-EN: $P < 0.033$. EXT-CT \sim EXT-EN: $P = 0.12$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 1.1. Cilindro rayado: contexto distinto.

como control de retención CS-US, ya que en experimentos preliminares se observó que la manipulación repetida de los cangrejos en tiempos muy breves, del orden del minuto, puede producir efectos inespecíficos sobre el comportamiento a evaluar. De este modo, de no haber efectos inespecíficos de la manipulación de los animales a tiempos de 5 min, en este grupo esperamos encontrar retención CS-US a causa del refuerzo presentado antes del fin de la re-exposición, mientras que el grupo EXT, que no recibió el refuerzo, debería mostrar extinción o retención de la vieja memoria en función de si el breve tiempo transcurrido entre el fin de la re-exposición y el ensayo de evaluación fue o no suficiente para que esta memoria de extinción sea adquirida. En los resultados podemos observar que el ensayo de evaluación mostró retención de la vieja memoria en aquellos cangrejos que habían recibido un ensayo previo (REF), mientras que los cangrejos que no habían recibido el refuerzo previo a la salida del contexto (EXT) no mostraron memoria CS-US (Fig. **2.3B**). Dado que los cangrejos con la re-exposición reforzada mostraron retención CS-US, los resultados de este último grupo experimental son consistentes con una extinción de la vieja memoria, que ya se expresa a tiempos tan cortos como 10 min tras el fin de la re-exposición (5 min en el contexto diferente + 5 min en el contexto del entrenamiento previo al ensayo de evaluación).

A continuación nos propusimos evaluar si esta extinción puede observarse a tiempos aún más cortos. Para esto, fue necesario poner a punto una nueva metodología experimental que nos permitiera señalar el fin de la re-exposición al contexto del entrenamiento pero evitando los efectos inespecíficos mencionados antes, producto de la manipulación repetida de los animales. De este modo, el abordaje consistió en producir un cambio virtual en el contexto del entrenamiento, iluminando la arena experimental de un modo completamente diferente, únicamente con una lámpara tenue ubicada debajo de ésta, lo que provee un entorno visualmente muy distinto (ver Materiales y Métodos para una descripción detallada). De aquí en

adelante, cuando nos refiramos al contexto del entrenamiento, o *contexto estándar*, entenderemos por esto al contexto con la iluminación estándar, dirigida desde arriba, como ha sido presentado siempre hasta ahora en las sesiones de entrenamiento, re-exposición y evaluación. Del mismo modo, cuando hablemos de la *re*-exposición de los animales nos estaremos refiriendo, como hasta ahora, a la re-exposición a este contexto, el contexto al que ya fueron expuestos. Por su parte, para referirnos al contexto iluminado desde abajo, usaremos los términos *contexto alternativo*.

Utilizando esta metodología, en la siguiente serie de experimentos los animales entrenados en el Día 1, serán re-expuestos en el Día 2 al contexto estándar (contexto del entrenamiento) durante 2 h (entrenamiento de extinción), luego se les presentará el contexto alternativo y a continuación se restaurará la iluminación reestableciendo el contexto estándar y se evaluará la memoria presentando un ensayo. En primer término, para homologar la metodología es necesario demostrar que este procedimiento es equivalente a retirar a los animales del contexto y volver a colocarlos para la evaluación. Para esto, dos grupos de animales entrenados en el Día 1 (y sus respectivos controles no entrenados) fueron re-expuestos en el Día 2 al contexto estándar durante 2 h. A continuación, uno de los grupos (DIF) fue colocado en un contexto físicamente diferente durante un período de 5 min, al igual que en el experimento anterior (Fig. 2.3, EXT), mientras que el otro grupo (ALT) permaneció en el mismo contexto físico, pero iluminado como contexto alternativo durante el mismo período de tiempo. Seguido a esto, todos los cangrejos volvieron al contexto estándar para la sesión de evaluación y, tras 5 min en el contexto estándar recibieron el ensayo de evaluación (Fig. 2.4A). Dado que, de acuerdo a lo observado en el experimento anterior, la extinción ya se expresa a los 10 min del fin de la re-exposición, esperamos que el grupo DIF muestre extinción de la memoria, y que el grupo ALT muestre extinción o retención de la vieja memoria en función de si este

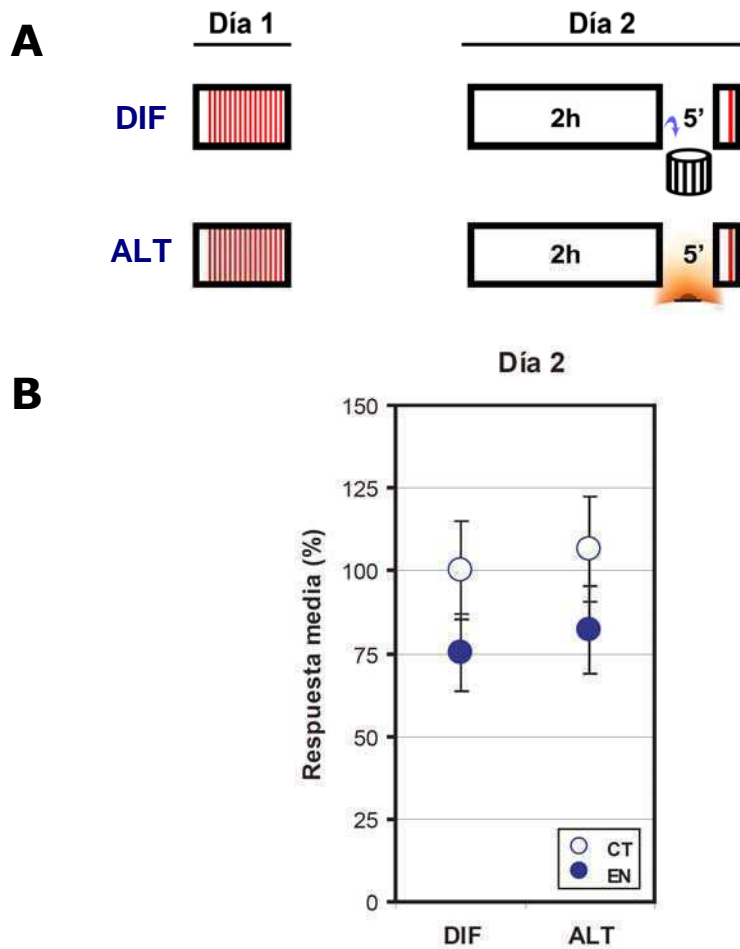


Figura 2.4: La interrupción de la re-exposición por la presentación del contexto alternativo (luz inferior) durante 5 min permite la expresión de la memoria de extinción. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento durante 2h, sin refuerzo. Tras 5 min en un contexto distinto (DIF) o en el contexto alternativo (ALT) todos los animales vuelven al contexto del entrenamiento y son evaluados. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2, normalizada respecto de la respuesta media del grupo DIF-CT. ANOVA: $F(3,148) = 171.84$, $P = 0.34$. DIF-CT \sim DIF-EN: $P = 0.23$. ALT-CT \sim ALT-EN: $P = 0.19$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 1.1. Cilindro rayado: contexto distinto. Luz naranja: contexto alternativo (iluminación desde abajo).

cambio de contexto virtual es o no efectivo para señalar el fin de la re-exposición. Los resultados del ensayo de evaluación mostraron que, tanto los animales que pasaron 5 min en otro contexto físico como los animales que pasaron los 5 min en el contexto alternativo ya no

evidencian la vieja memoria CS-US (Fig. **2.4B**). Por lo tanto, esto implicaría que el cambio de luz (contexto alternativo) es efectivo como método para interrumpir la re-exposición al contexto estándar. Por otra parte, al igual que en el resto de los experimentos de esta tesis, no se evidencian diferencias entre ambos grupos controles no entrenados (CT-DIF~CT-ALT), lo que en este caso permite descartar que la falta de diferencia significativa entre controles y entrenados que pasaron por el contexto alternativo pueda deberse a un cambio inespecífico en los niveles de respuesta generales de todos los animales. Sin embargo, esta ausencia de memoria CS-US en los animales que pasaron por el contexto alternativo (ALT), en lugar de deberse a una extinción sí podría estar dada por una amnesia, causada por efectos inespecíficos del cambio de luces. Para controlar esta posibilidad, repetimos el tratamiento experimental del grupo ALT pero esta vez corriéndolo junto con otro grupo con idéntico protocolo pero cuya re-exposición inicial duró sólo 5 min en vez de 2 h (Fig. **2.5A**). De este modo, si el cambio de luces *per se* produce un efecto inespecífico sobre la memoria a evaluarse poco después, esperamos encontrar amnesia en ambos grupos. Caso contrario, el grupo que estuvo re-expuesto sólo 5 min debería mostrar retención CS-US, ya que esta re-exposición es insuficiente para inducir una extinción. Efectivamente, los resultados de la evaluación mostraron retención de la vieja memoria para los cangrejos re-expuestos 5 min pero no para aquellos re-expuestos 2 h (Fig. **2.5B**), pudiendo atribuirse entonces la falta de retención CS-US sólo al período de 2 h de re-exposición, lo que es consistente con una extinción de la memoria.

Realizados estos controles, a continuación abordamos la pregunta de cuánto tiempo es necesario tras el fin de la re-exposición para que se adquiera esta memoria de extinción, que ya encontramos expresada a los 10 min. Para esto, en el Día 1 entrenamos cangrejos y en el Día 2 los re-expusimos al contexto estándar durante 2 h. Seguidamente, en distintos experimentos, los grupos experimentales fueron expuestos al

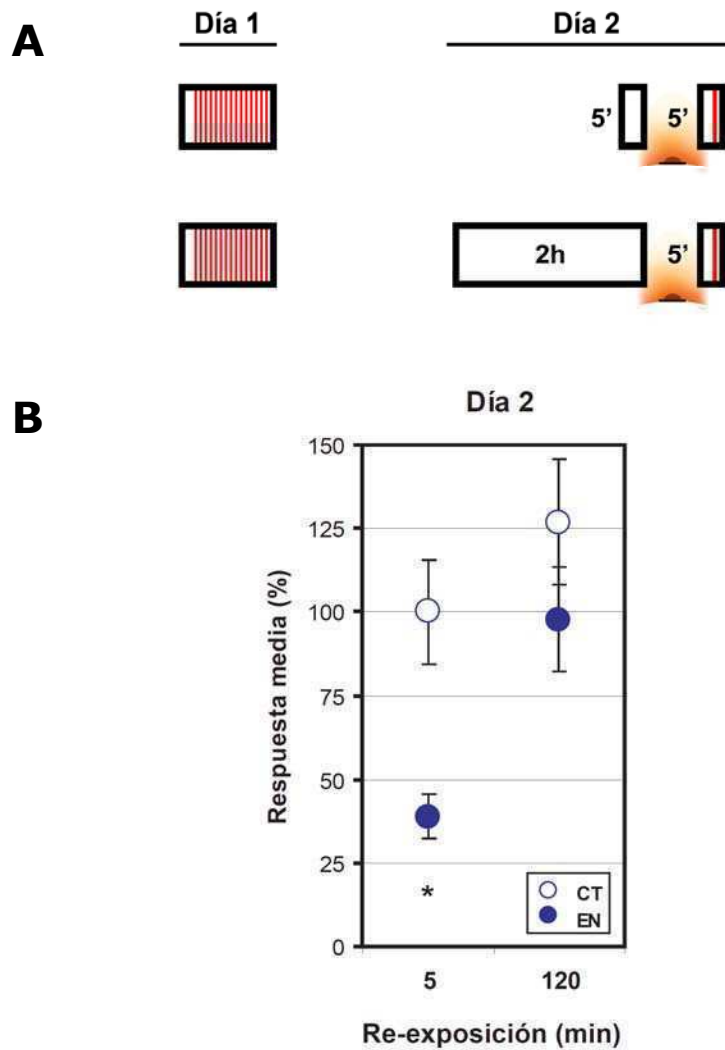


Figura 2.5: La falta de memoria CS-US tras la presentación del contexto alternativo depende de la re-exposición de 2 h. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento sin refuerzo durante 5 min ó 2h. Tras 5 min en el contexto alternativo todos los animales vuelven al contexto del entrenamiento y son evaluados. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2, normalizada respecto de la respuesta media del grupo 5min-CT. ANOVA: $F(3,150) = 6.46$, $P < 0.0004$; 5min, CT>EN: $P < 0.003$. 2h, CT~EN: $P = 0.16$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 2.4.

contexto alternativo durante tiempos que van desde los 9 seg hasta los 5 min, o bien se omitió la exposición al contexto alternativo (0 seg). A continuación, todos los cangrejos fueron evaluados en el contexto estándar (Fig. 2.6A). En esta serie de experimentos, como el objetivo

fue detectar el mínimo tiempo necesario para evidenciar extinción, el ensayo de evaluación se presentó sólo 9 seg después de reestablecer el contexto estándar. Es decir que la sesión de evaluación consistió de una re-exposición al contexto estándar de sólo 18 seg, de los cuales los últimos 9 correspondieron al ensayo de evaluación. En los resultados podemos observar que la evaluación de la memoria mostró retención CS-US para todos los animales que estuvieron expuestos al contexto alternativo durante 0, 9 ó 27 seg, y mostró extinción de la memoria para todos aquellos que pasaron en el contexto alternativo 45 seg, 1, 4 ó 5 min (Fig. 2.6B).

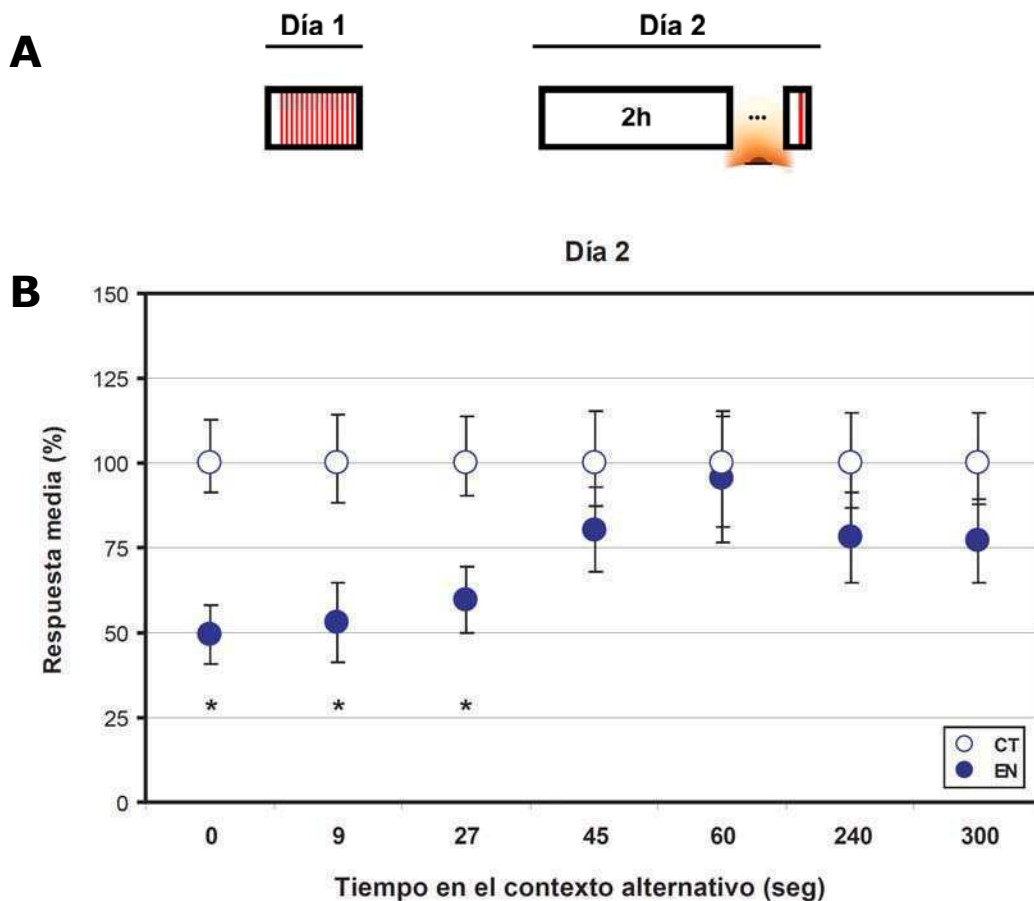


Figura 2.6: La memoria de extinción es expresada menos de 1 min después del fin de la re-exposición de 2 h. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento sin refuerzo durante 2h. Tras cierto tiempo entre 0 y 300 seg en el contexto alternativo todos los animales vuelven al contexto del entrenamiento y son evaluados 9 seg después. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2, normalizada respecto de la respuesta media de cada grupo CT. 0seg, CT>EN: $P < 0.002$. 9seg, CT>EN: $P < 0.01$. 27seg, CT>EN: $P < 0.02$. 45seg, CT>EN: $P = 0.32$. 60seg, CT>EN: $P = 0.84$. 240seg, CT>EN: $P = 0.27$. 300seg, CT~EN: $P = 0.23$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 2.4.

En otras palabras, los cangrejos que recibieron la sesión de evaluación sólo 45 seg después del fin de la re-exposición ya evidenciaron extinción de la memoria. Si tenemos en cuenta que, tras la restauración del contexto estándar transcurrieron otros 9 seg hasta el ensayo de evaluación, podemos considerar que la extinción se está expresando en un tiempo no mayor a 54 seg tras el fin de la re-exposición al contexto del entrenamiento. Por su parte, el hecho de que los animales que estuvieron en el contexto alternativo durante tiempos menores a 45 seg hayan mostrado retención CS-US demuestra asimismo que este breve período de 9 seg transcurridos a continuación en el contexto estándar, previo al ensayo de evaluación, son suficientes para que los cangrejos evoquen normalmente la vieja memoria. De este modo, descartamos que la falta de retención observada tras 45 seg o más en el contexto alternativo se deba a una evocación insuficiente de la memoria CS-US, apoyando entonces la hipótesis de que se debe a la expresión de la memoria de extinción, que por lo tanto ya fue adquirida. Del mismo modo que en la primera serie experimental de este capítulo, repetimos dos veces los experimentos en que los animales fueron expuestos al contexto alternativo durante 45 seg o menos (no se muestra) y obtuvimos los mismos resultados en todos los casos, con excepción de una de las repeticiones a los 27 seg en la que se encontró extinción en lugar de retención CS-US (0 seg: CT>EN, $p<0,002$ y $p<0,008$; 9 seg: CT>EN, $p<0,03$ y $p<0,03$; 27 seg: CT>EN, $p<0,0006$ y CT~EN, $p=0,16$; 45 seg: CT~EN, $p=0,23$ y $p=0,96$). Como mencionamos anteriormente, esta discrepancia en torno al momento que aparece como bisagra para la expresión de la extinción, es susceptible de ocurrir al modificar ligeramente valores paramétricos en una situación de límite, y en particular en poblaciones naturales. Y en este caso, quizá también podría contribuir a esto la variabilidad intrínseca a procesos que ocurren en tiempos tan cortos. De este modo, consideraremos que el tiempo mínimo que los animales deben transcurrir en el contexto alternativo es de 45 seg, un punto en el que los cangrejos nunca mostraron retención de la memoria CS-US.

En resumen, estos resultados muestran que aunque la memoria de extinción puede expresarse a tiempos tan cortos como <1 min tras el fin de la re-exposición, este proceso requiere al menos de algunos segundos para llevarse a cabo (e.g. 9 ó 27 seg). Una explicación alternativa podría ofrecerse para el hecho de que los cangrejos expuestos durante pocos segundos al contexto alternativo no hayan mostrado extinción de la vieja memoria. Podría argumentarse que en estos casos la re-exposición al contexto estándar fue interrumpida durante un tiempo tan breve que los cangrejos no alcanzaron a percibir el cambio de iluminación, o no alcanzaron a percibirlo como un cambio contextual, por lo que se comportaron como si hubieran recibido el ensayo de evaluación directamente sin interrumpir la re-exposición de 2 h. Es decir que, a causa de una limitación perceptual, los cangrejos expuestos al contexto alternativo sólo 9 seg previo a los 9 seg en el contexto estándar (de ahora en más, grupo “9_{ALT} + 9_{EST}”) se comportan como los que no fueron expuestos a este contexto alternativo (grupo “0_{ALT} + 9_{EST}”) (Fig. 2.6). Para controlar esta posibilidad realizamos el siguiente experimento. Se repitió el protocolo comportamental del grupo “9_{ALT} + 9_{EST}”, corriéndolo simultáneamente con otro grupo que siguió idéntico protocolo excepto que entre el contexto alternativo y el ensayo de evaluación se presentó el contexto estándar durante 45 seg en lugar de sólo 9 seg, i.e., 36 seg adicionales (grupo “9_{ALT} + 45_{EST}”) (Fig. 2.7A). De este modo, en este grupo la re-exposición larga recibió una interrupción en el contexto alternativo igual de breve (9 seg) pero la sesión de evaluación fue demorada otros 36 seg, de modo que el ensayo de evaluación se presentó con la misma demora que en el grupo “45_{ALT} + 9_{EST}” del experimento anterior. De acuerdo a la predicción, si un período de 9 seg en el contexto alternativo es insuficiente para percibir un cambio en el contexto, todos los animales en este experimento deberían mostrar retención de la vieja memoria. Si, en cambio, los 9 seg señalizan eficientemente el fin de la larga re-exposición pero son insuficientes para que la memoria de extinción se

forme y se exprese, entonces los animales cuya evaluación es demorada por otros 36 seg en el contexto estándar deberían mostrar extinción de la memoria, ya que el tiempo transcurrido hasta la presentación del ensayo de evaluación (54 seg) fue igual que en el grupo “45_{ALT} + 9_{EST}” de la Fig. 2.6. Al evaluar a los animales, los resultados mostraron, una vez más, retención CS-US para el grupo “9_{ALT} + 9_{EST}” pero no para el grupo “9_{ALT} + 45_{EST}” (Fig. 2.7B). Estos resultados son consistentes con una extinción de la memoria sólo en el grupo “9_{ALT} + 45_{EST}”, demostrando entonces que 9 seg en el contexto alternativo bastan para que los cangrejos perciban el cambio en el contexto, y que el tiempo extra es necesario para formar y expresar la memoria de extinción.

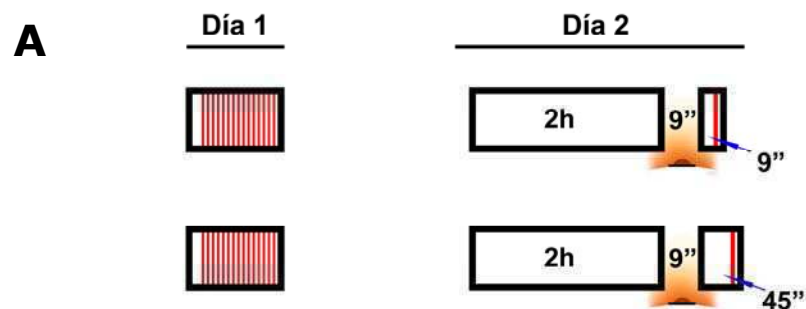
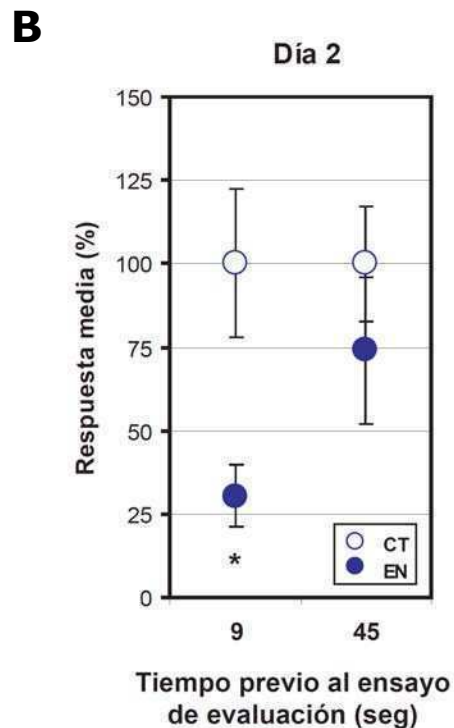


Figura 2.7: La presentación del contexto alternativo durante sólo 9 seg es suficiente para la percibir del fin de la re-exposición larga. (A) Protocolo experimental.

Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento sin refuerzo durante 2h. Tras 9 seg en el contexto alternativo todos los animales vuelven al contexto del entrenamiento y tras 9 seg ó 45 seg son evaluados. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2, normalizada respecto de la respuesta media del grupo 9seg-CT. ANOVA: $F(3,156) = 3.73$, $P < 0.02$. 9seg, CT>EN: $P < 0.005$. 45seg, CT~EN: $P = 0.28$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 2.4.



A continuación, abordamos el objetivo de diseccionar farmacológicamente las fases de adquisición y consolidación de la memoria de extinción. Para ello, estudiamos la susceptibilidad de la memoria de extinción a inyecciones de CHX o de MK-801 administradas a distintos tiempos respecto de la re-exposición de 2 h, y evaluamos esta memoria a corto término (10 min) o a largo término (24 h). Para estudiar el efecto del MK-801 utilizamos una dosis de 10^{-3} M, que resulta efectiva para disrumpir la consolidación y la reconsolidación de la memoria contexto-señal, sin afectar su evocación (Pedreira *et al.* 2002; Troncoso & Maldonado 2002).

En primer lugar, estudiamos el requerimiento de síntesis de proteínas en la extinción de la memoria contexto-señal. Para esto, en la siguiente serie de experimentos en el Día 1 entrenamos distintos grupos de cangrejos, en el Día 2 los inyectamos con SAL ó 15 μ g de CHX y 1 h después los re-expusimos al contexto estándar durante 2 h. En los distintos experimentos, la evaluación fue realizada ya sea inmediatamente antes del fin de la re-exposición (Fig. **2.8A**), o tras 5 min en el contexto alternativo y otros 5 min en el contexto estándar (Fig. **2.9A**), o a las 24 h, en el Día 3 (Fig. **2.10A**).

De acuerdo a los antecedentes (Fig. 1.5; Pedreira & Maldonado 2003) esperamos que en los animales inyectados con CHX la evaluación de largo término (Día 3) muestre una amnesia de la memoria de extinción, es decir, retención de la vieja memoria, mientras que el resultado de la evaluación a corto término (10 min) dependerá de si la adquisición de la memoria de extinción requiere o no de la síntesis proteica, en cuyo caso esperamos observar retención CS-US o extinción, respectivamente. Por último, de acuerdo a las conclusiones del capítulo anterior, dado que durante la re-exposición la vieja memoria aún no resulta labilizada y que la extinción aún no es inducida, esperamos que la expresión de la vieja memoria CS-US evaluada antes del fin de la re-exposición no resulte afectada por la CHX.

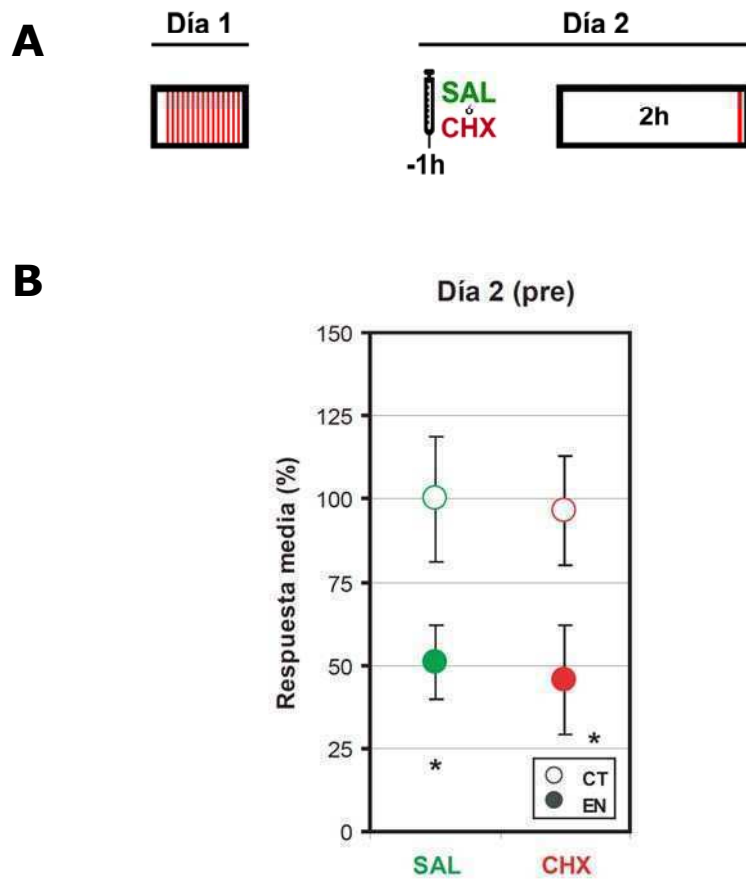


Figura 2.8: La expresión de la memoria CS-US antes del fin de la re-exposición de 2 h no requiere de la síntesis proteica. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: inyección de SAL o CHX y 1 h después re-exposición al contexto del entrenamiento durante 2h con refuerzo al final (evaluación). **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2, normalizada respecto de la respuesta media del grupo SAL-CT. ANOVA: $F(3,116) = 3.31$, $P < 0.02$. SAL, CT>EN: $P < 0.03$. CHX, CT>EN: $P < 0.03$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 2.4.

Efectivamente, al evaluar la memoria en el Día 2 antes del fin de la re-exposición todos los cangrejos mostraron retención CS-US (Fig. 2.8B). Por su parte, al interrumpir la re-exposición presentando el contexto alternativo durante 5 min, en la sesión de evaluación se observó que todos los cangrejos mostraron ya una memoria extinguida (Fig. 2.9B).

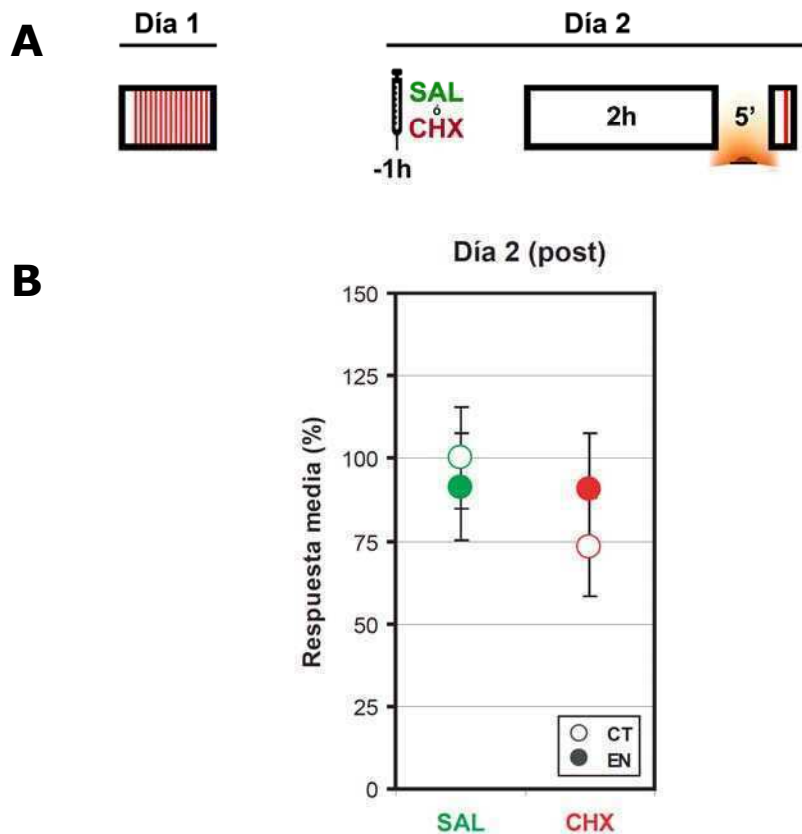


Figura 2.9: La adquisición y expresión de la memoria de extinción 10 min después del fin de la re-exposición de 2 h no requiere de la síntesis proteica. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: inyección de SAL o CHX y 1 h después re-exposición al contexto del entrenamiento durante 2h sin refuerzo. Evaluación tras 5 min en el contexto alternativo. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2, normalizada respecto de la respuesta media del grupo SAL-CT. ANOVA: $F(3,153) = 0.5$, $P = 0.68$. SAL, CT~EN: $P = 0.7$. CHX, CT~EN: $P = 0.44$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 2.4.

Este resultado, por un lado confirma los hallazgos anteriores, mostrando que la extinción de la memoria ya ocurrió pocos minutos después del fin de la re-exposición (grupo SAL), y por otro lado, pone en evidencia que la adquisición de esta memoria de extinción no depende de la síntesis proteica (grupo CHX). A su vez, el resultado de la evaluación previa al fin de la re-exposición mostrando retención CS-US (Fig. 2.8) permite descartar la posibilidad de que este resultado a corto término se deba

en realidad a una amnesia de la memoria CS-US causada por la CHX en lugar de a una extinción. Por último, en el caso en que la memoria se evaluó a las 24 h (Día 3), de acuerdo a lo esperado, se evidenció un efecto de la CHX. Los animales que recibieron SAL mostraron una memoria de extinción intacta, mientras que aquellos que recibieron CHX mostraron retención de la vieja memoria, es decir, un efecto amnésico de la CHX sobre la memoria de extinción compatible con una interferencia en la consolidación de esta memoria (Fig. 2.10B). De este modo, esta serie de resultados nos permite concluir que la adquisición de la memoria de extinción en el cangrejo, así como la expresión a corto término de esta memoria, a pesar de requerir una larga experiencia comportamental no depende de la síntesis de proteínas.

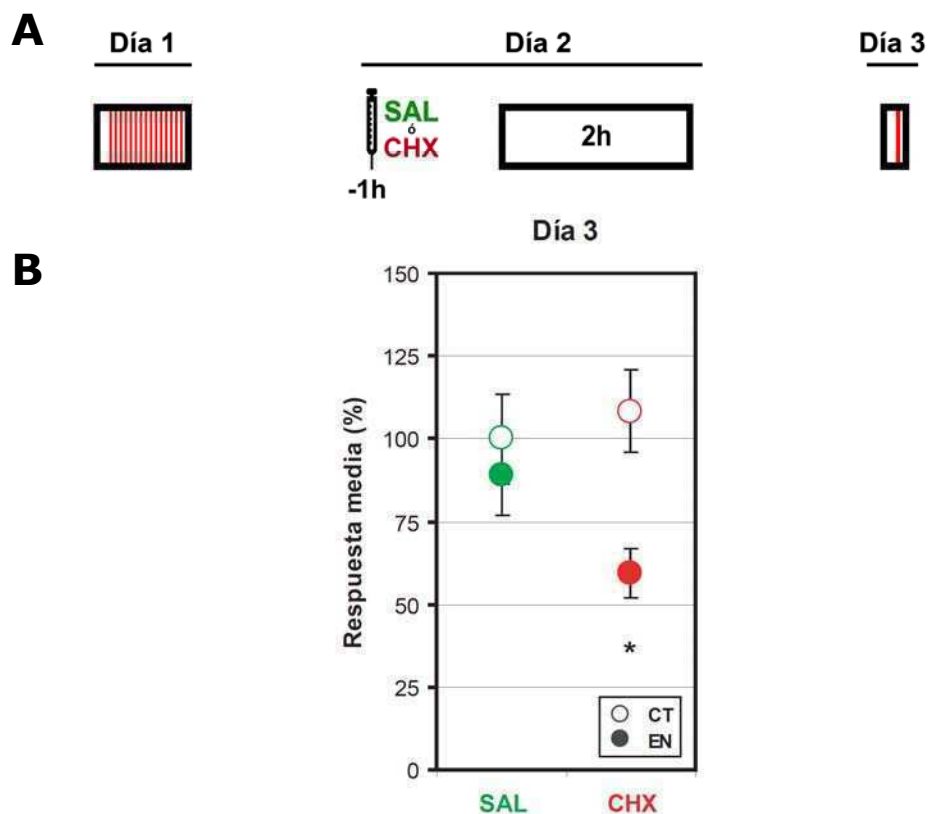


Figura 2.10: La extinción de largo término requiere de la síntesis proteica. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: inyección de SAL o CHX y 1 h después re-exposición al contexto del entrenamiento durante 2h sin refuerzo. Día 3: evaluación. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 3, normalizada respecto de la respuesta media del grupo SAL-CT. ANOVA: $F(3,152) = 3.40$, $P < 0.02$. SAL, CT~EN: $P = 0.51$. CHX, CT>EN: $P < 0.003$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 2.4.

En segundo lugar, estudiamos el requerimiento de la actividad de receptores NMDA_L para la adquisición de esta memoria de extinción y su expresión a corto término. Con este fin, realizamos una estrategia farmacológica similar a la de la serie anterior de experimentos. Como ya mencionamos, si bien los experimentos en los que la memoria fue evaluada a largo término fueron presentados anteriormente (L. Pérez-Cuesta, Seminario de licenciatura, FCEN-UBA), los incluimos en esta tesis con el fin de ofrecer el panorama completo de resultados experimentales.

En esta serie de experimentos, los cangrejos fueron entrenados en el Día 1 y en el Día 2 fueron re-expuestos durante 2 h al contexto del entrenamiento. En los distintos experimentos, los animales fueron inyectados con SAL o 10^{-3} M (~ 17 μg /cangrejo) de MK-801 (MK) 1 h antes de la re-exposición y fueron evaluados ya sea a corto término (10 min tras el fin de la re-exposición) (Fig. **2.11** A) o a largo término (24 h tras el fin de la re-exposición) (Fig. **2.12**A). O bien, recibieron las inyecciones de SAL o MK-801 a los 0 min, 30 min, ó 1 h después del fin de la re-exposición y luego la evaluación tuvo lugar 24 h después (Día 3) (Fig. **2.13**A). Los resultados de la evaluación de corto término (Día 2) muestran que los animales previamente inyectados con SAL extinguieron la vieja memoria, de acuerdo a lo esperado, mientras que los animales que recibieron MK-801 mostraron un impedimento en la extinción, evidenciándose retención CS-US (Fig. **2.11**B). Esta amnesia de corto término estaría indicando que el MK-801 impidió la adquisición de la memoria de extinción. Podría argumentarse que la adquisición de esta memoria tuvo lugar, pero que el efecto amnésico observado está dado por un efecto del MK-801 sobre la evocación de esta memoria. Sin embargo, esta interpretación pierde sustento dado que el mismo resultado muestra que la droga no impide la evocación de la memoria CS-US. Asimismo, esto es consistente con resultados de trabajos previos en los que se muestra que esta dosis de MK-801 no tiene efectos sobre la evocación de la memoria contexto-señal

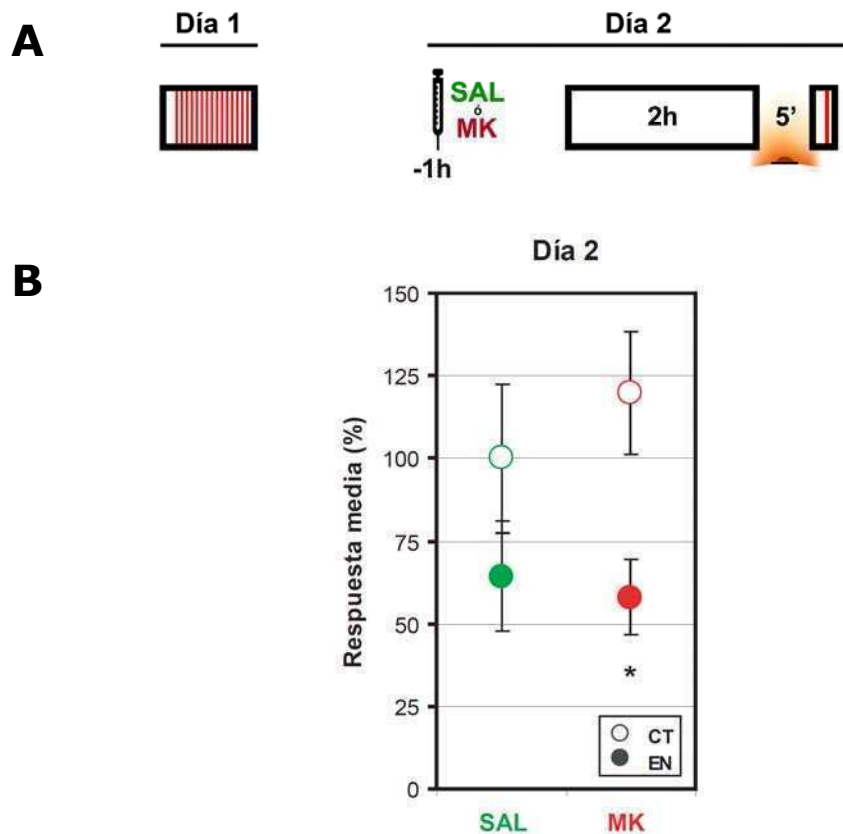


Figura 2.11: La adquisición y/o expresión de la memoria de extinción 10 min después del fin de la re-exposición de 2 h requiere de receptores NMDA_L. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: inyección de SAL o MK y 1 h después re-exposición al contexto del entrenamiento durante 2h sin refuerzo. Evaluación tras 5 min en el contexto alternativo. (B) Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2 normalizada respecto de la respuesta media del grupo SAL-CT. ANOVA: $F(3,148) = 2.74$, $P < 0.04$. SAL, CT \sim EN: $P = 0.16$. MK, CT $>$ EN: $P < 0.01$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 2.4.

(Troncoso & Maldonado 2002). Aún así, podría argumentarse que se trata de dos memorias distintas (memoria CS-US vs memoria de extinción), y de edades distintas (largo término vs corto término), por lo que el MK-801 podría afectar su evocación de modo diferencial. Sin embargo, consistentemente con este último resultado y con la interpretación propuesta, los cangrejos que siguieron idéntico protocolo pero fueron evaluados en el Día 3 (ya en ausencia de MK-801),

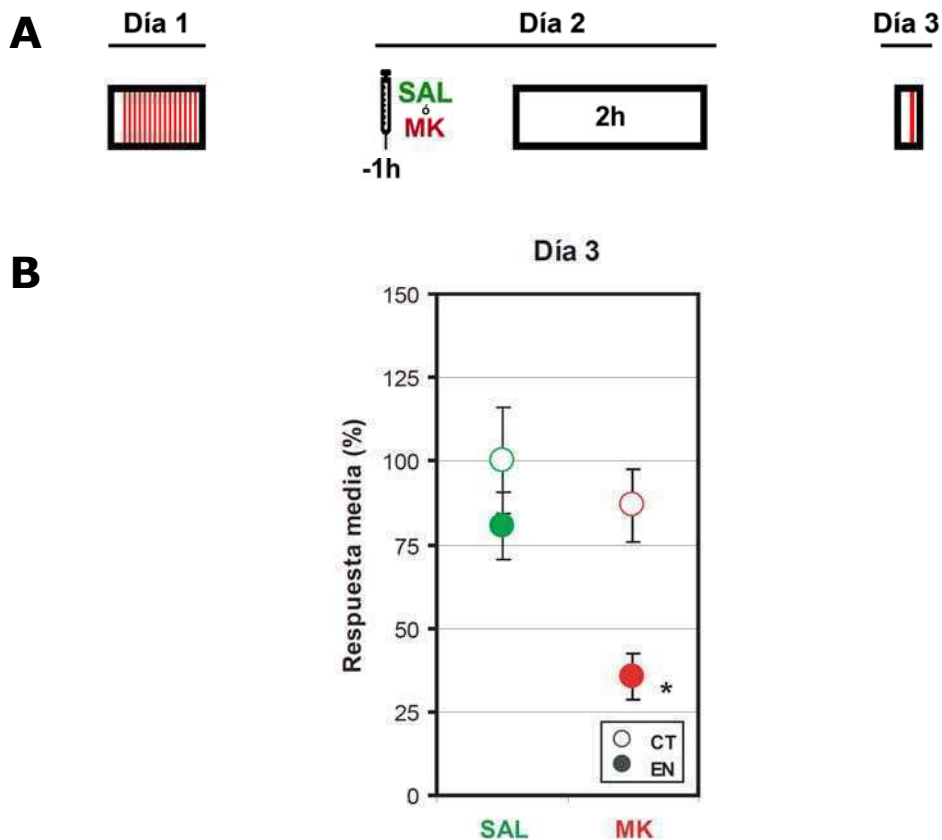


Figura 2.12: El MK-801 impide la extinción de largo término cuando es administrado antes de la re-exposición de 2 h. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: inyección de SAL o MK y 1 h después re-exposición al contexto del entrenamiento durante 2h sin refuerzo. Día 3: evaluación. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 3 normalizada respecto de la respuesta media de cada grupo SAL-CT. ANOVA: $F(3,116) = 6.58$, $P < 0.0004$. SAL, CT \sim EN: $P = 0.31$. MK, CT $>$ EN: $P < 0.001$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 2.4.

volvieron a mostrar retención CS-US, es decir, mostraron que 24 h después la extinción sigue impedida (Fig. 2.12B). Esto no sería posible si el impedimento de la extinción observado en el primer experimento estuviera debido exclusivamente a un efecto de la droga sobre la evocación. Por lo tanto, este segundo resultado apoya la conclusión de que los receptores NMDA_L son requeridos para la adquisición de la memoria de extinción. También, aunque con menor parsimonia, podría sostenerse que en el primer experimento el MK-801 impidió la evocación

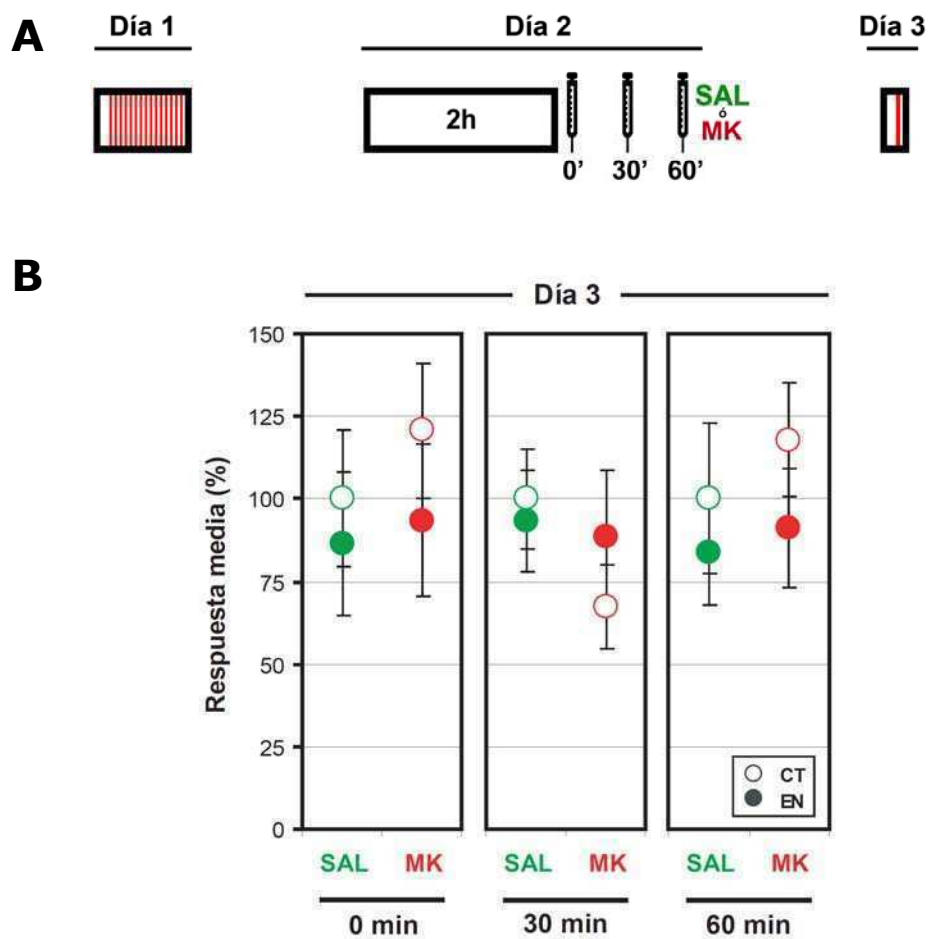


Figura 2.13: El MK-801 no impide la extinción de largo término cuando es administrado después de la re-exposición de 2 h. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento durante 2h sin refuerzo, y 0, 30 ó 60 min después, inyección de SAL o MK. Día 3: evaluación. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 3, normalizada respecto de la respuesta media de cada grupo SAL-CT. 0min: ANOVA: $F(3,116) = 0.47, P = 0.7$. SAL, CT~EN: $P = 0.66$. MK, CT~EN: $P = 0.37$. 30min: ANOVA $F(3,155) = 0.77, P = 0.51$. SAL, CT~EN: $P = 0.77$. MK, CT~EN: $P = 0.35$. 60min: ANOVA $F(3,152) = 0.59, P = 0.62$. SAL, CT~EN: $P = 0.54$. MK, CT~EN: $P = 0.32$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 2.4.

de la memoria de extinción de corto término, y que en el segundo experimento el MK-801 logró el efecto amnésico actuando (además) sobre la consolidación de esta memoria, con lo que se restaría apoyo la conclusión de un impedimento de la adquisición. Sin embargo, los experimentos presentados a continuación le quitan sustento a esta interpretación alternativa de una acción sobre la consolidación, ya que

cuando los cangrejos recibieron las inyecciones 0, 30 ó 60 min después del entrenamiento de extinción, al día siguiente en ningún caso se evidenció un efecto del MK-801. Es decir que tanto los animales inyectados con SAL como con MK-801 mostraron una extinción de largo término (Fig. **2.13B**). Por lo tanto, como anticipamos más arriba, dado lo temprano de las inyecciones tras la adquisición de esta memoria, estos resultados sugieren que el bloqueo de los receptores NMDA_L no impediría la consolidación de la memoria de extinción. En resumen, los resultados de esta última serie de experimentos apoyan la hipótesis de que solamente la adquisición de la memoria de extinción en el cangrejo requiere de la actividad de receptores NMDA_L.

En conjunto, los resultados de estas dos series de experimentos permiten concluir que la adquisición de la memoria de extinción requiere de la actividad de receptores NMDA_L pero no de la síntesis proteica, y contrariamente, la consolidación de esta memoria requiere de la síntesis proteica pero no de la actividad de receptores NMDA_L.

1.3 - Discusión

La adquisición de la memoria de extinción

Los resultados obtenidos en esta sección nos han llevado a la siguiente serie de conclusiones.

En concordancia con trabajos previos (Pedreira & Maldonado 2003) y con los resultados del capítulo anterior (Figs. 1.5, 1.7), una re-exposición no reforzada al contexto del entrenamiento produce la extinción de la vieja memoria CS-US si su duración es mayor a una hora. Esta extinción puede observarse tanto a largo término (24 h), como a corto término cierto tiempo después de finalizada la re-exposición. Sin embargo, al evaluar la memoria durante esta re-exposición la memoria CS-US se expresa invariablemente. Es decir que

en ningún caso se observa una extinción de la vieja memoria durante el entrenamiento de extinción, independientemente de su duración.

Una vez terminado el entrenamiento de extinción, basta un intervalo de tiempo de menos de un minuto para encontrar que la vieja memoria ya está extinguida. Este hecho sugiere que la adquisición de esta nueva memoria, a pesar de requerir de una experiencia comportamental extensa, no ocurre de modo sincrónico con esta experiencia, sino que tiene lugar durante un período de tiempo acotado, de unos pocos segundos, tras el fin de la re-exposición. Es necesario sin embargo considerar algunas reservas acerca de esta conclusión. Ésta es sostenida por los hechos de que la memoria de extinción no se expresa nunca durante la re-exposición, aunque dure 6 h, y una vez finalizada sólo le toma <1 min expresarse. No obstante, si bien la expresión de una memoria constituye una evidencia de que esta memoria fue adquirida, por el contrario, su no expresión no es prueba de que la adquisición no tuvo lugar. Podría argumentarse entonces que la memoria de extinción es adquirida durante la larga re-exposición al contexto, sólo que no se expresa hasta que esta experiencia finaliza. Un abordaje experimental para distinguir entre estas dos posibilidades consistiría en administrar a los cangrejos MK-801 poco antes del fin de la re-exposición y luego evaluar su efecto sobre la extinción de corto término. De este modo, dado que el MK-801 actuaría selectivamente sobre la adquisición de la extinción, si esta memoria ya fue adquirida durante la re-exposición los cangrejos la expresarían tras la salida del contexto; caso contrario, si la memoria de extinción es adquirida tras la salida del contexto este proceso sería bloqueado por la acción de la droga. Desgraciadamente, la administración del MK-801 mediante una inyección requiere, precisamente, retirar previamente a los animales del contexto. Por lo tanto, para abordar este problema sería necesario poner a punto una nueva técnica de administración de la droga, por ejemplo mediante la implantación de cánulas, lo que parece difícilmente realizable dado el elevado número de animales por experimento.

Esta interpretación alternativa de una adquisición sin expresión mientras los animales permanecen en el contexto, sin embargo, aunque no puede ser descartada es menos parsimoniosa dado que supone que los animales están adquiriendo –y consolidando– una memoria que no se observa y eventualmente nunca llegarían a expresar. Esto ha sido mostrado en períodos de tiempo tan largos como 6 h (Fig. 1.7; 2.2), 12 h (Tomsic *et al.* 1998) y 24 h (Lozada *et al.* 1990). En principio, resulta difícil inclinarse por alguna de las dos hipótesis, ya que si bien de acuerdo al los resultados la primera interpretación es más parsimoniosa, existen casos demostrables, en este mismo paradigma, en los que una experiencia comportamental es capaz de generar una memoria que se consolida a largo término sin nunca expresarse, como es el caso de un entrenamiento débil (Frenkel *et al.* 2005). No obstante, en el caso de un entrenamiento débil, éste sí genera una memoria que se expresa en el corto término, mientras que en el presente caso nunca se observa una extinción de corto término antes de la salida del contexto. Por lo tanto, basándonos en que este fenómeno nunca fue observado durante la re-exposición, y por parsimonia, nos inclinamos por la interpretación de una adquisición después de la salida del contexto, manteniendo de todos modos las reservas que mencionamos.

Por último, cabe señalar que incluso en el caso en que la memoria de extinción sea adquirida tras la salida del contexto sería difícil sostener que durante la re-exposición el individuo no está adquiriendo información de ningún tipo. Volveremos sobre este punto un poco más adelante.

El rol del refuerzo

En el capítulo anterior observamos un rol diferencial del refuerzo ya que, al ser presentado antes del fin de la re-exposición al contexto previene la subsiguiente extinción de la memoria, mientras que si es presentado después ya no tiene ningún efecto observable sobre la extinción ya adquirida. Habíamos arribado a esta conclusión basándonos

en los resultados obtenidos en una evaluación a largo término, a las 24 h, que en el primer caso (refuerzo antes) encontraba retención de la vieja memoria (Fig. 1.6, SAL y 1.7, CONT), y en el segundo caso (refuerzo después), encontraba extinción (Fig. 1.7, INT). En este sentido, los resultados presentados en este capítulo suman una nueva evidencia que apoya estas conclusiones al mostrar que como consecuencia de la inclusión del refuerzo durante la re-exposición tampoco se observa una extinción a corto término, al evaluar la memoria sólo 10 min después del fin de la re-exposición (FIG. 2.3, REF). De modo importante, esto permite descartar que una larga re-exposición reforzada al final, sin generar una extinción de largo término, produzca una extinción que sólo se observe a corto término. En otras palabras, el hecho de que la inclusión del refuerzo antes del fin de la re-exposición impida observar una extinción de la memoria, tanto a largo término como sólo 10 min después, apoya la hipótesis de que este refuerzo *previene* la extinción de la memoria, tal como previene la labilización cuando es presentado antes del fin de la re-exposición corta.

En el marco de la dicotomía planteada más arriba, esta última conclusión acerca del papel del refuerzo vuelve aun menos parsimoniosa a la interpretación de una adquisición de la extinción durante la re-exposición, ya que de ser así no sólo se estaría adquiriendo una memoria que nunca se expresaría de permanecer indefinidamente en el contexto sino que tampoco se expresaría de ocurrir un refuerzo. Nuevamente, sin descartar que durante la re-exposición haya cierta información que se esté adquiriendo, cabría preguntarse más bien si esta adquisición constituye efectivamente la adquisición de la memoria de extinción, o en todo caso se trata de adquisición de información que eventualmente será necesaria para la adquisición de la memoria de extinción, tras el fin de la re-exposición. Considerando a la extinción como una inhibición de la expresión de la memoria CS-US por adquisición de una nueva traza CS-no US, podríamos hipotetizar que la salida del contexto es el momento donde la información adquirida

durante la re-exposición (CS) se asocia a la ausencia del refuerzo (no US).

Mecanismos de la adquisición y la consolidación de la extinción

Asimismo, hemos concluido que este proceso de adquisición de la nueva memoria de extinción requiere de la actividad de receptores NMDA_L pero no de la síntesis de proteínas, e inversamente, la consolidación de esta nueva traza sí requiere de la síntesis de proteínas pero no de la actividad de receptores NMDA_L.

Estos últimos resultados en relación a la síntesis de proteínas están de acuerdo con la visión general de que la síntesis de macromoléculas no es requerida para la adquisición de las memorias pero sí para la formación de memorias de largo término. No obstante, es de interés descartar este requerimiento molecular para la adquisición de la memoria de extinción en este paradigma comportamental ya que si bien esta adquisición parecería como un proceso rápido y acotado en el tiempo, depende de la ocurrencia previa de una experiencia comportamental extensa, del orden de las horas, más compatible con procesos de cinética lenta como la síntesis de proteínas. Entonces, hubiera sido posible que esta experiencia indujera una síntesis proteica necesaria para la posterior adquisición de la memoria de extinción. Por otro lado, existen antecedentes en la literatura que muestran que la extinción a corto término (20 min) es impedida por la inhibición de la síntesis de proteínas pero no de la transcripción, sugiriendo el requerimiento de síntesis de proteínas a partir de mRNA preexistente, para la adquisición de la memoria de extinción (Lin *et al.* 2003c).

Respecto del requerimiento de receptores NMDA_L, los resultados presentados están de acuerdo con algunos trabajos y en desacuerdo con otros. En principio, si bien no hay antecedentes acerca del rol de los receptores NMDA en la extinción de la memoria en invertebrados,

numerosos trabajos muestran que los receptores NMDA son necesarios para la extinción de la memoria en diversos paradigmas en roedores (e.g. Falls *et al.* 1992; Cox & Westbrook 1994; Baker & Azorlosa 1996; Szapiro *et al.* 2003; Lee *et al.* 2006; Liu *et al.* 2009). Sin embargo, pocos trabajos distinguen si este rol tiene lugar durante la adquisición de la memoria de extinción o durante su consolidación. Y entre estos, los resultados son variados. A su vez, resulta difícil hacer comparaciones entre estos trabajos dadas las grandes diferencias entre drogas, vías de administración y paradigmas comportamentales utilizados.

Por ejemplo, Santini *et al.* (2001) encuentran que en un paradigma de condicionamiento clásico de tono-shock en ratas el antagonista competitivo CPP administrado sistémicamente previo a un entrenamiento de extinción de 15 ensayos (90 min) no impide la extinción intra-sesión (adquisición) pero sí impide la retención a largo término de esta extinción, sugiriendo un rol de los receptores NMDA en la consolidación de esta memoria. Suzuki *et al.* (2004), utilizando en ratones la misma droga, misma vía de administración y misma o mayor dosis, pero en un condicionamiento contextual aversivo, encuentran efectos similares sobre la consolidación de la extinción. Por su parte, Lin *et al.* (2003c) muestran que en el paradigma de potenciación del sobresalto por miedo (*fear-potentiated startle*) con una asociación luz-shock en ratas, el antagonista competitivo APV infundido en la amígdala impide la memoria de extinción evaluada apenas 20 minutos después de un entrenamiento de extinción de 30 ensayos (50 min), resultado consistente con un bloqueo de la adquisición de esta memoria. En dos trabajos más recientes Sotres-Bayon *et al.* (2007; 2009) determinan un rol diferencial de la amígdala lateral (AL) y la corteza prefrontal ventromedial (CPFvm), mostrando mediante la administración de ifenprodil, un antagonista selectivo de los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B, que estos receptores son requeridos en la AL sólo para la adquisición de la extinción y en la CPFvm sólo para la consolidación de la extinción.

Esta gran variedad de resultados podría sugerir que el rol de los receptores NMDA, en la adquisición o en la consolidación de la memoria de extinción, podría variar dependiendo de los circuitos involucrados en la extinción en una tarea particular. Esto es consistente con la visión de que no parece haber un mecanismo único para la extinción de la memoria, común a todos los paradigmas (Myers & Davis 2002; Myers *et al.* 2006).

2 – Dinámica de la labilización de la memoria

2.1 – Introducción

Dado el notable paralelismo evidenciado anteriormente entre los procesos de extinción y reconsolidación de la memoria, y particularmente a la luz de los últimos resultados sobre la rápida cinética de la adquisición de la extinción nos preguntamos si, del mismo modo que tras el fin de una re-exposición larga es posible evaluar la memoria a tiempos cortos para determinar la cinética de la adquisición de la extinción, sería posible por algún medio evidenciar la cinética del proceso de labilización de la memoria, tras una re-exposición corta. Frente a esta pregunta, se plantea la dificultad de cómo determinar la ocurrencia de un proceso como la labilización de la memoria, que no se manifiesta comportamentalmente y del que no se poseen marcadores en el cangrejo. Se conocen drogas como los compuestos β -lactámicos o el MG132, inhibidores del proteasoma, que bloquean el proceso de labilización inducido por un recordatorio, tanto en roedores (Lee 2008; Lee *et al.* 2008) como en cangrejos (M. S. Fustiñana & A. Romano, comunicación personal), con lo que la memoria permanece consolidada e insensible a agentes amnésicos. Sin embargo, una de las principales limitaciones de cualquier abordaje puramente farmacológico para determinar la cinética de un proceso es su baja resolución temporal. La

administración de una droga en un momento dado no permite determinar en qué momento, dentro de su ventana de acción del orden de las horas, la droga está ejerciendo su efecto inhibitorio o activador. Por lo tanto, con un abordaje comportamental en mente, seguimos el siguiente razonamiento. En el primer capítulo determinamos y discutimos la importancia del refuerzo y su valor diferencial respecto de si es presentado antes o después del fin de una re-exposición. Presentado antes pero no después del fin de una re-exposición larga, el refuerzo impide la inducción de la extinción de la memoria (Figs. 1.6 y 1.7), y presentado antes pero no después del fin de una re-exposición corta, el refuerzo impide la inducción de la labilización y subsiguiente reconsolidación de la memoria (Figs. 1.2, 1.3 y 1.4). En otras palabras, un único refuerzo tiene la capacidad de prevenir pero ya no de revertir la ocurrencia del proceso mnésico, sea extinción o labilización y reconsolidación. De este modo, razonamos, el efecto que tiene la presentación del refuerzo podría ser una característica diagnóstica del estado en el que se encuentra la memoria. Esta hipótesis, llevada al terreno de la reconsolidación de la memoria, propondría que si la presentación de un refuerzo en un momento dado tras la re-exposición corta tiene la capacidad de impedir la labilización de la memoria, esto se debería a que esa labilización todavía no tuvo lugar. Por el contrario, si a pesar de la presentación del refuerzo la memoria resulta de todos modos labilizada, esto se debe a que el refuerzo no pudo impedir el proceso de labilización, sugiriendo que éste ya tuvo lugar o al menos ya fue irreversiblemente iniciado al momento de la presentación del refuerzo. Ejemplos de estas dos situaciones canónicas son el efecto del refuerzo presentado antes del fin de la re-exposición corta, donde previene la labilización (Figs. 1.2 y 1.3), y la falta de efecto del refuerzo al ser presentado 4 h después del fin de la re-exposición (Fig. 1.4). Es de esperar que, presentando el refuerzo tras períodos más cortos que 4 h post re-exposición, sea posible reducir el intervalo de tiempo en cuyos extremos se sigan encontrando estos dos casos opuestos, de modo de

acotar el intervalo en el que la memoria estaría sufriendo el proceso de labilización.

Este abordaje, desde luego, tiene sus propias limitaciones ya que no es posible equiparar de forma irrestricta la pérdida de efecto del refuerzo sobre la labilización de la memoria con la ocurrencia misma del proceso de labilización. Por lo tanto, discutiremos las implicancias de los resultados obtenidos teniendo en cuenta estas reservas.

2.2 - Resultados

La siguiente serie de experimentos tuvo como objetivo determinar en qué momento tras la re-exposición corta al contexto del entrenamiento la presentación del refuerzo pierde su capacidad de impedir que la labilización de la memoria ocurra. Para esto, buscamos reducir el intervalo de tiempo en el que se observó que el refuerzo pierde este efecto, 4 h después de la re-exposición (Fig. 1.4). El abordaje para lograr esto consistió en intercalar entre re-exposición y refuerzo un período de tiempo de duración variable de exposición al contexto alternativo. Seguidamente, antes de la presentación del refuerzo, se presentó el contexto estándar durante 9 seg, período de tiempo que ya ha mostrado ser suficiente para que los animales evoquen la vieja memoria (Figs. 2.6 y 2.7). De este modo, el refuerzo es presentado en el contexto del entrenamiento a distintos tiempos tras la re-exposición corta, pudiendo o no prevenir la labilización de la memoria. Para poner a prueba si la memoria resulta labilizada en cada caso, los animales deben ser inyectados con CHX y evaluados a largo término. Por lo tanto, en la siguiente serie de experimentos, en el Día 1 entrenamos distintos grupos de cangrejos y en el Día 2 inyectamos a todos los animales con CHX y 1 h después los re-expusimos al contexto estándar durante 5 min. En los distintos experimentos, a continuación les presentamos el contexto alternativo durante 9 seg, ó 5 min, u omitimos el contexto alternativo (0 seg), y seguidamente,

reestablecimos el contexto estándar y 9 seg después les presentamos el refuerzo. Finalmente, todos los animales fueron evaluados 24 h después (Día 3) (Fig. **2.14A**). De acuerdo a la hipótesis, podemos predecir que en aquellos casos en que la memoria resulte labilizada a pesar de la presentación del refuerzo, la CHX debería impedir la reconsolidación y por lo tanto deberíamos encontrar una amnesia en la evaluación del Día 3. En primer lugar, en los resultados del Día 2 podemos observar que el refuerzo presentado, en su papel de evaluador, mostró en todos los casos retención de la memoria CS-US, no evidenciándose un efecto de la CHX a corto término (Fig. **2.14B**, izquierda). Esto es consistente con otros trabajos de la literatura (e.g. Nader *et al.* 2000a), y con antecedentes de nuestro laboratorio (Merlo *et al.* 2005) en los que se observa que el efecto de los agentes amnésicos sobre el proceso de reconsolidación no se evidencia durante las horas siguientes a la presentación del recordatorio. En segundo lugar, en los resultados de la evaluación del Día 3, podemos observar por un lado y de acuerdo a lo esperado, que los cangrejos cuya re-exposición no fue interrumpida antes de presentar el refuerzo (grupo “0 seg”) también mostraron retención de la memoria CS-US, a pesar de la inyección de CHX, indicando que la vieja memoria no resultó labilizada en el Día 2 (Fig. **2.14B**, derecha). Esto es consistente con los antecedentes del Capítulo I (Figs. 1.2 y 1.3), en los que se determinó que la presentación del refuerzo antes del fin de una re-exposición corta previene la labilización de la memoria. Por otro lado, sorprendentemente, los dos grupos cuya re-exposición fue brevemente interrumpida (“9 seg” y “5 min”) mostraron amnesia en el Día 3 evidenciando que la memoria resultó labilizada en ambos casos, independientemente de la duración de la interrupción (Fig. **2.14B**, derecha). De acuerdo a la hipótesis planteada, estos resultados implican que incluso 18 seg (9 seg en el contexto alternativo + 9 seg en el contexto estándar previo al refuerzo) son suficientes para que el refuerzo ya no pueda prevenir el proceso de labilización de la memoria.

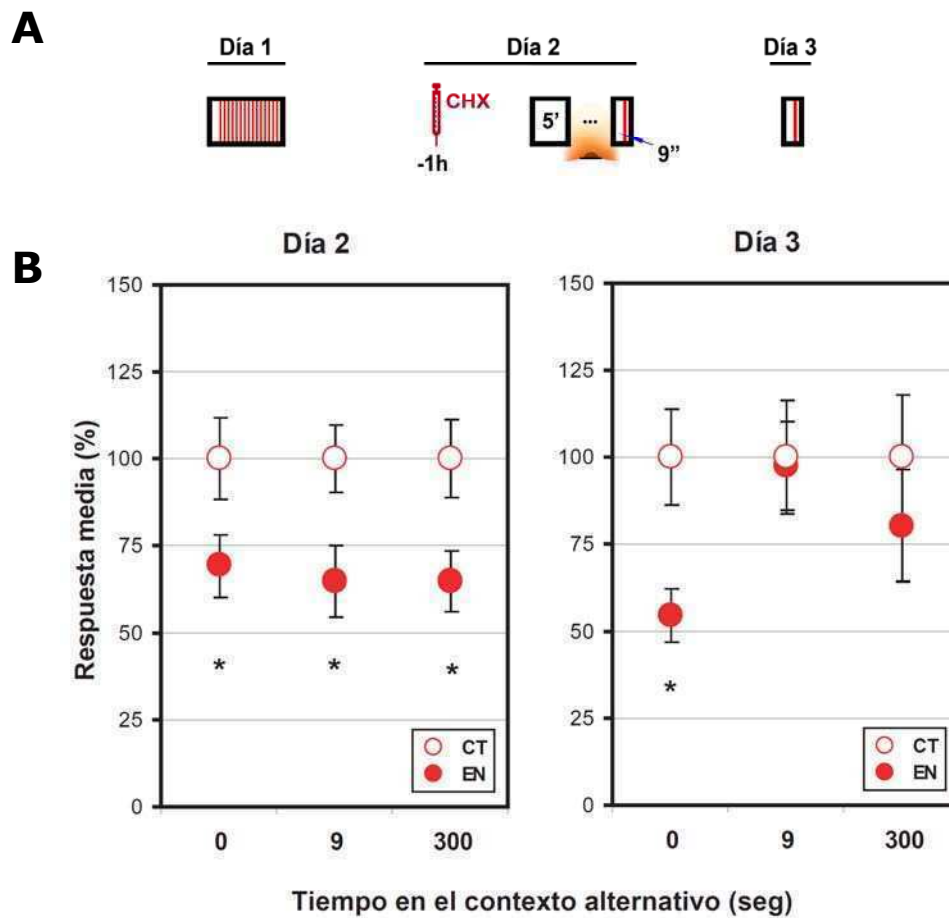


Figura 2.14: El refuerzo previene la labilización de la memoria consolidada cuando es presentado antes pero no 9 seg o 5 min después del fin de la re-exposición de 5 min. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: inyección de CHX, y 1 h después re-exposición al contexto del entrenamiento sin refuerzo durante 5 min sin refuerzo, y tras 0, 9 ó 300 seg en el contexto alternativo los animales volvieron al contexto estándar por 9 seg y recibieron un refuerzo. Día 3: evaluación. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2 y en el Día 3, normalizada respecto de la respuesta media de cada grupo CT. Día 2: 0seg: $P < 0.05$; 9seg: $P < 0.05$; 300seg: $P < 0.05$; Día 3: 0seg: $P < 0.01$; 9seg: $P = 0.877$; 300seg: $P = 0.382$; Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 2.4.

Como observamos antes, al no haber un correlato comportamental de la labilización no es posible descartar la posibilidad de que la memoria, sin encontrarse aún lábil, se encuentre sí en un

“punto de no retorno” en el que el refuerzo ya no sea efectivo para prevenir su inminente labilización. De este modo, podemos concluir entonces que apenas 18 seg después del fin de la re-exposición un proceso irreversible de labilización de la memoria ya se ha disparado.

2.3 - Discusión

La inducción de la labilización de la memoria

La conclusión central que emerge de estos resultados es que apenas 18 seg después del fin de la re-exposición al contexto del aprendizaje el refuerzo pierde su capacidad de prevenir la labilización de la vieja memoria. Si bien, como ya discutimos, no es posible inferir directamente que en este momento la memoria CS-US ya se encuentra en un estado lábil, estos resultados revelan un interesante fenómeno al poner en evidencia que apenas 18 seg después del fin de la re-exposición el proceso de labilización de la memoria ya se habría disparado.

Frente a este argumento es necesario volver sobre la definición de la labilización de la memoria para discutir las implicancias de estos resultados. Lo que estrictamente podemos afirmar, de acuerdo a cómo hemos definido este fenómeno, es que pocos segundos después de la salida del contexto la labilización ya ha sido inducida, es decir se han dado las condiciones necesarias y suficientes para que se genere un requerimiento de síntesis de proteínas para que esta memoria pueda persistir a largo término, y que este proceso ya no puede ser impedido por la presentación de un refuerzo como lo era hasta hace pocos segundos.

Por supuesto, esto no revela mucho acerca del proceso mismo de labilización ni de la cinética con la que este proceso lleva a la vieja memoria a un estado lábil, y de hecho, cualquier estudio de la labilización de la memoria que se base en una interferencia con el proceso de reconsolidación se encontrará con esta misma limitación,

dado que la labilización (explicada en términos de reconsolidación) no es sino la generación de un requerimiento a futuro.

Sin embargo, el hecho de que se evidencie este punto de no retorno tan temprano (18 seg) pone nuevamente en relieve el rol central del fin de la re-exposición discutido anteriormente. Por otra parte, este hallazgo traza nuevamente un paralelo con el proceso de extinción de esta memoria, en el que se evidenció que la adquisición de la memoria de extinción ocurre rápidamente, a los pocos segundos del fin de la re-exposición larga. Y también del mismo modo que ocurre en la extinción, cuando el refuerzo es presentado tras el fin de una re-exposición corta ya no es capaz de prevenir o revertir el proceso de labilización de la memoria. Esto había sido observado en el Capítulo I, presentando el refuerzo a las 4 h de la re-exposición (Fig. 1.4), y aquí es confirmado a tiempos mucho menores.

Estos hallazgos van en una misma línea con la hipótesis del switch, que propone que tras el fin de la re-exposición (no reforzada) este mecanismo opera dirigiendo la memoria hacia su labilización y reconsolidación o hacia su extinción. De acuerdo a los resultados obtenidos en ambas secciones de este capítulo y a la interpretación formulada, este mecanismo de switch estaría ocurriendo a los pocos segundos de finalizada la re-exposición.

CAPÍTULO III

**Reconsolidación y extinción de la memoria:
¿mutua exclusión o coexistencia?**

1 – Introducción

Uno de los hallazgos más importantes de nuestro laboratorio en el estudio de la reconsolidación y la extinción de la memoria contexto-señal, es el de la existencia de un vínculo entre estos dos procesos mnésicos. La evidencia de este vínculo emerge del hallazgo de que una re-exposición al contexto del entrenamiento tiene la capacidad de inducir de forma mutuamente excluyente uno u otro proceso, dependiendo de una característica paramétrica: su duración (Pedreira & Maldonado 2003). Por otra parte, en los capítulos anteriores del presente trabajo estos hallazgos fueron extendidos a nuevas condiciones para la inducción de estos procesos: la ausencia del refuerzo y el fin de la re-exposición. Allí, hemos mostrado que durante el tiempo de re-exposición, independientemente de su duración, ninguno de los dos procesos resulta inducido. Por el contrario, desde la entrada de los animales al contexto y durante todo el transcurso de la re-exposición, la vieja memoria permanece consolidada e intacta, es decir que no resulta ni labilizada ni extinguida. Este conjunto de características sostiene y da forma a la hipótesis originalmente planteada, que propone la existencia de un mecanismo tipo switch, que opera en ausencia del refuerzo tras la salida de los animales del contexto, dirigiendo a la memoria hacia uno u otro destino: reconsolidación o extinción. Labilización de la vieja traza o formación de una nueva traza que compite con la anterior.

Esta mutua exclusión entre reconsolidación y extinción evidencia por lo tanto un mecanismo que vincula estos dos procesos, y es un fenómeno que ha sido observado en otros modelos de memoria, basados en distintos paradigmas comportamentales y en especies diversas como peces y roedores (Eisenberg *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2004; Lee *et al.* 2006). Sin embargo, distintas hipótesis han sido propuestas para dar cuenta de esta mutua exclusión. Debiec *et al.* (2002) y Nader (2003) han sugerido que dado que ambos procesos

requieren mecanismos moleculares similares, como aquellos que sirven generalmente la consolidación de las memorias, podría existir una competencia a nivel de la maquinaria molecular responsable de estos mecanismos, o una competencia por otros recursos moleculares comunes. Esta hipótesis, por lo tanto, impone restricciones a la co-ocurrencia de estos dos procesos mnésicos, basándose en una competencia a nivel molecular.

Por otra parte, Mamiya *et al.* (2009) han propuesto también una interacción entre estos dos procesos, aunque en este caso formulando la hipótesis de un mecanismo de inhibición. En particular, estos autores proponen que la evocación de la vieja memoria dispara ambos procesos, pero que la persistencia de la re-exposición al contexto induce una inhibición del proceso de reconsolidación.

Ambas hipótesis, la de la restricción por competencia y la de la inhibición, entran en contradicción con nuestros resultados obtenidos en el cangrejo. Por un lado, de un modo u otro, ambas hipótesis suponen que es la evocación de la vieja memoria el agente inductor de ambos procesos mnésicos y que, de un modo u otro, es el desarrollo de uno de estos procesos el que impide el desarrollo del otro. En cambio, nuestros resultados han mostrado que, por un lado, la mera evocación no es el agente de la inducción de ninguno de los dos procesos mnésicos sino que esto se da por una conjunción de condiciones, de la que la evocación es parte; y, por otro lado, que esta inducción no ocurre durante la re-exposición al contexto. La necesidad particular del fin de la re-exposición, en concordancia con la hipótesis del switch, sugiere que éste es un momento de integración de información, cuyo producto depende de parámetros de esta información (e.g. duración de la re-exposición, presencia o ausencia del refuerzo). Es importante remarcar que el hecho de que reconsolidación o extinción sean inducidos después del fin de la re-exposición implica que esta inducción ocurre recién una vez que irreversiblemente se han cumplido las condiciones para uno solo de los dos procesos, dado que en este momento el parámetro clave (la duración) ya se encuentra determinado, y por lo tanto la inducción

del otro proceso ya no sería posible. Así, de acuerdo a esta hipótesis, reconsolidación y extinción no ocurrirían simultáneamente porque sólo se induce uno de los procesos, y no porque se inducen ambos procesos y uno prevalece sobre el otro. En otras palabras, de acuerdo a la hipótesis del switch, la mutua exclusión se daría como consecuencia de la *regulación de la inducción* de uno u otro proceso (el switch) en un momento puntual que es tras la salida del contexto.

Una predicción que esta hipótesis genera, es que si el fin de la re-exposición desencadena este mecanismo de mutua exclusión, entonces múltiples re-exposiciones podrían suponer múltiples instancias de disparo de uno u otro proceso, de acuerdo a las características de cada re-exposición. Dado el caso particular de la presentación de sólo dos re-exposiciones en serie, cuyas características indujeran el disparo de un proceso primero y el otro después, si el intervalo entre re-exposiciones fuera suficientemente corto respecto de la cinética de los procesos, podría darse el caso de que la reconsolidación y la extinción de esta memoria ocurrieran en paralelo. Sin embargo, de acuerdo a las otras hipótesis planteadas esto no sería posible dado que, ya sea por competencia o por inhibición, sólo uno de los dos procesos puede desarrollarse en un momento dado. Basándonos en esta predicción diferencial, intentaremos determinar la naturaleza de la relación entre reconsolidación y extinción en el cangrejo, estudiando si una memoria es capaz de ser reconsolidada y extinguida simultáneamente.

La posibilidad de esta co-ocurrencia de reconsolidación y extinción es de particular interés considerando que en la vida real la repetición sucesiva de recordatorios no es un evento improbable, por lo que este fenómeno podría poner en evidencia un mecanismo general del procesamiento de las memorias.

2 – Resultados

La siguiente serie de experimentos tiene por objetivo evaluar si los procesos de reconsolidación y extinción de la memoria contexto-señal pueden desarrollarse en paralelo o si, por el contrario, el desarrollo de un proceso impone una restricción sobre el otro. Para esto, se buscó inducir estos procesos mediante la presentación en serie de dos re-exposiciones: una corta, que induce reconsolidación, seguida de una larga, que induce extinción. El abordaje experimental consistió entonces en entrenar distintos grupos de cangrejos en el Día 1, y en el Día 2 re-exponerlos al contexto primero durante 15 min, y tras un intervalo de 15 min re-exponerlos nuevamente durante 2 h. De este modo, si no existe ninguna restricción para el desarrollo simultáneo de estos dos procesos, esperamos que ambos ocurran en paralelo, ya que, de acuerdo a nuestra hipótesis, reconsolidación y extinción estarían siendo inducidas tras el fin de las respectivas re-exposiciones, por lo que al momento de inducirse la extinción (fin de la re-exposición larga) la vieja memoria debería estar aún reconsolidándose. Del mismo modo, si la consolidación de esta nueva memoria de extinción no es un impedimento para la reconsolidación en curso, y viceversa, entonces tanto la vieja memoria como la nueva memoria de extinción deberían estabilizarse a largo término. Si, por el contrario, existe una competencia entre ambos procesos o una dominancia de un proceso sobre el otro, esperaríamos encontrar que sólo uno de los dos, reconsolidación o extinción, tenga lugar tras este protocolo comportamental.

Para poder poner en evidencia la ocurrencia de estos procesos es necesario administrar CHX al momento de las re-exposiciones (Día 2) y luego evaluar la memoria a largo término. En trabajos anteriores (Merlo & Romano 2008) y en experimentos preliminares, se determinó que la memoria contexto-señal extinguida por una re-exposición no reforzada de 2 h de duración se mantiene extinguida a las 24 h (Día 3), pero se

recupera espontáneamente si se evalúa a los animales a las 48 ó 72 h (i.e., Día 4 ó Día 5). Esta característica nos permite determinar el estado de la memoria de extinción, evaluando a los animales en el Día 3, y el estado de la vieja memoria evaluándolos en el Día 4. De este modo, de encontrar en el Día 3 una ausencia de la vieja memoria, la evaluación del Día 4 nos permitirá distinguir si esto se debe a una extinción de la memoria o a una amnesia producida por efectos de la CHX.

Dado que los mismos animales son evaluados en el Día 3 y en el Día 4, de encontrar recuperación de la vieja memoria en el Día 4 no podremos hablar de recuperación *espontánea* dado que la evaluación del día anterior consiste en la presentación de un refuerzo (un ensayo). Por esto, nos referiremos simplemente a *recuperación de la vieja memoria*. Respecto del valor diagnóstico que esta doble evaluación tiene, debemos considerar que en numerosos trabajos anteriores se ha observado que la presentación de un único ensayo no genera una memoria que se exprese a largo término (Delorenzi *et al.* 1995; Freudenthal & Romano 2000; Frenkel *et al.* 2005). Por esto, la re-emergencia de la vieja memoria en el Día 4 en cualquier caso dependerá de la integridad de la vieja memoria, ya sea que se recupere de forma espontánea, o como producto de una interacción con el ensayo presentado en el Día 3 (saving).

Bajo la hipótesis planteada, predecimos que si la vieja memoria resultara labilizada y reconsolidada, y además tuviera lugar la extinción y su consolidación, entonces los cangrejos inyectados con SAL deberían mostrar extinción en el Día 3 y recuperación de la vieja memoria en el Día 4, mientras que aquellos inyectados con CHX deberían mostrar una amnesia persistente de la vieja memoria, tanto en el Día 3 como en el Día 4, debido al bloqueo de la reconsolidación, e independientemente de lo que ocurra con la memoria de extinción.

Alternativamente, si la vieja memoria no resultara labilizada como consecuencia de este protocolo comportamental, entonces los

cangrejos inyectados con CHX deberían tener impedida solamente la consolidación de la memoria de extinción, observándose retención de la vieja memoria en ambas evaluaciones dado que ésta habrá permanecido en todo momento consolidada. Por su parte, si este protocolo comportamental indujera solamente la labilización y reconsolidación de la vieja memoria pero no así su extinción, entonces serían los animales inyectados con SAL quienes deberían mostrar retención de la vieja memoria en ambas evaluaciones, tal como ocurre con una única re-exposición corta.

En una primera serie de experimentos, en el Día 1 entrenamos distintos grupos de cangrejos, con sus respectivos controles no entrenados, y en el Día 2 los inyectamos con SAL ó 40 µg de CHX, y 1 h después los re-expusimos al contexto del entrenamiento en ausencia de refuerzo durante 15 min (REC), 2 h (EXT), ó 15 min + 2 h con un intervalo entre exposiciones de 15 min (REC+EXT). Por último, todos los animales fueron evaluados en el contexto del entrenamiento en el Día 3 y en el Día 4 (Fig. **3.1A**). Dada la brevedad del intervalo entre ambas re-exposiciones, para evitar eventuales efectos inespecíficos de las manipulaciones en éste y en todos los experimentos que se presentan en este capítulo utilizamos el método del cambio de iluminación descrito en el capítulo anterior, por lo que los animales pasaron estos 15 min en el llamado *contexto alternativo* (iluminación desde abajo).

En concordancia con los resultados previos y con los trabajos anteriores, en los resultados de la evaluación (Fig. **3.1B**) observamos que los cangrejos que recibieron una inyección de SAL y una única re-exposición de 2 h al contexto del entrenamiento (grupo SAL-EXT) mostraron extinción en el Día 3 y recuperación de la memoria CS-US en el Día 4, mientras que los cangrejos que siguieron el mismo protocolo pero recibieron CHX (grupo CHX-EXT) mostraron retención de la memoria CS-US en ambas evaluaciones, como consecuencia del bloqueo de la consolidación de la memoria de extinción (Pedreira & Maldonado 2003). Por otra parte, los cangrejos inyectados con SAL pero

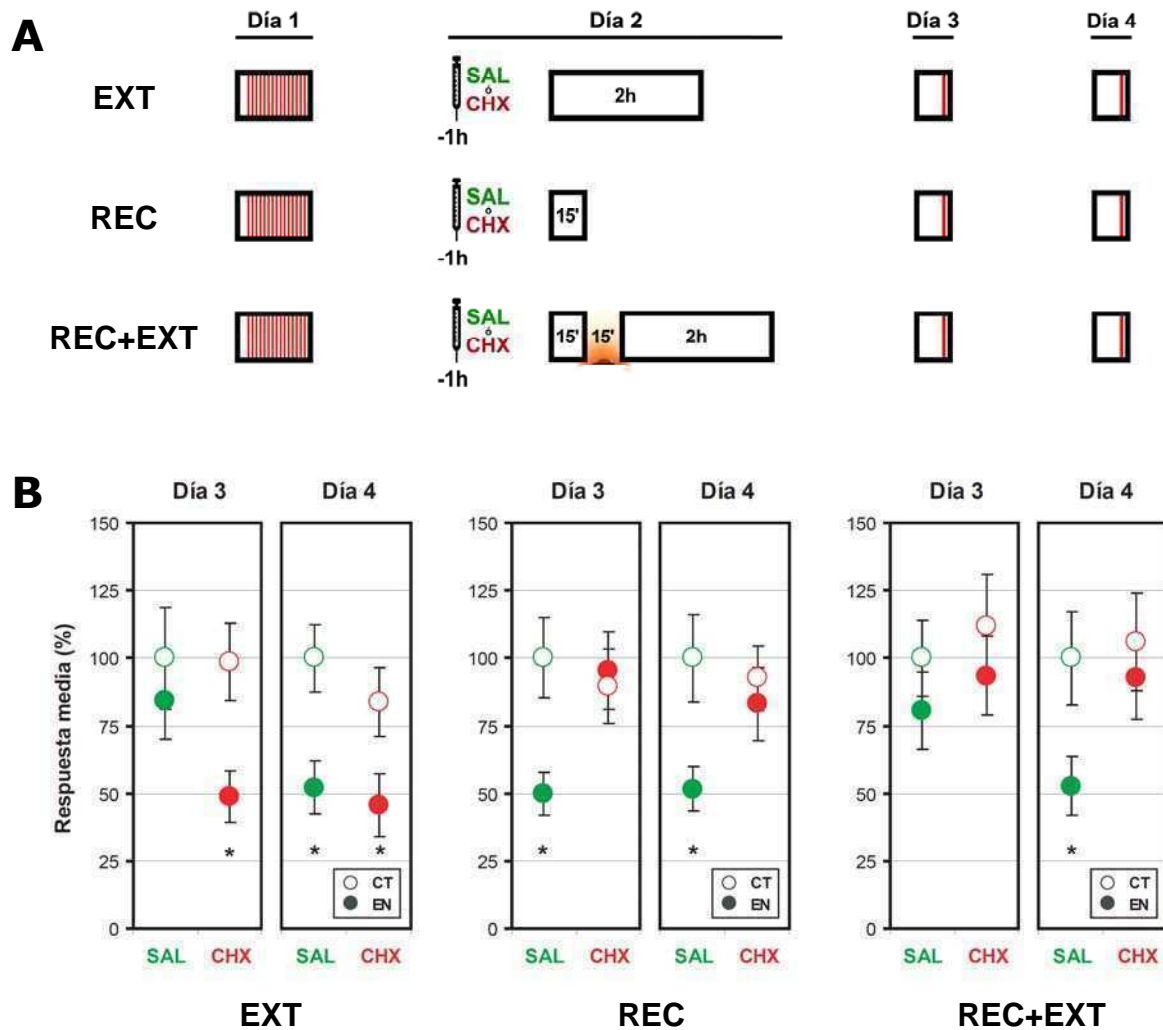


Figura 3.1: Una re-exposición de 15 min seguida de una re-exposición de 2 h induce la labilización y reconsolidación de la memoria CS-US, y también su extinción a largo término.

(A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: inyección de SAL o CHX, y 1 h después re-exposición al contexto del entrenamiento sin refuerzo durante 2h (EXT), 15 min (REC), ó 15 min + 2 h (REC+EXT). Todos los animales fueron evaluados en el Día 3 y en el Día 4. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 3 y en el Día 4, normalizada respecto de la respuesta media de cada grupo SAL-CT. (EXT), Día 3: ANOVA: $F(3,129) = 2.83$, $P < 0.05$. SAL, CT \sim EN: $P = 0.365$. CHX, CT $>$ EN: $P < 0.02$. Día 4: ANOVA: $F(3,128) = 4.79$, $P < 0.05$. SAL, CT $>$ EN: $P < 0.01$. CHX, CT $>$ EN: $P < 0.03$. (REC), Día 3: ANOVA: $F(3,121) = 3.21$, $P < 0.05$. SAL, CT $>$ EN: $P < 0.01$. CHX, CT \sim EN: $P = 0.749$. Día 4: ANOVA: $F(3,121) = 2.84$, $P < 0.05$. SAL, CT $>$ EN: $P < 0.01$. CHX, CT \sim EN: $P = 0.591$. (REC+EXT), Día 3: ANOVA: $F(3,153) = 0.69$, $P = 0.5593$. SAL, CT \sim EN: $P = 0.3777$. CHX, CT \sim EN: $P = 0.4181$. Día 4: ANOVA: $F(3,123) = 2.73$, $P < 0.05$. SAL, CT $>$ EN: $P < 0.04$. CHX, CT \sim EN: $P = 0.5415$. Abreviaturas y símbolos como en las Figs. 1.1 y 2.4.

que fueron re-expuestos sólo durante 15 min (SAL-REC) mostraron retención de la memoria CS-US en ambas evaluaciones, mientras que aquellos inyectados con CHX (CHX-REC) mostraron en el Día 3 una amnesia de la memoria CS-US que persistió en el Día 4. Esto es consistente con un bloqueo de la reconsolidación, tal como se mostró en los resultados de los capítulos anteriores y en trabajos previos (Pedreira *et al.* 2002; Pedreira & Maldonado 2003). Por su parte, al observar los resultados de los animales que recibieron la doble re-exposición, vemos que mientras que los cangrejos inyectados con SAL (SAL-REC+EXT) se comportaron como los primeros (i.e., mostraron extinción en el Día 3 y recuperación de la memoria CS-US en el Día 4), los cangrejos inyectados con CHX (CHX-REC+EXT) se comportaron como los últimos (i.e., mostraron una amnesia persistente en ambas evaluaciones).

Podemos sacar de estos resultados dos series de conclusiones. En primer lugar, respecto de la labilización de la vieja memoria podemos observar que (1) nuevamente, cuando se presenta una única re-exposición de 2 h la vieja memoria CS-US no resulta labilizada (el grupo CHX-EXT muestra retención de la vieja memoria a pesar de la inyección de CHX, que sólo bloqueó la consolidación de la memoria de extinción), y (2) la vieja memoria consolidada resultó labilizada en todos los grupos que incluyeron una re-exposición de 15 min (la CHX causó una amnesia persistente tanto en el grupo REC como en el grupo REC+EXT). Por lo tanto, concluimos que una re-exposición corta es capaz de inducir la labilización de la vieja memoria CS-US independientemente del entrenamiento de extinción subsiguiente. En resumen, no sólo la re-exposición larga es incapaz de inducir la labilización de la memoria (grupos EXT), sino que también es incapaz de prevenir, impedir o revertir la labilización inducida por la re-exposición corta presentada previamente (grupos REC+EXT).

En segundo lugar, en los grupos REC+EXT observamos que (1) a pesar de la labilización inducida por la primera re-exposición, la memoria CS-US de todos modos resulta extinguida y esta memoria de extinción es consolidada (el grupo SAL-REC+EXT muestra en el Día 3

una ausencia transitoria de la memoria CS-US), y (2) a pesar de que se induce la extinción de la memoria CS-US y a pesar de la consolidación en curso de esta memoria de extinción, la vieja memoria labilizada está efectivamente siendo reconsolidada (el grupo SAL-REC+EXT muestra una memoria CS-US de largo término intacta en la recuperación del Día 4). Por lo tanto, podemos concluir que ambos procesos mnésicos, reconsolidación y extinción, resultan inducidos como resultado de las respectivas re-exposiciones corta y larga. Sin embargo, respecto del objetivo planteado, estos resultados no nos ofrecen información acerca de si los dos procesos ocurren o no simultáneamente. De acuerdo a los trabajos anteriores, tras una breve re-exposición al contexto la reconsolidación de la vieja memoria presenta una sensibilidad a la CHX durante una ventana de 4–6 h (Pedreira *et al.* 2002). Cabría esperar entonces que la reconsolidación inducida tras el fin de la re-exposición corta esté aún desarrollándose durante y después de la re-exposición larga. No obstante, esta re-exposición larga y la inducción de la extinción que de ella resulta podrían estar alterando la cinética de la reconsolidación de modo que estos dos procesos no se solapen, ya sea finalizando antes la reconsolidación o disparándose más tarde la extinción.

Con el objetivo de evaluar entonces si existe un solapamiento entre estos dos procesos, comenzamos por determinar si la reconsolidación de la vieja memoria persiste aún después del final de la re-exposición larga. Para esto, en el siguiente experimento repetimos el protocolo aplicado anteriormente a los grupos REC+EXT, pero administrando las inyecciones de SAL o CHX 1 h después de las re-exposiciones en lugar de 1 h antes (Fig. **3.2A**). De este modo, si 1 h después de las re-exposiciones (i.e., 3:15 h después de la re-exposición corta) la reconsolidación de la vieja memoria aún no concluyó, esperaríamos que los animales inyectados con CHX muestren una amnesia persistente en el Día 3 y Día 4, al igual que al administrar la CHX antes de las re-exposiciones. Caso contrario, si la vieja memoria ya

se encuentra reconsolidada, entonces la CHX debería bloquear solamente la consolidación de la memoria de extinción, observándose retención de la memoria CS-US en ambas evaluaciones.

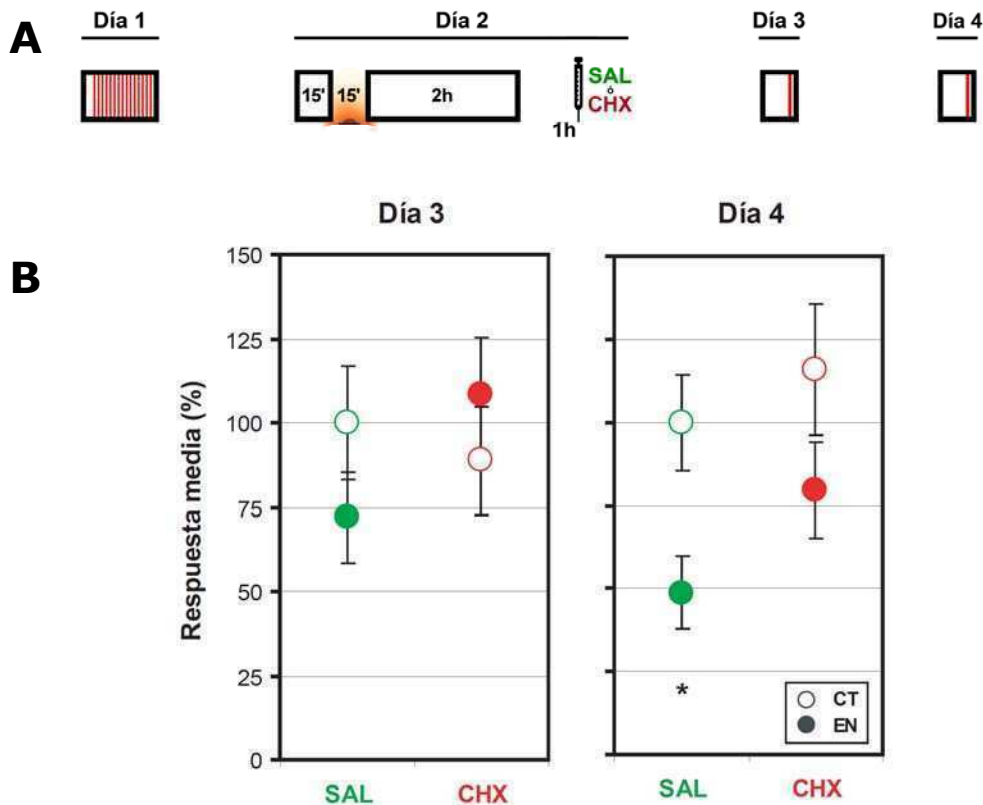


Figura 3.2: 1 h después del fin de la re-exposición de 2 h, la memoria CS-US se encuentra aún lábil y reconsolidándose. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento sin refuerzo durante 15 min + 2 h, e inyección de SAL o CHX 1 h después. Día 3 y Día 4: todos los animales fueron evaluados en ambos días. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 3 y en el Día 4, normalizada respecto de la respuesta media del grupo SAL-CT. Día 3: ANOVA: $F(3,155) = 0.98$, $P = 0.4041$. SAL, CT \sim EN: $P = 0.2152$. CHX, CT \sim EN: $P = 0.3878$. Día 4: ANOVA: $F(3,123) = 3.73$, $P < 0.05$. SAL, CT $>$ EN: $P < 0.02$. CHX, CT \sim EN: $P = 0.0937$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 3.1.

En los resultados podemos observar en primer lugar que, en concordancia con el experimento anterior, los cangrejos inyectados con SAL mostraron extinción de largo término en la evaluación del Día 3, y una recuperación de la memoria CS-US en el evaluación del Día 4. Por

su parte, de acuerdo con la hipótesis propuesta, los cangrejos inyectados con CHX mostraron una amnesia de la vieja memoria tanto en el Día 3 como en el Día 4 (Fig. **3.2B**). Por lo tanto, estos resultados muestran que aún 1 h después del fin de las re-exposiciones al contexto la vieja memoria continúa lábil y reconsolidándose.

Si bien en el capítulo anterior mostramos que la extinción de la memoria tiene lugar pocos segundos después del fin de la re-exposición de 2 h, en el presente caso podría no ocurrir lo mismo, ya que el protocolo comportamental presentado a los animales es distinto. En particular, en lo que respecta a la hipótesis de interferencia con el proceso de reconsolidación por competencia o inhibición, podría ocurrir que este proceso tuviera algún efecto sobre la cinética de la extinción, por ejemplo demorándola. Alternativamente, dado que en este protocolo comportamental la re-exposición de 2 h está precedida de una breve re-exposición no reforzada, operativamente un ensayo de extinción, podría ocurrir en cambio que la extinción de la memoria se vea facilitada por esta experiencia previa, disparándose entonces en un momento anterior al fin de la re-exposición larga.

Para poner a prueba estas hipótesis, realizamos un experimento en el que todos los cangrejos recibieron las dos re-exposiciones al contexto del entrenamiento, como en los experimentos anteriores, pero los animales fueron evaluados a corto término, ya sea inmediatamente antes (grupo PRE) ó 10 min después (grupo POST) del fin de la re-exposición larga (Fig. **3.3A**). Los cangrejos evaluados después del fin de la re-exposición pasaron a continuación 5 min en el contexto alternativo y otros 5 min en el contexto estándar, previo al ensayo de evaluación. En los resultados podemos observar que los animales cuya memoria se evaluó inmediatamente antes de la salida del contexto (PRE) mostraron una memoria CS-US intacta, mientras que aquellos cuya memoria se evaluó 10 min después mostraron ya una extinción de la memoria (Fig. **3.3B**). En otras palabras, el patrón de resultados obtenidos fue el mismo que al presentar una única re-exposición larga (Fig. 2.6),

mostrando que aun presentando previamente una re-exposición corta la memoria resulta extinguida poco después del fin de la re-exposición larga. De este modo, estos resultados en conjunto con los del experimento anterior son concluyentes acerca de que la memoria CS-US resulta extinguida mientras se encuentra aún lábil y reconsolidándose. Es decir, la reconsolidación y la extinción de la memoria realmente ocurren de forma simultánea.

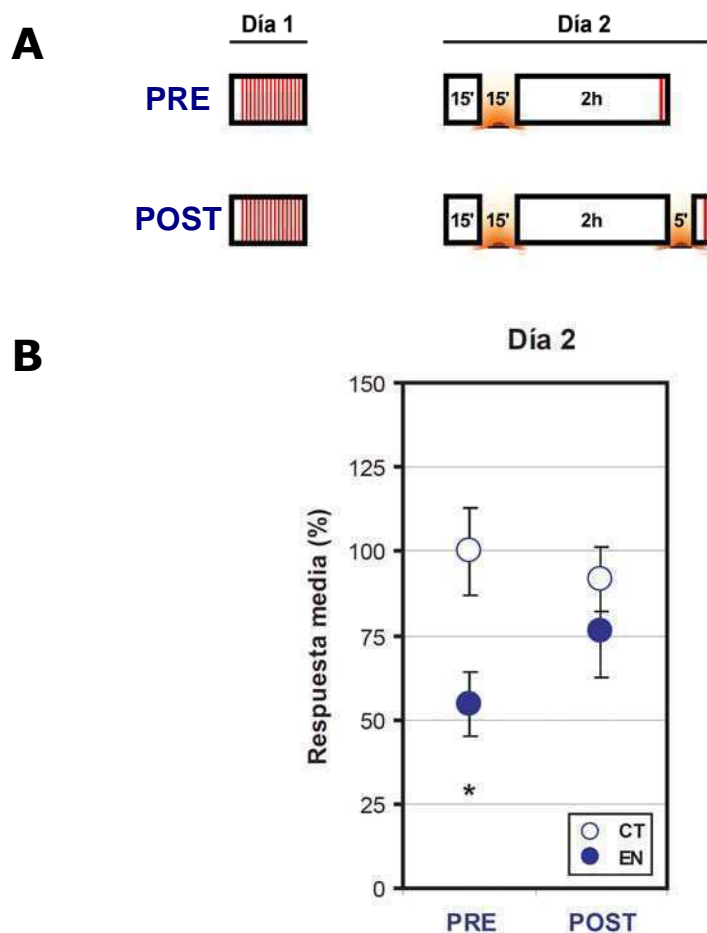


Figura 3.3: La extinción de la memoria CS-US se expresa 10 min después pero no antes del fin de la re-exposición de 2 h. (A) Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento sin refuerzo durante 15 min + 2 h, y evaluación antes del fin de la re-exposición (PRE) o tras pasar 5 min en el contexto alternativo y otros 5 min en el contexto estándar. (B) Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 2, normalizada respecto de la respuesta media del grupo PRE-CT. ANOVA: $F(3,155) = 2.99$, $P < 0.05$. PRE, CT>EN: $P < 0.01$. POST, CT~EN: $P = 0.3547$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 3.1.

Volviendo a la hipótesis de una eventual competencia entre reconsolidación y extinción de la memoria, es de interés determinar si el proceso de consolidación de la memoria de extinción recién formada impone alguna restricción sobre la reconsolidación en curso. Ya hemos observado que ambos procesos son efectivamente llevados a término, ya que ambas memorias de hecho se manifiestan a largo término (Fig. 3.1, REC+EXT; Fig. 3.2), pero podría suceder que de haber una competencia por recursos moleculares la reconsolidación de la memoria tome mayor tiempo en concluir al ocurrir simultáneamente con la consolidación de la memoria de extinción. Esto implicaría que la memoria CS-US permanecería en el estado lábil durante más tiempo que en el caso de no tener lugar una extinción concurrente. Para poner a prueba esta hipótesis, repetimos el experimento presentado en la Figura 3.2, pero demorando las inyecciones de SAL o CHX a 3 h después de las re-exposiciones, en lugar de 1 h (Fig. **3.4A**). De acuerdo a los antecedentes, éste es un punto en el tiempo tras la re-exposición corta (5 h y 15 min) en el que se espera que la memoria ya se encuentre reconsolidada (Pedreira *et al.* 2002), y a su vez es un punto en el tiempo tras la re-exposición larga (3 h) en el que se espera que la consolidación de la memoria de extinción todavía esté en curso (Pedreira & Maldonado 2003). Por lo tanto, de evolucionar ambos procesos de forma independiente, esperaríamos encontrar que la CHX no alcanza a disrumpir el proceso de reconsolidación, pero sí bloquea la consolidación de la memoria de extinción. Si por el contrario, la memoria CS-US permaneciera lábil durante una ventana de tiempo mayor, se volvería entonces susceptible a la CHX.

En los resultados se puede observar, una vez más, que los cangrejos inyectados con SAL muestran extinción en la evaluación del Día 3 y retención de la memoria CS-US en el Día 4. Por su parte, los cangrejos que recibieron CHX mostraron retención de la memoria CS-US en ambas evaluaciones (Fig. **3.4B**). Estos resultados son consistentes con un bloqueo de la consolidación de la memoria de extinción

solamente, y evidencian que al momento de la inyección la vieja memoria ya se encontraba reconsolidada.

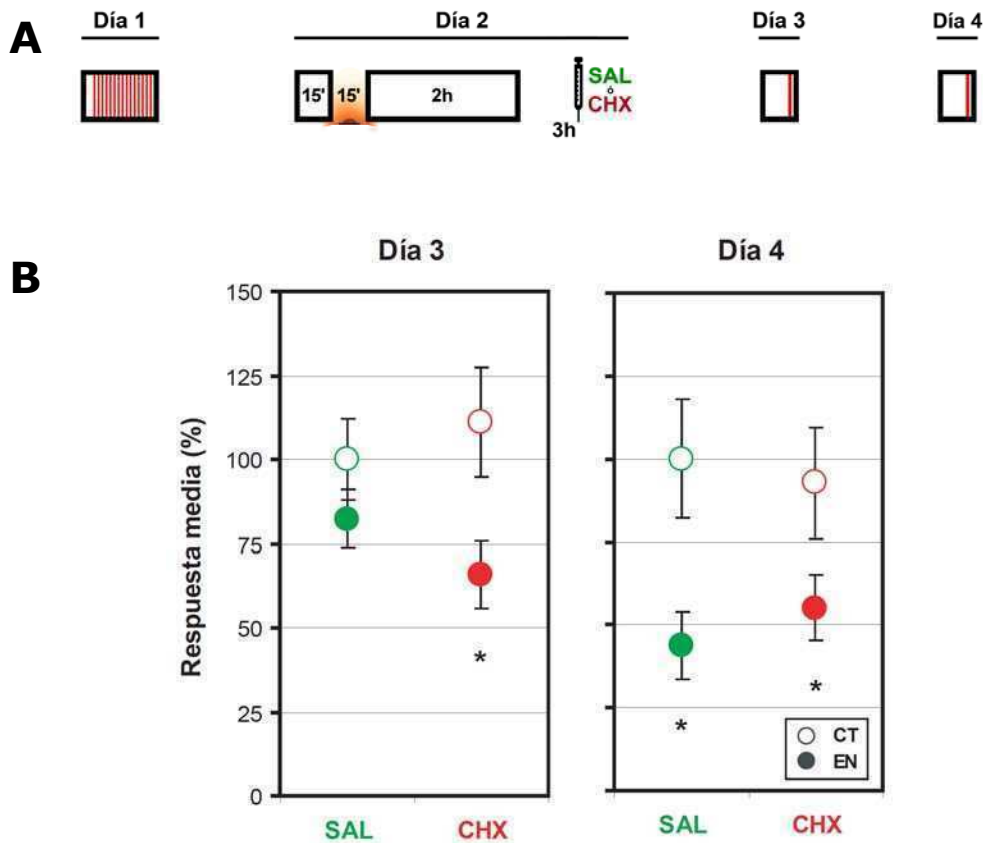


Figura 3.4: 3 h después del fin de la re-exposición de 2 h, la memoria CS-US ya se encuentra reconsolidada, pero la memoria de extinción aún no está consolidada. **(A)** Protocolo experimental. Día 1: entrenamiento. Día 2: re-exposición al contexto del entrenamiento sin refuerzo durante 15 min + 2 h, e inyección de SAL o CHX 3 h después. Día 3 y Día 4: todos los animales fueron evaluados en ambos días. **(B)** Respuesta de escape al ensayo de evaluación (media \pm SEM) en el Día 3 y en el Día 4, normalizada respecto de la respuesta media del grupo SAL-CT. Día 3: ANOVA: $F(3,105) = 2.70$, $P < 0.05$. SAL, CT \sim EN: $P = 0.3059$. CHX, CT $>$ EN: $P < 0.01$. Día 4: ANOVA: $F(3,105) = 4.87$, $P < 0.05$. SAL, CT $>$ EN: $P < 0.01$. CHX, CT $>$ EN: $P < 0.05$. Abreviaturas y símbolos como en la Fig. 3.1.

3 – Discusión

A partir de los resultados presentados en este capítulo hemos sacado una conclusión central, que es que la reconsolidación y la extinción de la memoria son dos procesos que pueden desarrollarse simultáneamente si, en lugar de ser inducidos por una única re-exposición al contexto, son inducidos por sendas re-exposiciones. De acuerdo a los resultados, la labilización y reconsolidación se dispararían una vez finalizada la re-exposición corta (Cap. I y II), y la extinción se dispararía una vez finalizada la re-exposición larga (Cap. II; Cap. III, Fig. 3.3). En otras palabras, estos dos procesos serían disparados en serie tras las respectivas re-exposiciones y, dada sus cinéticas del orden de las horas, se desarrollan en paralelo estabilizando a largo término la vieja memoria y la memoria de extinción. La implicancia más importante de estos resultados respecto del objetivo planteado, es que no existirían características intrínsecas a estos procesos mnésicos que impongan restricciones a su desarrollo simultáneo, como la competencia por recursos moleculares, o la inhibición de un proceso por el otro. Esto implica que este tipo de interacciones difícilmente podrían ser la causa de la mutua exclusión que se da al presentar una única re-exposición, sino que más bien esta mutua exclusión sería producto de un mecanismo mnésico que dirige a la vieja memoria hacia la reconsolidación o hacia la extinción regulando la inducción de uno u otro proceso, en sintonía con la hipótesis del switch. Como mencionamos anteriormente, esta hipótesis es apoyada además por los resultados de los capítulos anteriores que muestran que estos procesos recién se disparan una vez finalizada la re-exposición, un punto en el que, de modo irreversible, sólo uno de los dos procesos ve cumplidas las condiciones para su inducción.

Cabe remarcar que, en cambio, esto no excluye la posibilidad de que los eventos que puedan ocurrir *durante* la re-exposición, o el propio mecanismo mnésico del switch, sí estén basados en una competencia a

nivel molecular, por ejemplo como producto de un determinado tiempo de re-exposición al contexto, y que esto resulte en la inducción de uno u otro proceso. Pero un evento que ocurre durante la re-exposición no debería ser considerado parte de los procesos de reconsolidación o de extinción, ya que ocurrirá independientemente de que alguno de estos dos procesos mnésicos sea posteriormente inducido. En este sentido, trabajos recientes de nuestro laboratorio han determinado una activación diferencial del factor de transcripción NF-kB en función del tiempo de re-exposición al contexto (Merlo & Romano 2008). Volveremos sobre estos trabajos más adelante, en la Discusión General.

En resumen, la reconsolidación y la extinción de la memoria aparecen como procesos mutuamente excluyentes al presentarse una única re-exposición al contexto, pero pueden ocurrir simultáneamente si son inducidos por sendas re-exposiciones. Es decir que la condición de mutua exclusión o de coexistencia de estos procesos depende de la experiencia comportamental que determina su inducción: una re-exposición, un proceso; dos re-exposiciones, dos procesos.

Existe un trabajo reciente que guarda una relación con los resultados presentados. En ese trabajo, usando un paradigma de memoria de miedo al contexto en ratones, Mamiya *et al.* (2009) proponen que al re-exponer a los animales al contexto del entrenamiento la evocación de la vieja memoria induce ambos procesos, reconsolidación y extinción, pero que de persistir la re-exposición al contexto los procesos relacionados con la reconsolidación son inhibidos. Este razonamiento se basa en que los autores encuentran que una re-exposición corta (3 min), que induce la reconsolidación de la memoria contextual, genera cierto patrón de actividad de CREB y expresión de Arc en neuronas piramidales del hipocampo, y que este patrón se ve “revertido” cuando la re-exposición se prolonga hasta los 30 min, lo que a nivel comportamental genera una extinción de esta memoria. Sin embargo, todos los ensayos son realizados siempre cierto

tiempo después de las re-exposiciones (e.g. se mide pCREB 30 min después de la re-exposición de 3 min, y 3 min después de la re-exposición de 30 min), por lo que no es posible determinar si los fenómenos observados en el hipocampo son realmente inducidos al inicio y luego revertidos durante los 30 min de re-exposición, o si directamente sólo son inducidos si los animales salen del contexto a los 3 min. En otras palabras, si bien es perfectamente posible que en ese modelo de memoria estos eventos moleculares ocurran como los autores proponen, los mismos patrones de resultados podrían obtenerse si estos fenómenos fueran inducidos recién tras la salida de los animales del contexto, en concordancia con nuestra hipótesis, por lo que esta visión de una inducción de estos fenómenos al inicio de la re-exposición y su posterior reversión parte del preconcepto de que es la evocación de la memoria contextual quien induce estos procesos, al inicio de la re-exposición.

En nuestro trabajo encontramos que reconsolidación y extinción no imponen una restricción mutua. Sin embargo, existe una posibilidad que es necesario considerar. De acuerdo a las hipótesis planteadas, ambos procesos serían inducidos con un desfase de ~ 2 h 15 min, que es el tiempo que transcurre entre el fin de una y otra re-exposición. Por lo tanto, podría argumentarse que ambos procesos podrían ser capaces de competir o inhibirse mutuamente si fueran disparados con un desfase de tiempo menor. Es decir, podría darse una interacción entre ambos procesos por ejemplo si la extinción se disparara en fases más tempranas del proceso de reconsolidación. Si bien en el presente caso la extinción es inducida ~ 2 h 15 min más tarde que la reconsolidación, el entrenamiento de extinción, que produce la evocación de la vieja memoria y el supuesto fenómeno de inhibición planteado por Mamiya *et al.*, comienza sólo ~ 15 min después de la inducción de la reconsolidación. De modo que casi la totalidad del proceso de reconsolidación de la vieja memoria tiene lugar durante la re-exposición prolongada y durante el desarrollo del proceso de extinción y

consolidación de la memoria de extinción. Aun así podría plantearse que la hipotética inhibición podría darse en los minutos iniciales. Esta posibilidad no puede ser descartada y es necesario tenerla en cuenta, aunque en rigor este planteo llevado al extremo (interacción en los instantes iniciales) terminaría implicando que la interacción se da en el momento de la inducción de uno u otro proceso, en concordancia con nuestra hipótesis.

Otra conclusión que hemos sacado a partir de estos resultados es que la cinética de la reconsolidación no resultaría alterada respecto de lo esperado en ausencia de extinción simultánea. Esta observación es de interés ya que ante la hipótesis de una eventual competencia por recursos moleculares, podría esperarse que uno o ambos procesos demore más tiempo en concluir, por lo que las ventanas de sensibilidad a la CHX podrían extenderse. Sin embargo, aquí encontramos que la CHX no muestra efecto sobre la reconsolidación al ser administrada 5 h 15 min después de la re-exposición corta (Fig. 3.4). Esto está de acuerdo con trabajos anteriores en los que determinamos que la CHX disrumpe la reconsolidación cuando es administrada a las 4 h de la re-exposición pero ya no a las 6 h (Pedreira *et al.* 2002). No obstante, a pesar de no tener efecto sobre la reconsolidación esta inyección bloquea la consolidación de la memoria de extinción. Un aspecto interesante de este resultado es que el hecho que la consolidación de la extinción pueda ser disrumpida selectivamente tras el fin de la reconsolidación muestra que reconsolidación y consolidación de la extinción emergen tras la experiencia comportamental como dos procesos individuales. Si bien estos resultados no permiten descartar una eventual interacción a nivel molecular, esta serie de consideraciones sugieren que reconsolidación y extinción ocurren de modo independiente. Si éste fuera el caso, esto podría darse porque los eventos moleculares asociados a cada proceso no interfieren entre sí, o porque ambos procesos ocurren en sustratos neuronales distintos.

DISCUSIÓN GENERAL

1 – El refuerzo y el mismatch

Los hallazgos de este primer capítulo revelan un remarcable paralelismo entre los resultados encontrados en el marco de los experimentos de reconsolidación y de extinción. Recapitulando las observaciones realizadas en ambas secciones, evidenciamos que el refuerzo y la salida del contexto (fin del CS) ocupan un rol central tanto para la reconsolidación como para la extinción de la memoria. En ambos casos, ninguno de los dos procesos se dispara antes del fin de la re-exposición; en ambos casos, el refuerzo presentado *antes* del fin de la re-exposición previene que uno u otro proceso se dispare; y, en ambos casos, la presentación del refuerzo *después* del fin de la re-exposición ya no muestra efectos restrictivos sobre el proceso inducido.

Podemos concluir entonces que, de acuerdo a la hipótesis del switch propuesta inicialmente (Pedreira & Maldonado 2003), este mecanismo tipo switch que dirige la memoria hacia reconsolidación o hacia extinción sólo opera si se cumplen dos condiciones: la ausencia de refuerzo y el fin de la re-exposición. Si el refuerzo ocurre mientras los animales se encuentran aún en el contexto del entrenamiento, el mecanismo del switch no tiene lugar y ninguno de los dos procesos se dispara. Es decir que la ausencia o presencia del refuerzo durante la re-exposición operaría habilitando o deshabilitando el mecanismo del switch. De este modo, en ausencia del refuerzo (switch habilitado), tras el fin de la re-exposición la memoria evocada se dirige a uno u otro destino, reconsolidación o extinción, dependiendo del tiempo previamente transcurrido. Para que esto ocurra, tras el fin de la re-exposición debería ocurrir una integración de esta información: ocurrencia o no del refuerzo y cantidad de tiempo transcurrido.

Esta última variable, el tiempo transcurrido, podría estar reflejada en una variedad de procesos moleculares, naturalmente dependientes del tiempo. Es interesante en este punto mencionar que en distintos trabajos del laboratorio, se caracterizó la actividad del factor de

transcripción NF- κ B durante el curso de la re-exposición al contexto del entrenamiento, tanto en el cangrejo como en un paradigma de memoria contextual en ratones (Merlo *et al.* 2005; Boccia *et al.* 2007; Merlo & Romano 2008; V. de la Fuente & A. Romano, trabajo enviado). NF- κ B, que también participa en la consolidación original de esta memoria en ambas especies (Freudenthal & Romano 2000; Freudenthal *et al.* 2005), en el cangrejo mostró un cambio en su nivel de actividad como función de la duración de la re-exposición, en animales entrenados pero no en controles no entrenados, encontrándose un pico de activación tras 5 min de re-exposición, una inhibición por debajo de los niveles basales tras tiempos más largos, como 45 min, y posteriormente un retorno a los niveles basales a tiempos mayores. Por su parte, en ratones también se observaron cambios parecidos en los niveles de activación de NF- κ B en función del tiempo previamente transcurrido en el contexto. Estos cambios en los niveles de actividad de NF- κ B podrían estar ocurriendo a medida que el tiempo transcurre dentro del contexto, o podrían producirse rápidamente en el momento de la salida del contexto como consecuencia de otros procesos moleculares que reflejen el transcurso del tiempo durante la re-exposición. Pero en cualquier caso, no dejan de ser una manifestación a nivel molecular, estrechamente relacionada con esta memoria, de la dependencia temporal propuesta para los eventos comportamentales observados. Estos resultados de los eventos moleculares proveen un apoyo a la interpretación hecha de los resultados comportamentales. En este sentido, resultaría muy interesante explorar el perfil temporal de actividad de NF- κ B tras una re-exposición reforzada, y determinar si se observan los mismos niveles de actividad en condiciones comportamentales que ya no son capaces de inducir la reconsolidación o la extinción de la memoria.

Hasta aquí hemos hecho un análisis fenomenológico de los resultados obtenidos. Nos preguntamos ahora por el significado biológico de estos fenómenos y, de acuerdo a lo discutido, proponemos la siguiente interpretación.

La evocación de la memoria como consecuencia de la re-exposición al contexto (CS) implica la recuperación de un conocimiento organizado (la memoria CS-US) que genera predicciones acerca de la realidad (Dudai 2002b) como puede ser, en el modelo experimental, que el US ocurrirá. El intervalo de tiempo en que el animal está en el contexto del entrenamiento sería entonces un período de expectativa durante el cual el sistema computa el pasaje del tiempo y la memoria evocada permanece intacta y consolidada. Durante esta re-exposición la asociación adquirida en el entrenamiento puede resultar confirmada por la ocurrencia del US o no. En este último caso, el fin de la re-exposición al contexto sin la ocurrencia del US señala una incongruencia irreversible entre lo que se esperaba que ocurriera y lo que realmente ocurrió (el mismatch). Si esta incongruencia se confirma tras un período de expectativa corto, entonces se induce la labilización y reconsolidación de la vieja memoria. Si esto se da tras un período de expectativa largo, la vieja memoria permanece consolidada y se dispara el proceso de extinción. Por lo tanto, proponemos que el mismatch entre lo que el animal espera y lo que realmente ocurre dispara la reconsolidación o la extinción de la memoria (Fig. **D.1**).

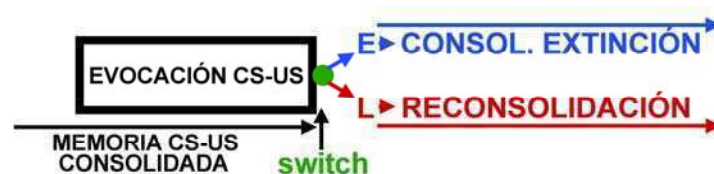


Figura D.1: Hipótesis del switch. La memoria CS-US permanece intacta y consolidada durante toda la re-exposición, hasta que la salida del contexto actúa como disparador de este mecanismo mnésico, llevando la memoria hacia la extinción (E), con la consiguiente consolidación de esta nueva memoria, o hacia la labilización (L) y reconsolidación de la memoria CS-US.

Esta interpretación general supone por lo tanto que reconsolidación y extinción son dos procesos que están vinculados, y esta hipótesis, formalizada en el mecanismo del switch, está basada en la observación experimental, verificada tanto en cangrejos como en diversos vertebrados, de que ambos procesos ocurren de forma mutuamente excluyente (Eisenberg *et al.* 2003; Pedreira & Maldonado 2003; Suzuki *et al.* 2004; Lee *et al.* 2006). Ante todo, resulta notable que frente a la presentación de información relacionada con un aprendizaje anterior el sistema opte entre dos procesos mnésicos con mecanismos tan distintos y a la vez tan antiguamente conservados. Esto podría suponer que el mecanismo propuesto que los vincula, el switch, también podría encontrarse antiguamente conservado. Si bien ya hemos mencionado que la mutua exclusión se observó en una diversidad de especies filogenéticamente distantes, en apoyo de esta hipótesis, nunca se ha determinado en otros modelos experimentales si el mecanismo que subyace la mutua exclusión ocurre, como en el cangrejo, una vez finalizada la re-exposición al CS. Volveremos sobre este punto en las siguientes secciones de esta Discusión General.

Analizaremos a continuación el posible significado biológico del mecanismo del switch, esta opción entre reconsolidación y extinción, suponiendo como verdadera la hipótesis de que la reconsolidación de la memoria es funcional a la incorporación de nueva información integrándola a una traza mnésica previamente consolidada. La mayor parte de los trabajos en los que se propone esta hipótesis se basan en la observación de cambios de tipo cuantitativo en la expresión de la memoria (o en la persistencia de esta expresión) como consecuencia de diversos tratamientos durante la ventana de reconsolidación, por lo que estos cambios podrían deberse a un decremento (o un aumento) en la fuerza de la traza mnésica que se está reconsolidando más que a una

incorporación de información. No obstante, hay algunos trabajos recientes que ofrecen evidencias importantes de que nueva información estaría siendo incorporada en la vieja traza durante el proceso de reconsolidación (Morris *et al.* 2006; Forcato *et al.* 2010).

En primer lugar debemos considerar que la relevancia biológica de la inducción de uno u otro proceso para el procesamiento de la nueva información presentada debería estar dada por la ventaja o conveniencia de labilizar y modificar la traza existente relacionada con esa experiencia, o formar una nueva traza a partir de la nueva información, sin labilizar (ni hipotéticamente modificar) la traza original. En este sentido, resulta particularmente llamativo que mientras que una memoria CS-US se labiliza como consecuencia de lo que podría considerarse un entrenamiento de extinción débil (breve CS no reforzado), la misma memoria sometida a un entrenamiento de extinción más fuerte (CS de mayor duración, o repetido más veces) permanece consolidada (insensible a agentes amnésicos).

Analizando el tipo de experiencias que induce uno u otro proceso en el cangrejo, podríamos conceder que una re-exposición corta al contexto del entrenamiento sin refuerzo es una experiencia comportamental que difiere menos del entrenamiento que la experiencia de una re-exposición larga sin refuerzo. Si se considera el mismatch en sí, no hay gradualidad en la contradicción ocurrida; es todo o nada, la predicción se cumple o no se cumple. Sin embargo, si se piensa en la predicción en términos de probabilidad de ocurrencia del refuerzo, en un tiempo de re-exposición largo es claramente más probable que el refuerzo ocurra que en un tiempo de re-exposición corto. De este modo, podría considerarse que un mismatch tras una re-exposición corta tiene un valor de contradicción distinto (menor) al mismatch tras una re-exposición larga. En otras palabras, si la re-exposición no reforzada es corta, probabilísticamente hablando hay más chances de que el refuerzo eventualmente ocurriera de haber permanecido más tiempo en el contexto. De este modo, si el individuo originalmente aprendió que ese

contexto predice la ocurrencia del refuerzo, y luego es enfrentado al contexto y el refuerzo no ocurre, entonces es *más probable* que la relación entre estímulos aprendida originalmente siga siendo relativamente válida (verdadera) en el presente si la segunda experiencia con el contexto (no reforzada) fue corta que si fue larga. Esta interpretación otorgaría a la re-exposición corta un “carácter contradictorio” más relativo que a una re-exposición larga, donde la no ocurrencia del refuerzo durante tanto tiempo tornaría en poco probable la vigencia de la relación de contingencia original entre el contexto y el refuerzo. De este modo, el carácter más relativo o más absoluto de la contradicción podría estar relacionado con la conveniencia biológica o valor adaptativo de optar por uno u otro proceso mnésico.

Suponiendo que ésta fuera la relación entre el proceso inducido y el grado de contradicción que lo dispara, i.e., bajo grado de contradicción induce reconsolidación (procesamiento en la misma traza) y alto grado de contradicción induce extinción (procesamiento en una nueva traza), podría suponerse que una nueva situación comportamental que difiere poco de aquella del aprendizaje original pueda ser procesada por el sistema simplemente como una reevaluación de la misma experiencia del aprendizaje original, o quizá una pequeña relativización del grado de contingencia entre los estímulos. Pero si la nueva situación es radicalmente distinta de la original podría ser entonces procesada en una traza independiente, como una circunstancia extraordinaria que, aunque está relacionada con la experiencia original (los estímulos son los mismos), sería discriminada como un caso distinto.

Esta visión hipotética, basada en las diferencias más marcadas entre las experiencias que inducen reconsolidación y extinción, podría dar una explicación de qué características cualitativas en términos generales determinan la opción entre uno y otro proceso.

Evaluaremos a continuación la universalidad de los hallazgos realizados en el cangrejo, en relación a otros modelos de memoria, con respecto a las experiencias comportamentales que son capaces de inducir el fenómeno de labilización y reconsolidación de la memoria. Como hemos discutido hasta aquí, una de las conclusiones centrales de este capítulo, y en estrecha relación a la interpretación propuesta más arriba, ha sido que el refuerzo previene la labilización de la vieja memoria.

Nuestros resultados pueden ser interpretados en línea con la hipótesis de que la reconsolidación sería un proceso funcional a la actualización de la vieja memoria (Nader *et al.* 2000a; Sara 2000b; Alberini 2005; Morris *et al.* 2006), dado que muestran que la memoria no resulta labilizada como consecuencia de una experiencia comportamental cuya información es similar a aquella de la experiencia del entrenamiento (CS-US), pero en cambio, sí resulta labilizada como consecuencia de una experiencia que contiene información de significado opuesto (CS-no US) a aquella del entrenamiento, es decir una experiencia relacionada pero diferente. Sin embargo, al considerar la universalidad de estos hallazgos es necesario tener en cuenta que en diversos modelos experimentales se ha evidenciado que la memoria consolidada puede resultar labilizada también como consecuencia de la presentación de un CS reforzado, es decir, una experiencia similar a la del entrenamiento (Sangha *et al.* 2003; Duvarci & Nader 2004; Eisenberg & Dudai 2004; Akirav & Maroun 2006; Lee 2008).

Ante esta situación surgen dos posibilidades. O bien en el cangrejo este fenómeno ocurre de un modo distinto que en los otros modelos experimentales, o bien podría haber alguna diferencia inherente a los paradigmas comportamentales que explique esta discrepancia. Resulta difícil apoyar la primera proposición basándose en argumentos de distancia filogenética, por tres motivos. Primero, tanto los fenómenos mnésicos como los mecanismos moleculares que los subyacen estudiados hasta el momento en el cangrejo han mostrado

estar notablemente conservados en una gran variedad de especies de vertebrados e invertebrados, evidenciando la persistencia evolutiva de ciertos principios básicos de los mecanismos de las memorias (Maldonado 2002). Segundo, entre los modelos experimentales que han mostrado la labilización de la vieja memoria mediante una experiencia que incluye el refuerzo, como en el entrenamiento, se cuenta un paradigma de memoria en el molusco *Lymnaea stagnalis* (Sangha *et al.* 2003), con lo que se puede descartar que ésta sea una característica exclusiva de vertebrados. Tercero, resulta de gran interés destacar que esta hipótesis de la labilización de la memoria como consecuencia de un mismatch entre lo que el individuo predice que ocurrirá y lo que realmente ocurre, formulada a partir de los resultados obtenidos en el cangrejo, ha sido verificada recientemente en un trabajo de nuestro laboratorio en una memoria declarativa en humanos (Forcato *et al.* 2009).

Si en cambio consideráramos que estas discrepancias podrían deberse a diferencias en los paradigmas comportamentales utilizados, de sostener la hipótesis de que sólo las experiencias que contienen información significativa son capaces de labilizar la memoria, deberíamos preguntarnos por qué en aquellos paradigmas una nueva presentación del CS reforzado constituye información significativa para el individuo mientras que en el paradigma de memoria contexto-señal no.

Una posibilidad sería que la diferencia pase por la saliencia del US en cada caso, lo que podría determinar la importancia que un único ensayo CS-US presentado en esta nueva experiencia pueda tener para el animal en cada uno de estos paradigmas. En muchos casos, en estos paradigmas en los que la memoria puede labilizarse con un ensayo CS-US, esta memoria de largo término es generada ella misma por un único ensayo CS-US, de las mismas características que el utilizado para labilizarla (e.g. Duvarci & Nader 2004; Lee 2008). Es decir, la memoria consolidada resulta labilizada por un único ensayo que posee la fuerza necesaria como para generar una memoria que se exprese a largo

término. Del mismo modo, en otros paradigmas de memoria diferentes, como la tarea de reconocimiento de objetos, la experiencia utilizada para labilizar la memoria es igual a la del entrenamiento. Es decir, es igual no sólo en términos de la relación de estímulos sino también en duración (Akirav & Maroun 2006), por lo que, nuevamente, la memoria es labilizada por una experiencia que *per se* tiene la intensidad suficiente como para generar una memoria de largo término. Por su parte, en el paradigma de condicionamiento operante en el molusco *Lymnaea*, la memoria también resulta labilizada por una experiencia del mismo signo que la del aprendizaje original que, si bien no es igual en intensidad, no consiste en un único ensayo sino en una extensa sesión de 45 min incluyendo múltiples ensayos (Sangha *et al.* 2003). En otras palabras, en estos paradigmas la experiencia utilizada para labilizar la memoria consiste de uno o más ensayos reforzados que, dada su considerable intensidad, constituye *per se* una verdadera sesión de entrenamiento.

Todos estos casos contrastan notoriamente con el paradigma de memoria contexto-señal en el cangrejo en el que el entrenamiento consta de 15 ensayos CS-US, y en el que un único ensayo CS-US (o incluso una serie de 5 ó 10 ensayos) es incapaz de generar una memoria que se exprese a largo término (Delorenzi *et al.* 1995; Freudenthal & Romano 2000). Esta relación pone de manifiesto la gran diferencia entre éste y los otros paradigmas de memoria respecto del valor que puede tener para el animal la presentación de un único ensayo reforzado, tanto en términos absolutos como en relación al entrenamiento.

En consecuencia, podríamos hipotetizar que en este paradigma en el cangrejo, un único ensayo que confirma la relación de estímulos del aprendizaje anterior no poseería la relevancia o intensidad suficiente como para inducir la labilización de la memoria consolidada. Sin embargo, si este mismo ensayo no incluye el refuerzo induciría entonces la labilización dado que esto pasaría a representar una información

significativamente distinta a aquella del entrenamiento, por cambiar la relación entre estímulos. Una predicción que surge de esta hipótesis es que la presentación de un número mayor de ensayos CS-US, i.e., una nueva sesión de entrenamiento, podría ser capaz de inducir la labilización de la vieja memoria. Si esta situación se confirmara, deberíamos entonces considerar que la capacidad de labilizar la vieja memoria no dependería exclusivamente de la relación entre estímulos, si tienen o no el mismo signo que en la memoria consolidada, sino de la importancia general de esta nueva experiencia en relación a lo previamente aprendido.

En base a estas consideraciones podría proponerse a modo de síntesis que, un único CS sin reforzar podría tener la capacidad de inducir el fenómeno de reconsolidación de la vieja memoria por constituir una experiencia con nueva información (de distinto signo) respecto del aprendizaje anterior. Por su parte, un CS reforzado, que constituye una experiencia en la que la relación de estímulos es la misma que en el entrenamiento, tendría la capacidad de inducir este fenómeno de reconsolidación sólo si tiene la intensidad necesaria como para inducir fenómenos de plasticidad a largo término, con lo que esta experiencia representaría probablemente un episodio significativo en relación al aprendizaje original.

Estas hipótesis respecto de la configuración de estímulos capaces de inducir la labilización de la memoria integran los hallazgos realizados en el cangrejo con los de otros paradigmas de memoria, complementando las conclusiones discutidas más arriba acerca de lo que ocurriría en el cangrejo ante la presentación de un único ensayo, reforzado o sin reforzar.

2 – El fin del CS y el destino de la vieja memoria

En este segundo capítulo, hemos sacado importantes conclusiones acerca de la dinámica del proceso de extinción de la memoria en el cangrejo. Una de estas conclusiones es que en el cangrejo la memoria CS-US no resulta extinguida durante la re-exposición al CS, por larga que ésta sea, sino que la extinción ocurre pocos segundos después del fin del CS. Dado que este hallazgo va en contra de la visión generalizada de que la extinción de la memoria ocurre mientras los animales son expuestos al CS sin refuerzo, nos preguntamos por la universalidad de estas conclusiones. Como mencionamos en la Introducción del Capítulo II (Sección 1.1), nuestros resultados y conclusiones acerca de que la extinción se dispara tras el fin del CS pueden ser conciliados con la visión de una extinción intra-sesión en un paradigma de extinción de ensayos múltiples (EEM), ya que en estos paradigmas el decremento gradual de la respuesta condicionada que se observa en cada ensayo de la sesión podría estar dado por la extinción inducida tras el ensayo anterior. Sin embargo, una discrepancia aparece al contrastar nuestros resultados con aquellos de otros trabajos con una extinción de ensayo único (EEU) donde se observa una extinción intra-sesión. En la literatura existen pocos ejemplos de paradigmas de EEU. Uno de los más comunes entre estos es el paradigma de memoria de miedo al contexto en roedores, en el que se asocia la ocurrencia de un shock eléctrico al contexto espacial en el que esto ocurre. Este paradigma guarda ciertos puntos de contacto con el paradigma de memoria contexto-señal utilizado en nuestro laboratorio, ya que en ambos casos el contexto (CS) es asociado a un US aversivo, y en ambos casos la extinción se logra por una única re-exposición de los animales al contexto del aprendizaje, en ausencia del refuerzo, siempre que esta re-exposición supere cierto valor de tiempo. Si bien en este paradigma en ratones se ha reportado la extinción intra-sesión de la respuesta condicionada (Cain *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2004), el *freezing* o congelamiento, esta interpretación es de relativa

validez, y ha sido puesta en duda en diversos trabajos. Estas objeciones están motivadas en que el freezing, como respuesta defensiva, es una respuesta activa y por lo tanto es cuestionable la posibilidad de que un animal continúe haciendo freezing al contexto durante largos períodos de tiempo (e.g. 30 min) independientemente de si se produjo la extinción de la memoria de miedo al contexto. Se han ofrecido otras explicaciones que pueden contribuir a un decremento en la respuesta de freezing durante la re-exposición al contexto, como la fatiga o la habituación al contexto (McSweeney & Swindell 2002; Cain *et al.* 2003, 2004). En este sentido, pensamos que el paradigma comportamental en cangrejos ofrece una ventaja única: la posibilidad de evaluar el estado de la memoria de manera puntual en un momento dado de la re-exposición, sin necesidad de haberla evaluado previamente de modo continuo a lo largo de todo este período.

Un modelo experimental en ratas con estas características, que podría permitir poner a prueba esta hipótesis de una extinción tras el fin del CS, es el paradigma de sobresalto potenciado por miedo (Falls *et al.* 1992; Lin *et al.* 2001), en el que la respuesta comportamental medida no se expresa directamente con la exposición al CS, sino que se expresa ante un estímulo aversivo en presencia del CS. De este modo, al igual que en el paradigma de memoria contexto-señal en el cangrejo, la memoria CS-US puede ser extinguida por presentación del CS sin reforzar y sin provocar la expresión continua de la vieja memoria. Sin embargo, en los trabajos que utilizan este paradigma nunca se ha utilizado un entrenamiento de extinción de ensayo único. En estos trabajos el aprendizaje CS-US consiste en un condicionamiento por claves (luz-shock), un tipo de condicionamiento que normalmente es extinguido mediante ensayos múltiples. Sería entonces interesante explorar alguna variante de este paradigma, quizá algún tipo de versión contextual, que permita una EEU.

En el capítulo anterior discutimos acerca del valor diferencial del refuerzo de acuerdo a si éste es presentado antes o después del fin del CS. Observamos que presentado antes de la salida del contexto el refuerzo previene tanto la labilización como la extinción de la memoria, mientras que presentado 4 h después ya no tiene ningún efecto observable sobre estos procesos. En este segundo capítulo estrechamos estos márgenes de tiempo al encontrar que, por un lado, bastan apenas 18 seg tras el fin del CS corto para que el este refuerzo pierda la capacidad de prevenir el proceso de labilización de la vieja memoria, sugiriendo que ésta ya ha sido inducida. Por otra parte, encontramos que bastan apenas 54 seg tras el fin del CS largo para encontrar que la memoria de extinción ya se expresa. Esto sugiere que, además de que el fin del CS de actúa como disparador de estos procesos mnésicos, estos eventos ocurrirían rápidamente.

Propusimos también en el primer capítulo que, en ausencia de refuerzo, un mecanismo tipo switch ocurre tras el fin del CS dirigiendo la memoria hacia la reconsolidación o hacia la extinción, dependiendo del tiempo previamente transcurrido (ver Fig. D.1). Los resultados obtenidos en este segundo capítulo respaldan esta hipótesis al poner nuevamente en relieve la importancia central que tienen para la inducción de estos procesos mnésicos los eventos que ocurren en los instantes siguientes al fin del CS. Si las hipótesis que acabamos de plantear acerca del rol del fin del CS tuvieran una validez universal, tanto en protocolos de ensayo único como de ensayos múltiples, nos preguntamos cómo reinterpretar esta hipótesis del switch en el marco de un protocolo de ensayos múltiples. En la próxima sección de esta Discusión General, a la luz de las conclusiones acerca de la posibilidad de ocurrencia simultánea de estos dos procesos mnésicos ante la presentación de más de un CS, propondremos una interpretación más abarcativa de este mecanismo del switch reconsolidación-extinción.

3 - Reconsolidación y extinción de la memoria: mutua exclusión o coexistencia

A partir de los resultados de este tercer capítulo hemos propuesto que los procesos de reconsolidación y extinción de la memoria pueden ser mutuamente excluyentes o pueden ocurrir simultáneamente, dependiendo de si son inducidos por un único CS o por sendos CSs, respectivamente. De acuerdo a la hipótesis del switch, el fin de un CS es capaz de inducir un solo proceso, por lo que la ocurrencia de la reconsolidación y la extinción requiere de la presentación de al menos de dos CSs distintos. Como mostramos en este trabajo, la labilización y reconsolidación se inducen tras el primer CS (de corta duración) y la extinción y su consolidación, tras el segundo CS (de larga duración); y, dado que estos CSs ocurren de modo suficientemente cercano en el tiempo, los procesos de reconsolidación y extinción se solapan, desarrollándose simultáneamente (Fig. D.2).

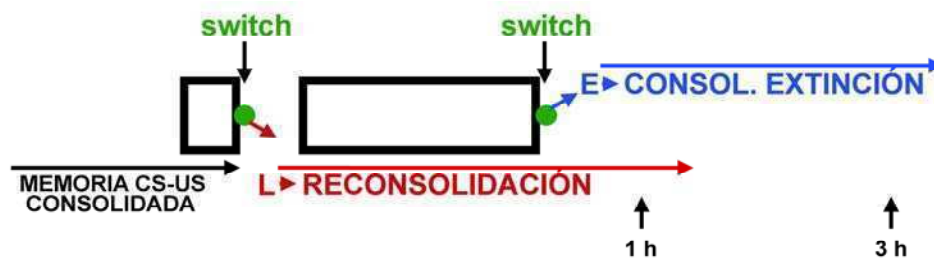


Figura D.2: Protocolo de doble re-exposición e inducción de cada proceso mnésico. De acuerdo a las hipótesis planteadas, la memoria CS-US permanece consolidada hasta que la labilización (L) y reconsolidación se disparan tras el fin de la primera re-exposición. Por su parte, la extinción (E) y su consolidación se disparan, tras el fin de la segunda re-exposición. Se indican los tiempos en los que cada proceso mnésico fue interferido con CHX: reconsolidación a 1 h (Fig. 3.2), y consolidación de la extinción a 3 h (Fig. 3.4).

Estas conclusiones vuelven a reafirmar el rol central del fin de la re-exposición en la inducción de estos procesos, y a su vez plantean interesantes preguntas relacionadas con los objetivos centrales de esta tesis. En particular, resulta de gran interés discutir las implicancias de la ocurrencia simultánea de la reconsolidación y la extinción de la memoria, y también hasta qué punto esta ocurrencia simultánea podría representar una característica general del procesamiento de las memorias. A continuación discutiremos estos hallazgos y la universalidad de estas conclusiones. Discutiremos en particular cómo se relacionan estos resultados con la observación en otros trabajos de que los agentes amnésicos administrados antes de un entrenamiento de extinción de ensayos múltiples bloquean la consolidación de la extinción y no afectan la vieja memoria.

El hecho de que ante la presentación de más de un CS, la reconsolidación y la extinción puedan ocurrir simultáneamente implica que podría haber una diferencia cualitativa entre una EEU y una EEM en los casos en que ésta última permita la labilización inicial de la vieja memoria, ya que de acuerdo a las hipótesis propuestas en este sentido, la labilización podría permitir la incorporación de nueva información a la vieja traza. Esto supone que podría haber un resultado mnésico distinto para cada tipo de extinción en relación a la integridad de la vieja traza CS-US. En el primer caso (EEU), al haber un único fin de CS ambos procesos serían mutuamente excluyentes, por lo que si la memoria resulta extinguida la vieja traza CS-US se mantendría en todo momento consolidada. De este modo, la extinción de la vieja memoria supondría una competencia entre las dos trazas, de acuerdo a la visión clásica del fenómeno. Mientras tanto, en el segundo caso (EEM), si la memoria original resulta labilizada podría ocurrir un debilitamiento, modulación o cambio de significado de la información contenida en la vieja traza como producto de la experiencia comportamental concurrente (el entrenamiento de extinción), una experiencia con un significado opuesto a aquel de la memoria labilizada. Fenómenos de este tipo podrían ser

compatibles con la visión de un “desaprendizaje” (*unlearning*) durante la extinción propuesta por algunos autores (Lin *et al.* 2003a; 2003b; 2003c).

Sin embargo es notorio que, en general, en la literatura se muestra que los paradigmas de EEM no inducen la labilización de la memoria original sino que inducen solamente el proceso de extinción (e.g. Eisenberg *et al.* 2003; Lee *et al.* 2006). Por el contrario, son raros los casos donde se observó que una EEM induce además la labilización de la vieja memoria (Duvarci *et al.* 2006). Por lo tanto, cabe preguntarse a qué se debe que ante una presentación sucesiva de CSs estos sean procesados como una sucesión de eventos capaces de inducir la labilización y reconsolidación de la vieja memoria, al menos inicialmente, o que en cambio induzcan solamente una extinción. En otras palabras, de qué factores puede depender que, si un breve CS no reforzado induce la labilización de la vieja memoria, la presentación subsiguiente de CSs adicionales prevenga o no este fenómeno. Evidentemente, un parámetro central debe ser el intervalo entre ensayos (*inter-trial interval*, ITI), ya que si éste fuera lo suficientemente prolongado llegaría un punto en el que la vieja memoria resultaría labilizada y reconsolidada antes de que los subsiguientes CSs puedan ejercer algún efecto (Fig. **D.3A**). Por lo tanto, sería necesario asumir que en los casos en los que una EEM no induce la labilización, un factor determinante sería entonces un ITI breve en términos relativos (Fig. **D.3B**). De este modo, podríamos postular la existencia de un *intervalo crítico* después del primer CS tras el cual la labilización de la vieja memoria es un evento irreversible. De acuerdo a esta hipótesis, en el presente trabajo el intervalo que tiene lugar tras la primera re-exposición (15 min) excedería este intervalo crítico, ya que la vieja memoria resulta labilizada y reconsolidada (Fig. **D.3C**), mientras que en paradigmas de EEM en los que la reconsolidación nunca se dispara este intervalo crítico nunca se alcanzaría entre ensayo y ensayo.

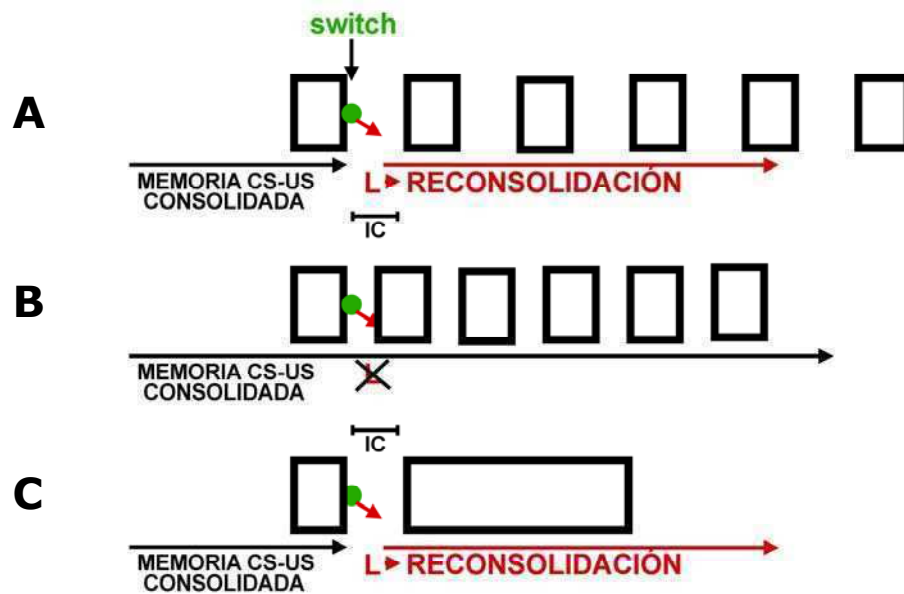


Figura D.3: Hipótesis del intervalo crítico (IC) necesario entre ensayos para la labilización de la memoria. (A) Si tras el primer ensayo transcurre tiempo suficiente ($>IC$) esto permitiría la labilización de la memoria. (B) Si el intervalo entre ensayos es menor al IC, lo que hipotéticamente sería el caso de la mayoría de los protocolos de EEM, se prevendría la inducción de la labilización de la memoria. (C) Éste sería el caso de los presentes resultados (Cap. III). De acuerdo a la hipótesis, en cada uno de los tres casos, si la re-exposición total es suficiente, puede disiparse también la extinción de la memoria (no se indica).

Existe un trabajo reciente del laboratorio de Joseph LeDoux de particular interés en relación a estos resultados y a las hipótesis planteadas (Monfils *et al.* 2009). En este trabajo en ratas usando un paradigma de memoria aversiva de claves tipo tono-shock, los autores observan que luego de inducir mediante un único CS corto la labilización de la memoria, un entrenamiento de EEM presentado subsiguientemente tiene distinto efecto sobre la expresión de la memoria original dependiendo de si es realizado dentro de la ventana temporal de la reconsolidación o fuera de ésta. Los autores encuentran que si la extinción se induce durante la ventana de reconsolidación, la vieja memoria no puede ser recuperada en evaluaciones posteriores mediante ninguno de los procedimientos generalmente utilizados para

recuperar una memoria extinguida (renewal, reinstatement, re-entrenamiento, recuperación espontánea). En cambio, si el entrenamiento de extinción ocurre una vez que la reconsolidación finalizó, la vieja memoria es luego recuperada por cualquiera de estos procedimientos. Ante estos resultados, los autores sugieren que este efecto diferencial se debe al estado de labilidad, y por lo tanto de maleabilidad, de la vieja memoria, por lo que interpretan que el entrenamiento de extinción estaría actuando directamente sobre la traza de la vieja memoria, ya sea disruptiéndola o a modo de una re-evaluación del valor del CS incorporada a la vieja traza CS-US (*updating*). La interpretación que hacen los autores en términos de un *updating* apoya nuestra hipótesis acerca de las posibles diferencias cualitativas entre una EEU y una EEM en función de si la vieja memoria resulta labilizada. No obstante, en este trabajo en ratas no se muestran evidencias de que el efecto logrado sobre la desaparición permanente de la respuesta condicionada se deba a un *updating* y no a una interferencia inespecífica con el proceso de reconsolidación. De todos modos, cualquier interpretación de los resultados requiere considerar la labilización de la vieja memoria, ya que la pérdida permanente de la expresión de la memoria CS-US depende de la ocurrencia del EEM dentro de la ventana de reconsolidación. En un trabajo posterior, estos resultados obtenidos en ratas fueron extendidos a humanos usando un paradigma de claves visuales asociadas a un shock leve (Schiller *et al.* 2010).

El trabajo de Monfils *et al.* presenta diferencias y coincidencias con nuestros resultados e hipótesis. Por un lado, la diferencia más notoria con nuestros resultados es que en nuestro trabajo el entrenamiento de extinción no parece tener efecto alguno sobre la traza original más allá de inhibir transitoriamente su expresión, del mismo modo que lo hace en ausencia de reconsolidación simultánea. En cambio en el trabajo de Monfils *et al.* la ocurrencia del entrenamiento de extinción dentro de la ventana temporal de la reconsolidación torna a la

vieja memoria irrecuperable. Si bien ésta es una discrepancia central, esto podría deberse a diferencias paramétricas, por ejemplo en la fuerza de los entrenamientos de extinción en uno y otro trabajo, o en la relación de intensidades entrenamiento CS-US/entrenamiento de extinción, lo que podría determinar la magnitud del efecto que el entrenamiento de extinción pueda tener sobre la vieja traza. En aquel trabajo, se utiliza un entrenamiento CS-US que podría considerarse relativamente débil, de 3 pareamientos CS-US, usando como CS un tono de 20 seg y como US un shock de 0,7 mA, 500 ms. Por ejemplo, a modo comparativo, en trabajos anteriores sobre extinción del mismo laboratorio los entrenamientos CS-US utilizados son notoriamente más fuertes, e.g. 7xCS-US; CS=30 seg; US=0,7 mA, 1 seg (Sotres-Bayon *et al.* 2007; 2009). Por su parte, el protocolo de EEM utilizado por Monfils *et al.* (18xCS) lleva la respuesta condicionada a niveles asintóticos varios ensayos antes de finalizado. Por lo tanto, la utilización de un entrenamiento CS-US débil y un entrenamiento de extinción extensivo podrían contribuir a explicar estas diferencias con nuestros resultados.

Por otro lado, este trabajo coincide con el nuestro al mostrar que si el entrenamiento de extinción es demorado cierto tiempo tras el primer ensayo ya no sería capaz de prevenir la inducción de la labilización de la vieja memoria. Es interesante destacar que el intervalo de tiempo intercalado entre el primer ensayo y el resto del entrenamiento de extinción en los dos trabajos mencionados es de apenas 10 min (Monfils *et al.* 2009; Schiller *et al.* 2010). Estos valores son muy similares al del intervalo utilizado en nuestro trabajo, que fue de 15 min. De acuerdo a la hipótesis propuesta, el intervalo crítico planteado para que la labilización de la vieja memoria ocurra se encontraría por debajo de los 10 – 15 min en los tres trabajos, abarcando cangrejos, ratas y humanos. En relación a cuán corto puede llegar a ser este intervalo crítico, debemos considerar que en los paradigmas de EEM en los que se evidenció que la vieja memoria no resulta labilizada, el ITI es generalmente del orden de los pocos minutos

(e.g. 2 min, Eisenberg *et al.* 2003; 1 min, Lee *et al.* 2006), por lo que este intervalo crítico debería encontrarse por encima de estos valores. Existen muchos otros trabajos que han estudiado los mecanismos de la EEM utilizando ITIs iguales a estos últimos o algo mayores (e.g. 1 min, Baker & Azorlosa 1996; 4 ± 2 min, Sotres-Bayon *et al.* 2007; 2009). Aunque en estos trabajos no se ha puesto a prueba si estos protocolos de EEM son capaces de inducir también la labilización de la vieja memoria, la naturaleza de las drogas utilizadas para estudiar la extinción (e.g. antagonistas de receptores NMDA), frecuentemente utilizadas como bloqueantes de la reconsolidación en distintos paradigmas (Przybylski & Sara 1997; Pedreira *et al.* 2002; Torras-García *et al.* 2005; Akirav & Maroun 2006; Lee *et al.* 2006), sugeriría que si la vieja memoria hubiera resultado labilizada su reconsolidación se habría visto impedida. Por su parte, el único trabajo que reporta que una EEM induce además la labilización de la memoria CS-US no informa el ITI empleado (Duvarci *et al.* 2006). En resumen, en base a la hipótesis propuesta, podría esperarse que un entrenamiento de EEM “permita” la inducción de la labilización y reconsolidación de la vieja memoria si el intervalo (al menos entre el primer y segundo ensayo) supera cierto valor umbral. Considerando los antecedentes en el conjunto de resultados citados, este valor umbral, el intervalo crítico, debería encontrarse por encima de los 2 – 4 min y por debajo de los 10 – 15 min. No obstante, es ciertamente posible que el valor de este intervalo crítico dependa asimismo de otros parámetros del entrenamiento CS-US y/o del entrenamiento de extinción, variando por lo tanto de un paradigma a otro. De cualquier modo, en coincidencia con nuestras hipótesis, estos trabajos parecen indicar que los eventos que ocurren en el sistema durante los primeros pocos minutos tras el fin del primer CS serían clave para que la experiencia subsiguiente pueda o no prevenir la labilización y reconsolidación de la vieja memoria.

En relación a este intervalo crítico y a nuestros resultados de este tercer capítulo, otra posibilidad a considerar es que, en sintonía con la

relevancia del fin de la re-exposición para la inducción de estos procesos, el intervalo crítico no opere entre el fin de la primera re-exposición y el comienzo de la re-exposición siguiente, sino que opere entre el fin de una re-exposición y *el fin* de la siguiente. Es decir, entre eventos de inducción de estos procesos mnésicos. De ser así, en el presente caso el intervalo empleado pasaría de durar 15 min a durar 2 h 15 min, mientras que en paradigmas de EEM en los que cada ensayo tiene una duración del orden de los segundos el intervalo se seguiría manteniendo en valores parecidos al ITI, del orden de los pocos minutos (Fig. **D.4A,B**). Estas dos hipótesis alternativas implicarían que en la serie de resultados de este capítulo, la labilización y reconsolidación de la vieja memoria ocurren porque (a) durante 15 min no comienza la segunda re-exposición, o (b) durante 2 h 15 min no finaliza la segunda re-exposición. Para poner a prueba estas dos hipótesis acerca del intervalo crítico, sería necesario repetir estos experimentos, pero acortando el intervalo entre re-exposición corta y re-exposición larga y evaluar si la vieja memoria resulta labilizada de todos modos (Fig. **D.4C**). Si el intervalo crítico operara exclusivamente durante el ITI (caso “a”) podría eventualmente llegarse a una situación donde el inicio de la segunda re-exposición ocurriera tan cerca del fin de la primera que previniera la inducción de la labilización y reconsolidación de la memoria. Alternativamente, si el intervalo crítico operara entre el final de una y otra re-exposición (caso “b”) sería difícil determinarlo, ya que el acortamiento de este intervalo implicaría un acortamiento de la segunda re-exposición, con lo que dejaría de inducirse la extinción de la memoria.

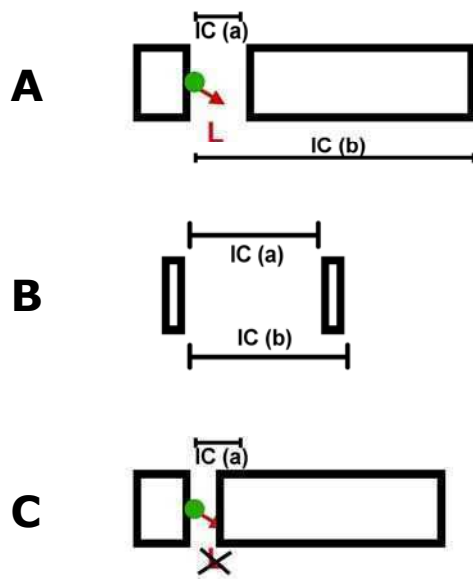


Figura D.4: Hipótesis de un intervalo crítico ente el fin de una re-exposición y el inicio de la siguiente (a), o entre el fin de una y otra re-exposición (b). (A) En el caso del presente protocolo de doble re-exposición, la diferencia de tiempo entre un caso y otro es considerable. (B) En el caso de ensayos muy breves, como ocurre generalmente en los protocolos de EEM, la diferencia de tiempo entre uno y otro caso sería poco relevante. (C) En el caso que la primera hipótesis (a) fuera correcta, esto se evidenciaría con el presente protocolo reduciendo el tiempo entre re-exposiciones.

Un resultado del Capítulo II que guarda relación con estas hipótesis es aquel que muestra que un refuerzo presentado apenas 18 seg después del fin de la re-exposición corta no logra prevenir la inducción de la labilización y reconsolidación de la memoria (Fig. 2.14). De acuerdo a las conclusiones formuladas entonces, si bien este resultado no demuestra que en el momento de la presentación del refuerzo la labilización de la memoria ya tuvo lugar o ya se inició, sí muestra que en este punto tras la re-exposición la inducción de la labilización ya no puede ser evitada por esa experiencia comportamental. Esto podría parecer un resultado disonante respecto de lo planteado más arriba ya que el hallazgo de que la labilización no podría ser prevenida tras un intervalo tan breve (18 seg) no parece compatible con la observación en otros paradigmas de EEM que la ocurrencia de ensayos subsiguiente tras intervalos de 1 ó 2 min sí previenen la labilización de la vieja memoria. Por lo tanto, sería necesario considerar que, o bien un ensayo reforzado (nuestros resultados) y un ensayo no reforzado (otros paradigmas de EEM) no son comparables respecto de su capacidad de prevenir la subsiguiente

labilización de la memoria, o bien estas conclusiones en el cangrejo no tienen un valor universal, o están al menos sujetas a importantes variaciones paramétricas respecto de otros paradigmas comportamentales. Por último, es necesario tener en cuenta que en el cangrejo, por tratarse de una memoria contextual, el efecto del espaciamiento entre ensayos podría ser naturalmente distinto al de una memoria en la que el CS es una clave discreta, quizá más susceptible de ocurrir en el tiempo de forma reiterada, intermitente.

A continuación discutiremos una conexión muy interesante entre distintos trabajos de extinción, que guardan una relación con los resultados de Monfils *et al.* citados anteriormente, y con las hipótesis que hemos propuesto. Algunos trabajos en los últimos años han mostrado que mecanismos distintos subyacerían los procesos de extinción de la memoria de acuerdo a si se trata de una extinción temprana, llevada a cabo poco tiempo después del entrenamiento CS-US, o si se trata de una extinción tardía, realizada cierto tiempo después, por lo general a tiempos como 24 h, en los que la vieja memoria ya se encuentra consolidada (Cain *et al.* 2005; Myers *et al.* 2006). En particular, en el trabajo de Myers *et al.* se muestra que un entrenamiento de extinción (una EEM), cuando es llevado a cabo 24 h post entrenamiento induce una pérdida de la respuesta condicionada de forma transitoria que, en concordancia con la visión clásica de la extinción, puede ser recuperada posteriormente por cualquiera de los procedimientos comportamentales habituales, como reinstatement, renewal, o recuperación espontánea. Sin embargo, si el mismo entrenamiento de extinción es realizado poco después del entrenamiento CS-US (10 min ó 1 h), y manteniendo iguales todos los demás parámetros, la memoria CS-US ya no puede ser recuperada posteriormente mediante ninguno de los procedimientos comportamentales mencionados. A la luz de las observaciones de que la extinción temprana y la tardía dependerían de mecanismos distintos (e.g. Cain *et al.* 2005), y que en trabajos que estudian los mecanismos

de la extinción temprana encuentran eventos moleculares relacionados con la despotenciación sináptica (Lin *et al.* 2003a; 2003b; 2003c), los autores interpretan estos resultados en términos de “desaprendizaje”. Estos hallazgos resultan particularmente interesantes al relacionarlos con el estudio de Monfils *et al.* (2009), en el que obtienen resultados similares pero realizando el entrenamiento de extinción poco tiempo después (10 min ó 1 h, llamativamente) de la labilización de la memoria por re-exposición a un CS corto, en lugar de poco después del entrenamiento CS-US. Una hipótesis interesante que emerge ante este paralelismo, y en concordancia con lo que propusimos a partir de nuestros resultados, es la posibilidad de que la inducción de la extinción produzca resultados cualitativamente distintos (i.e., reaprendizaje versus desaprendizaje), no en función del tiempo transcurrido tras el entrenamiento CS-US sino más bien en función del estado de lábil o consolidado de la vieja memoria. O, en los términos propuestos por Lewis (1979), en función del estado activo o inactivo de la vieja memoria (Fig. **D.5**).

Por último, buscaremos proponer un esquema interpretativo de la inducción de los procesos de reconsolidación y de extinción de la memoria ante un protocolo de ensayos múltiples a la luz de nuestros resultados, que muestran (a) un rol central del fin del CS para la inducción de estos procesos, (b) que dos CSs presentados en serie son capaces de inducir uno y otro proceso respectivamente, y (c) que ambos procesos pueden ocurrir en paralelo si son inducidos de forma cercana en el tiempo. Y consideraremos también los resultados en otros modelos experimentales en los que los protocolos de EEM no inducen la labilización de la memoria CS-US. Sosteniendo entonces como premisas principales el hecho de que el fin del CS es un punto de integración de información y que tras cada CS uno u otro proceso puede ser inducido,

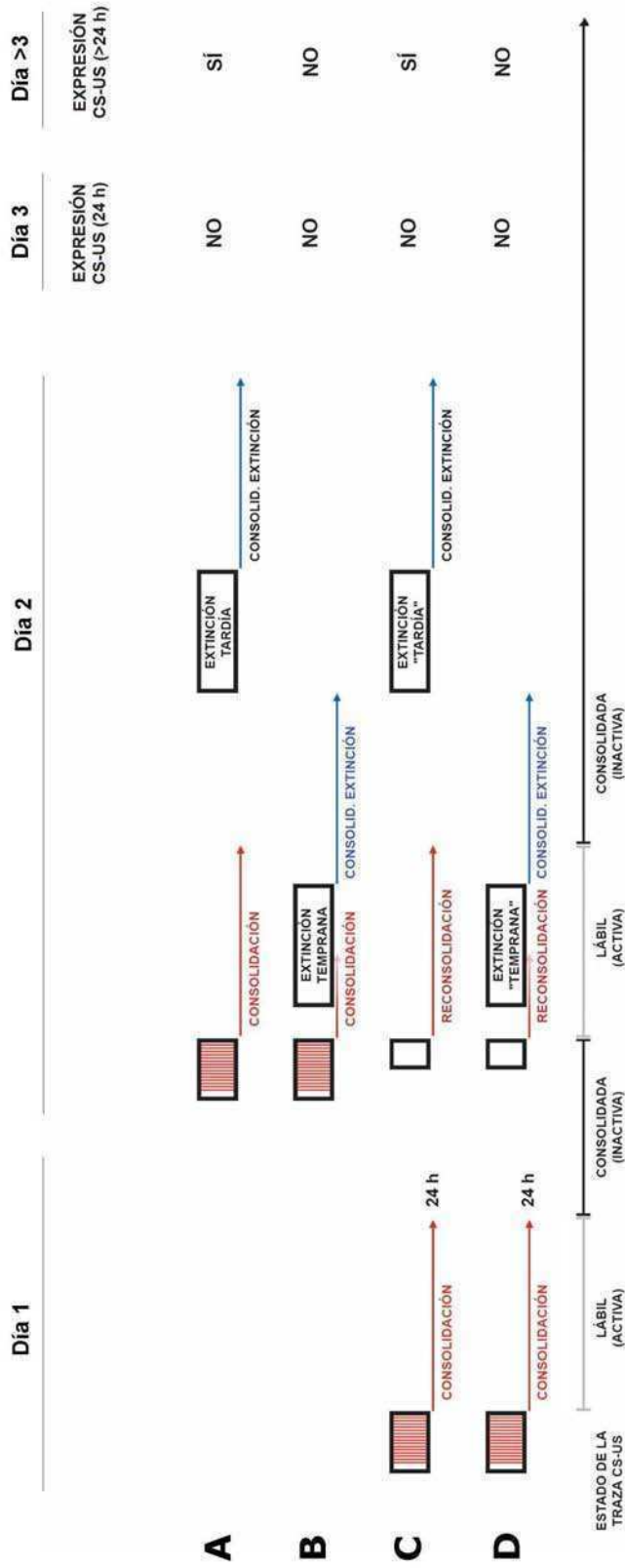


Figura D.5: Hipótesis de una extinción diferencial dependiendo de si la memoria CS-US se encuentra consolidada (estado inactivo) o lábil (estado activo). Esta situación podría darse tanto fuera (A) o dentro (B) de la ventana de labilidad tras el entrenamiento CS-US (consolidación), como fuera (C) o dentro (D) de la ventana de labilidad tras el recordatorio (reconsolidación). De acuerdo a esta hipótesis, mientras que la falta de retención en el Día 3 estaría dada por la expresión de la memoria de extinción, la recuperación de la memoria CS-US en las evaluaciones más tardías (Día >3) podría depender de si esta traza se encontraba lábil y (re)consolidándose al momento del entrenamiento de extinción.

la interpretación más parsimoniosa sería que ante la presentación de un protocolo de ensayos múltiples sin reforzar (EEM), el switch reconsolidación-extinción podría ocurrir tras el fin de cada CS. Este evento ha sido observado en los resultados del tercer capítulo ante la presentación serial de dos CSs, aunque en este caso se trató de dos CSs de duración distinta. Ante una sucesión de CSs de igual duración este mecanismo podría actuar induciendo uno u otro proceso mnésico ya no de acuerdo al tiempo transcurrido exclusivamente durante el CS previo sino integrando de algún modo la información de los CSs anteriores. Esta integración de información, de acuerdo a lo discutido, debería dar cuenta de algún modo del tiempo transcurrido *durante* los ensayos como del tiempo transcurrido *entre* ensayos, ya que de esto último dependería la eventual inducción del proceso de labilización y reconsolidación. De este modo, los procesos inducidos tras el fin de los CSs iniciales, si están lo suficientemente espaciados podrían contribuir a la labilización y reconsolidación de la vieja traza, y a partir de cierto punto, cuando la cantidad de ensayos acumulados es suficiente como para inducir una extinción significativa, éste sea el proceso mnésico inducido tras los CSs subsiguientes (Fig. D.6).

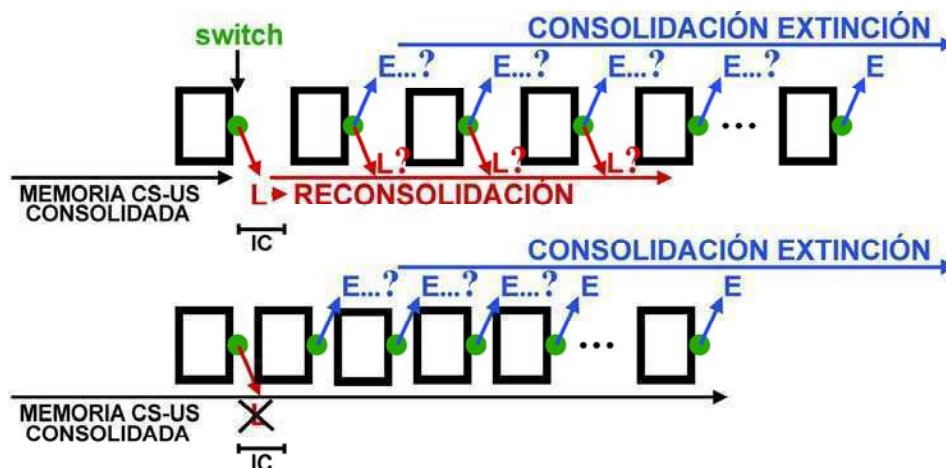


Figura D.6: Esquema hipotético de cómo podría ocurrir la inducción de la labilización (L) (y la subsiguiente reconsolidación) y de la extinción (E) (y su consolidación) en un protocolo de ensayos múltiples. **(A)** Si el ITI fuera mayor al intervalo crítico (IC), podría esperarse que se induzca la labilización (L), al menos tras el primer ensayo, o los primeros ensayos. Tras cada CS, uno u otro proceso podría dispararse de acuerdo a la historia de los ensayos previos. **(B)** Si el ITI fuera menor al IC, la labilización no sería inducida, y la vieja memoria permanecería consolidada durante la presentación de los ensayos sucesivos.

Recientemente, en nuestro laboratorio se ha puesto a punto un nuevo protocolo de EEM en el cangrejo, haciendo uso de la metodología de cambio virtual del contexto (Hepp *et al.* 2010). En concordancia con el modelo propuesto, en este trabajo se muestra que así como la EEU en el cangrejo requiere una re-exposición de al menos 1 h de duración (Pedreira & Maldonado 2003), la EEM requiere de un tiempo comparable transcurrido en el contexto del entrenamiento (contexto estándar), aunque repartido entre los múltiples ensayos. Así, una serie de 18 re-exposiciones no reforzadas, cada una con una duración de 5 min, y un ITI=1 min (transcurrido en el contexto alternativo), logran la extinción de la memoria CS-US a corto y a largo término. Contrariamente, un número menor de re-exposiciones de 5 min, o un número igual de re-exposiciones pero de 3 min, son insuficientes para inducir la extinción de la memoria. Una pregunta interesante que aún no fue evaluada es si este protocolo experimental es capaz de inducir además la labilización y reconsolidación de la memoria CS-US. De acuerdo a lo discutido, y al ITI utilizado en este nuevo paradigma (1 min), cabría esperar que, si en el cangrejo estos parámetros rondan los mismos valores que en los paradigmas discutidos de roedores, la memoria CS-US permanezca consolidada.

En este trabajo hemos revelado nuevas características paramétricas que determinan la inducción de la reconsolidación y la extinción en el cangrejo *Chasmagnathus*, la cinética con la que estos procesos ocurren, y un hipotético mecanismo que los vincula, que tiene lugar tras el fin del CS. Encontramos que (a) durante toda la presentación del CS la memoria original permanece intacta y consolidada, mostrando que ni reconsolidación ni extinción son inducidas hasta la terminación del CS, independientemente de su duración, (b) la presentación de un único refuerzo (US) durante la exposición al CS tiene la capacidad de prevenir la inducción tanto de la extinción como de la reconsolidación, (c) la extinción de la memoria

ocurre pocos segundos después del fin del CS, y (d) reconsolidación y extinción son inducidas de forma mutuamente excluyente tras un único CS, pero ambos procesos pueden dispararse por sendos CSs y desarrollarse simultáneamente. Hemos analizado estos resultados relacionándolos con distintos trabajos en la literatura, discutimos los puntos donde surgen discrepancias, y como resultado, presentamos un modelo hipotético que integra estos hallazgos, reflejando la dinámica e interrelación entre los procesos de reconsolidación y extinción de la memoria.

REFERENCIAS

- Abel T, Kandel E (1998) Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res Brain Res Rev* 26:360-378.
- Abel T, Martin KC, Bartsch D, Kandel ER (1998) Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science* 279:338-341.
- Agranoff BW, Davis RE, Brink JJ (1965) Memory fixation in the goldfish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54:788-793.
- Akirav I, Maroun M (2006) Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb Cortex* 16:1759-1765.
- Alberini CM (1999) Genes to remember. *J Exp Biol* 202:2887-2891.
- Alberini CM (2005) Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28:51-56.
- Bahar A, Dorfman N, Dudai Y (2004) Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. *Eur J Neurosci* 19:1115-1118.
- Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER (1996) Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13445-13452.
- Baker JD, Azorlosa JL (1996) The NMDA antagonist MK-801 blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning. *Behav Neurosci* 110:618-620.

- Berman DE, Dudai Y (2001) Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* 291:2417-2419.
- Bernabeu R, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (1997) Involvement of hippocampal AMPA glutamate receptor changes and the cAMP/protein kinase A/CREB-P signalling pathway in memory consolidation of an avoidance task in rats. *Braz J Med Biol Res* 30:961-965.
- 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* 63:109-118.
- Bliss TV, Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Boccia M, Freudenthal R, Blake M, de la Fuente V, Acosta G, Baratti C, Romano A (2007) Activation of hippocampal nuclear factor-kappa B by retrieval is required for memory reconsolidation. *J Neurosci* 27:13436-13445.
- Boccia MM, Acosta GB, Blake MG, Baratti CM (2004) Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice: effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neuroscience* 124:735-741.
- Bouton ME (1988) Context and ambiguity in the extinction of emotional learning: implications for exposure therapy. *Behav Res Ther* 26:137-149.

- Bouton ME (1993) Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull* 114:80-99.
- Bouton ME (2002) Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biol Psychiatry* 52:976-986.
- Brooks DC, Bouton ME (1994) A retrieval cue for extinction attenuates response recovery (renewal) caused by return to the conditioning context. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 20:366-379.
- Bucherelli C, Tassoni G (1992) Engram activation reinstates the susceptibility of consolidated memory traces to retrograde amnesia by functional blockade of parabrachial nuclei. *Behav Brain Res* 51:61-65.
- Burgess MF, Derby CD (1997) Two novel types of L-glutamate receptors with affinities for NMDA and L-cysteine in the olfactory organ of the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*. *Brain Res* 771:292-304.
- Cahill L, McGaugh JL (1996) Modulation of memory storage. *Curr Opin Neurobiol* 6:237-242.
- Cain CK, Blouin AM, Barad M (2002) L-type voltage-gated calcium channels are required for extinction, but not for acquisition or expression, of conditional fear in mice. *J Neurosci* 22:9113-9121.
- Cain CK, Blouin AM, Barad M (2003) Temporally massed CS presentations generate more fear extinction than spaced presentations. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 29:323-333.
- Cain CK, Blouin AM, Barad M (2004) Adrenergic transmission facilitates extinction of conditional fear in mice. *Learn Mem* 11:179-187.

- Cain CK, Godsil BP, Jami S, Barad M (2005) The L-type calcium channel blocker nifedipine impairs extinction, but not reduced contingency effects, in mice. *Learn Mem* 12:277-284.
- Colley PA, Sheu FS, Routtenberg A (1990) Inhibition of protein kinase C blocks two components of LTP persistence, leaving initial potentiation intact. *J Neurosci* 10:3353-3360.
- Cox J, Westbrook RF (1994) The NMDA receptor antagonist MK-801 blocks acquisition and extinction of conditioned hypoalgesic responses in the rat. *Q J Exp Psychol B* 47:187-210.
- Child FM, Epstein HT, Kuzirian AM, Alkon DL (2003) Memory reconsolidation in Hermissenda. *Biol Bull* 205:218-219.
- Dawson RG, McGaugh JL (1969) Electroconvulsive shock effects on a reactivated memory trace: further examination. *Science* 166:525-527.
- Debiec J, LeDoux JE, Nader K (2002) Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36:527-538.
- Debiec J, Doyere V, Nader K, Ledoux JE (2006) Directly reactivated, but not indirectly reactivated, memories undergo reconsolidation in the amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3428-3433.
- Delorenzi A, Pedreira ME, Romano A, Pirola CJ, Nahmod VE, Maldonado H (1995) Acute administration of angiotensin II improves long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurosci Lett* 196:193-196.
- Delorenzi A, Pedreira ME, Romano A, Garcia SI, Pirola CJ, Nahmod VE, Maldonado H (1996) Angiotensin II enhances long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res Bull* 41:211-220.

- Delorenzi A, Dimant B, Frenkel L, Nahmod VE, Nassel DR, Maldonado H (2000) High environmental salinity induces memory enhancement and increases levels of brain angiotensin-like peptides in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *J Exp Biol* 203:3369-3379.
- Dudai Y (1996) Consolidation: fragility on the road to the engram. *Neuron* 17:367-370.
- Dudai Y (2002a) Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 12:211-216.
- Dudai Y (2002b) *Memory from A to Z. Keywords, concepts, and beyond.* Oxford, UK.: Oxford UP.
- Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55:51-86.
- Duncan CP (1949) The retroactive effect of electroshock on learning. *J Comp Physiol Psychol* 42:32-44.
- Duvarci S, Nader K (2004) Characterization of fear memory reconsolidation. *J Neurosci* 24:9269-9275.
- Duvarci S, Mamou CB, Nader K (2006) Extinction is not a sufficient condition to prevent fear memories from undergoing reconsolidation in the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci* 24:249-260.
- Eisenberg M, Kobilov T, Berman DE, Dudai Y (2003) Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science* 301:1102-1104.

- Eisenberg M, Dudai Y (2004) Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: old fears don't die. *Eur J Neurosci* 20:3397-3403.
- Emptage NJ, Carew TJ (1993) Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in *Aplysia* neurons. *Science* 262:253-256.
- Falls WA, Miserendino MJ, Davis M (1992) Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neurosci* 12:854-863.
- Feinstein N, Parnas D, Parnas H, Dudel J, Parnas I (1998) Functional and immunocytochemical identification of glutamate autoreceptors of an NMDA type in crayfish neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 80:2893-2899.
- Feld M, Dimant B, Delorenzi A, Coso O, Romano A (2005) Phosphorylation of extra-nuclear ERK/MAPK is required for long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Behav Brain Res* 158:251-261.
- Forcato C, Argibay PF, Pedreira ME, Maldonado H (2009) Human reconsolidation does not always occur when a memory is retrieved: the relevance of the reminder structure. *Neurobiol Learn Mem* 91:50-57.
- Forcato C, Rodriguez ML, Pedreira ME, Maldonado H (2010) Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information. *Neurobiol Learn Mem* 93:77-84.
- 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* 22:1757-1766.
- 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* 242:143-146.
- Freudenthal R, Romano A (2000) Participation of Rel/NF-kappaB transcription factors in long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res* 855:274-281.
- Freudenthal R, Boccia MM, Acosta GB, Blake MG, Merlo E, Baratti CM, Romano A (2005) NF-kappaB transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur J Neurosci* 21:2845-2852.
- Geller A, Robustelli F, Barondes SH, Cohen HD, Jarvik ME (1969) Impaired performance by post-trial injections of cycloheximide in a passive avoidance task. *Psychopharmacologia* 14:371-376.
- Gibbs ME, Ng KT (1984) Dual action of cycloheximide on memory formation in day-old chicks. *Behav Brain Res* 12:21-27.
- Haselgrove M, Pearce JM (2003) Facilitation of extinction by an increase or a decrease in trial duration. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 29:153-166.
- Hebb DO (1949) *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. New York: Wiley.
- Hepp Y, Pérez-Cuesta LM, Maldonado H, Pedreira ME (2010) Extinction memory in the crab *Chasmagnathus*: recovery protocols and effects of multi-trial extinction training. *Anim Cogn* 13:391-403.

- Hermitte G, Pedreira ME, 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.
- Hoeger R, Florey E (1989) Catecholamine degradation in the hemolymph of the Chinese crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp Biochem Physiol* 92:323-327.
- Howell DC (1987) *Statistical methods for psychology*. Boston: Duxbury.
- Huang YY, Kandel ER (1995) D1/D5 receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2446-2450.
- Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH (1998) Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393:635-636.
- Judge ME, Quartermain D (1982) Characteristics of retrograde amnesia following reactivation of memory in mice. *Physiol Behav* 28:585-590.
- Kelly A, Laroche S, Davis S (2003) Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* 23:5354-5360.
- Kida S, Josselyn SA, Pena de Ortiz S, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ (2002) CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5:348-355.

- Lebron K, Milad MR, Quirk GJ (2004) Delayed recall of fear extinction in rats with lesions of ventral medial prefrontal cortex. *Learn Mem* 11:544-548.
- Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL (2004) Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839-843.
- Lee JL, Milton AL, Everitt BJ (2006) Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci* 26:10051-10056.
- Lee JL (2008) Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci* 11:1264-1266.
- Lee JL (2009) Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci* 32:413-420.
- Lee SH, Choi JH, Lee N, Lee HR, Kim JI, Yu NK, Choi SL, Kim H, Kaang BK (2008) Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science* 319:1253-1256.
- Lewis DJ, Misanin JR, Miller RR (1968) Recovery of memory following amnesia. *Nature* 220:704-705.
- Lewis DJ, Bregman NJ, Mahan JJ, Jr. (1972) Cue-dependent amnesia in rats. *J Comp Physiol Psychol* 81:243-247.
- Lewis DJ, Bregman NJ (1973) Source of cues for cue-dependent amnesia in rats. *J Comp Physiol Psychol* 85:421-426.
- Lewis DJ (1979) Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol Bull* 86:1054-1083.

- Lin CH, Yeh SH, Lu KT, Leu TH, Chang WC, Gean PW (2001) A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron* 31:841-851.
- Lin CH, Lee CC, Gean PW (2003a) Involvement of a calcineurin cascade in amygdala depotentiation and quenching of fear memory. *Mol Pharmacol* 63:44-52.
- Lin CH, Yeh SH, Leu TH, Chang WC, Wang ST, Gean PW (2003b) Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *J Neurosci* 23:1574-1579.
- Lin CH, Yeh SH, Lu HY, Gean PW (2003c) The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *J Neurosci* 23:8310-8317.
- Liu JL, Li M, Dang XR, Wang ZH, Rao ZR, Wu SX, Li YQ, Wang W (2009) A NMDA receptor antagonist, MK-801 impairs consolidating extinction of auditory conditioned fear responses in a Pavlovian model. *PLoS One* 4:e7548.
- Locatelli F, LaFourcade C, Maldonado H, Romano A (2001) Characterisation of cAMP-dependent protein kinase isoforms in the brain of the crab *Chasmagnathus*. *J Comp Physiol B* 171:33-40.
- 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* 77:234-249.

- Lozada M, Romano A, Maldonado H (1990) Long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiol Behav* 47:35-41.
- Lu KT, Walker DL, Davis M (2001) Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *J Neurosci* 21:RC162.
- Mactutus CF, Riccio DC, Ferek JM (1979) Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science* 204:1319-1320.
- Maldonado H (2002) Crustacean as model to investigate memory illustrated by extensive behavioral and physiological studies in *Chasmagnathus*. In: *The crustacean nervous system*. (Wiese K, ed), pp 314–327. Berlin: Springer.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285:1870-1874.
- Mamiya N, Fukushima H, Suzuki A, Matsuyama Z, Homma S, Frankland PW, Kida S (2009) Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci* 29:402-413.
- Martin SJ, Morris RG (2002) New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12:609-636.
- McClelland JL (1985) Distributed models of cognitive processes. Applications to learning and memory. *Ann N Y Acad Sci* 444:1-9.
- McGaugh JL (1966) Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153:1351-1358.

- McGaugh JL, Alpern HP (1966) Effects of Electroshock on Memory: Amnesia without Convulsions. *Science* 152:665-666.
- McGaugh JL (2000) Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-251.
- McSweeney FK, Swindell S (2002) Common processes may contribute to extinction and habituation. *J Gen Psychol* 129:364-400.
- Menzel R (2001) Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem* 8:53-62.
- Merlo E, Freudenthal R, Romano A (2002) The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience* 112:161-172.
- 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* 12:23-29.
- Merlo E, Romano A (2008) Memory extinction entails the inhibition of the transcription factor NF-kappaB. *PLoS One* 3:e3687.
- Miller RR, Ott CA, Berk AM, Springer AD (1974) Appetitive memory restoration after electro-convulsive shock in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 87:717-723.
- Miller RR, Matzel LD (2000) Memory involves far more than 'consolidation'. *Nat Rev Neurosci* 1:214-216.
- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ (1968) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160:554-555.

- Monfils MH, Cowansage KK, Klann E, LeDoux JE (2009) Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science* 324:951-955.
- Morris RG, Inglis J, Ainge JA, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y, Kelly PA (2006) Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* 50:479-489.
- Müller GE, Pilzecker A (1900) Experimentelle Beiträge zur Lehre von Gedächtnis. *Z Psychol* 1:1-300.
- Müller U (2000) Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron* 27:159-168.
- Myers KM, Davis M (2002) Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36:567-584.
- Myers KM, Ressler KJ, Davis M (2006) Different mechanisms of fear extinction dependent on length of time since fear acquisition. *Learn Mem* 13:216-223.
- Nadel L, Land C (2000) Memory traces revisited. *Nat Rev Neurosci* 1:209-212.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000a) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726.
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE (2000b) The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci* 1:216-219.
- Nader K (2003) Memory traces unbound. *Trends Neurosci* 26:65-72.

- Parnas I, Dudel J, Parnas H, Ravin R (1996) Glutamate depresses release by activating non-conventional glutamate receptors at crayfish nerve terminals. *Eur J Neurosci* 8:116-126.
- Pavlov IP (1927) *Conditioned Reflexes*. London: Oxford University Press.
- Pedreira ME, Dimant B, Tomsic D, Quesada-Allue LA, Maldonado H (1995) Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav* 52:385-395.
- Pedreira ME, 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* 54:611-617.
- Pedreira ME, Pérez-Cuesta LM, 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* 22:8305-8311.
- Pedreira ME, Maldonado H (2003) Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38:863-869.
- Pfeiffer-Linn C, Glantz RM (1991) An arthropod NMDA receptor. *Synapse* 9:35-42.
- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274-285.
- Przybylski J, Sara SJ (1997) Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84:241-246.

- Przybylski J, Roulet P, Sara SJ (1999) Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* 19:6623-6628.
- Quartermain D, McEwen BS, Azmitia EC, Jr. (1972) Recovery of memory following amnesia in the rat and mouse. *J Comp Physiol Psychol* 79:360-370.
- Rescorla RA, Wagner AR (1972) A theory of Pavlovian conditioning: variations in the effectiveness of reinforcement and non-reinforcement. In: *Classical conditioning II: current research and theory* (Black A, Prokasy WF, eds), pp 64-99. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Rescorla RA (2001) Experimental extinction. In: *Handbook of contemporary learning theories*. (Mowrer RR, Klein S, eds), pp 119-154. Mahwah, NJ: Erlbaum.
- Richardson R, Riccio DC, Mowrey H (1982) Retrograde amnesia for previously acquired Pavlovian conditioning: UCS exposure as a reactivation treatment. *Physiol Psychol* 10:384-390.
- Romano A, Delorenzi A, Pedreira ME, 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* 75:119-125.
- Romano A, Locatelli F, Delorenzi A, Pedreira ME, Maldonado H (1996b) Effects of activation and inhibition of cAMP-dependent protein kinase on long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res* 735:131-140.
- Rosenthal R, Rosnow RL (1985) *Contrast analysis focused comparisons in the analysis of variance*. Cambridge, UK.: Cambridge UP.

- Rossato JI, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2006) Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem* 13:431-440.
- Roullet P, Sara S (1998) Consolidation of memory after its reactivation: involvement of beta noradrenergic receptors in the late phase. *Neural Plast* 6:63-68.
- Sangha S, Scheibenstock A, Lukowiak K (2003) Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1. *J Neurosci* 23:8034-8040.
- Santini E, Muller RU, Quirk GJ (2001) Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J Neurosci* 21:9009-9017.
- Sara SJ, Roullet P, Przybylski J (1999) Consolidation of memory for odor-reward association: beta-adrenergic receptor involvement in the late phase. *Learn Mem* 6:88-96.
- Sara SJ (2000a) Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7:73-84.
- Sara SJ (2000b) Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nat Rev Neurosci* 1:212-213.
- Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, LeDoux JE (1999) Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn Mem* 6:97-110.

- Schiller D, Monfils MH, Raio CM, Johnson DC, Ledoux JE, Phelps EA (2010) Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature* 463:49-53.
- Schramm M, Dudel J (1997) Metabotropic glutamate autoreceptors on nerve terminals of crayfish muscle depress or facilitate release. *Neurosci Lett* 234:31-34.
- Shors TJ, Matzel LD (1997) Long-term potentiation: what's learning got to do with it? *Behav Brain Sci* 20:597-614; discussion 614-555.
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998) CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127-148.
- Sotres-Bayon F, Bush DE, LeDoux JE (2007) Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* 32:1929-1940.
- Sotres-Bayon F, Diaz-Mataix L, Bush DE, LeDoux JE (2009) Dissociable roles for the ventromedial prefrontal cortex and amygdala in fear extinction: NR2B contribution. *Cereb Cortex* 19:474-482.
- Squire LR, Slater PC, Chace PM (1976) Reactivation of recent or remote memory before electroconvulsive therapy does not produce retrograde amnesia. *Behav Biol* 18:335-343.
- Squire LR, Alvarez P (1995) Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5:169-177.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24:4787-4795.

- Sweatt JD (1999) Toward a molecular explanation for long-term potentiation. *Learn Mem* 6:399-416.
- Szapiro G, Vianna MR, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I (2003) The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus* 13:53-58.
- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM (2001) The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 4:813-818.
- 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.
- Tomsic D, Beron de Astrada M, Sztarker J (2003) Identification of individual neurons reflecting short- and long-term visual memory in an arthropod. *J Neurosci* 23:8539-8546.
- Torrás-García M, Lelong J, Tronel S, Sara SJ (2005) Reconsolidation after remembering an odor-reward association requires NMDA receptors. *Learn Mem* 12:18-22.
- Troncoso J, Maldonado H (2002) Two related forms of memory in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by NMDA receptor antagonists. *Pharmacol Biochem Behav* 72:251-265.
- Tronel S, Sara SJ (2002) Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learn Mem* 9:105-111.
- Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M (1994) Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79:35-47.

Tully T (1998) Toward a molecular biology of memory: the light's coming on! *Nat Neurosci* 1:543-545.

Vianna MR, Szapiro G, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I (2001) Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12251-12254.

Yin JC, Tully T (1996) CREB and the formation of long-term memory. *Curr Opin Neurobiol* 6:264-268.