

Tesis Doctoral

Estudio de la modulación de la expresión a largo plazo de una memoria durante la fase de consolidación

Suárez, Luis Daniel

2015-05-28

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:

Suárez, Luis Daniel. (2015-05-28). Estudio de la modulación de la expresión a largo plazo de una memoria durante la fase de consolidación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Suárez, Luis Daniel. "Estudio de la modulación de la expresión a largo plazo de una memoria durante la fase de consolidación". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-05-28.

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 y Biología Molecular y Celular

**Estudio de la modulación de la expresión a largo plazo
de una memoria durante la fase de consolidación.**

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

Luis Daniel Suárez

Director de tesis: Alejandro Delorenzi

Consejero de Estudios: Arturo G. Romano

Laboratorio de Neurobiología de la Memoria - Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales, Universidad de Buenos Aires - IFIByNE, CONICET.

Buenos Aires, 2015

Fecha de defensa: 28 de mayo de 2015

Estudio de la modulación de la expresión a largo plazo de una memoria durante la fase de consolidación.

Resumen

Experimentos previos en el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria mostraron que memorias que no se expresaban a causas de entrenamientos insuficientes o tratamientos con drogas amnésicas podían ser rescatadas si se las facilitaba durante su reconsolidación. Estos experimentos fueron interpretados, bajo la visión canónica de la teoría de modulación endógena de la consolidación, como casos de facilitación de la reconsolidación de memorias que no fueron completamente consolidadas. Sin embargo, una revisión de los experimentos publicados mostró que los resultados requerían para ser explicados apropiadamente asumir el acceso a la memoria cuya consolidación se consideraba incompleta, así como la generación y subsiguiente evaluación de una predicción; situación que no es compatible con los modelos clásicos de amnesia.

El paradigma de memoria contexto-señal en el cangrejo de ría *Neohelice granulata* es un paradigma de memoria asociativa estudiado desde hace varios años en el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria. La reciente caracterización en este paradigma de la fase de reconsolidación ha permitido desarrollar herramientas para controlar ciertos aspectos de la reactivación de la memoria durante la recuperación, en particular la realización de una predicción.

En esta Tesis se empleó dicho paradigma para caracterizar algunos de los posibles mecanismos que controlan la expresión de memorias reactivadas. Se emplearon aproximaciones comportamentales y farmacológicas, utilizando drogas cuyos blancos de acción son a nivel subcelular (el factor de transcripción NF- κ B) y a nivel de comunicación intercelular (receptores de acetilcolina de tipo muscarínicos), lo que permitió disociar algunos de los mecanismos que afectan diferencialmente la persistencia y la expresión de la memoria. Ante la dificultad de los modelos clásicos de explicar los fenómenos observados, propusimos un nuevo modelo de procesamiento de la información durante el aprendizaje que nos permite interpretar nuestros resultados en el marco de un posible valor funcional. Para fortalecer esta propuesta, exploramos también una serie de condiciones naturalistas que permitirían modular la capacidad de expresarse de una memoria durante la consolidación y durante la recuperación.

Palabras clave: memoria, amnesia, consolidación, reconsolidación, desempeño, estímulos naturalistas

Study on the modulation of long-term expression of memory during consolidation phase.

Abstract

Previous experiments in the Laboratory of Neurobiology of Memory have shown that unexpressed memories after undertraining or treatments with amnesic drugs could be rescued if they were facilitated during their reconsolidation. These experiments were interpreted under the canonic view of the theory of endogenous modulation of memory consolidation as cases of enhancement of reconsolidation after a deficient consolidation. However, our later review of those experiments revealed that, in order to explain the results, it was necessary to assume the access to the memory as well the generation and evaluation of a prediction. This is incompatible with classic models of amnesia.

The context-signal memory paradigm in the estuarine crab *Neohelice granulata* is an associative memory paradigm studied for several years in the Laboratory. The recent characterization in this paradigm of the reconsolidation phase has allowed the development of experimental tools to control some aspects of memory reactivation during retrieval, specially performing a prediction. These tools which did not exist in other paradigms at the beginning of this Thesis, make the context-signal memory paradigm ideal to answer this issue.

This paradigm was used to characterize some of the potential mechanisms that control the expression of reactivated memories. We use behavioral and pharmacological approaches, with drugs that target processes at sub-cellular level (the activation of the transcription factor NF- κ B) and at the level of interneuronal communication (muscarinic receptors of acetylcholine). Therefore, we were able to dissociate some of the mechanisms that differentially affect the persistence and expression of memory. Furthermore, because of the difficulty of classical models to explain the observed phenomena, we proposed a novel model of information processing during learning in order to interpret our results in the frame of a potential functional role. To strengthen this proposal, we studied also some naturalistic conditions that would allow modulating, during consolidation and retrieval, the capability of expression of a memory.

Keywords: memory, amnesia, consolidation, reconsolidation, performance, naturalistic stimuli

*Aucun des sophismes de la folie, - la folie
qu'on enferme, - n'a été oublié par moi: je
pourrais les redire tous, je tiens le système.*

A. Rimbaud, Une saison en enfer

Índice

I. Introducción	1
Introducción	2
Objetivos	20
Paradigma de memoria contexto-señal	26
II. Metodología	30
III. De los mecanismos que determinan la expresión de la memoria	39
Rol de NF- κ B	40
Rol de la señalización muscarínica	51
IV. Estímulos amnésicos naturalistas y expresión de la memoria	63
V. Control de la expresión durante la fase de recuperación	84
VI. Discusión	97
VII. Apéndice	113
VIII. Bibliografía	120

I.

Introducción

Introducción

De las definiciones. Definición de “Memoria”.

En líneas generales, y sin pretender una taxonomía muy rigurosa que abarque todos los casos posibles, diré que existen dos grandes clases de definiciones, a las que llamaré *funcionales* y *morfológicas*. Las definiciones funcionales son aquellas que definen al objeto por su función: “para qué sirve”, mientras que las morfológicas lo definen por su forma o composición: “cómo es”. Las definiciones morfológicas son las más útiles en ciencia, ya que nos permiten medir con precisión si lo que estamos estudiando es nuestro objeto de interés. A la memoria, pues, le podemos asignar distintas definiciones según estas clases, siendo que cada una tiene su ventaja y desventaja como herramienta para el estudio de un ente que, asumimos, existe más allá de nuestra definición. Comenzaré por presentar dos definiciones funcionales: la primera, “Memoria es la capacidad de almacenar recuerdos”, entendiendo por “recuerdo” información aprendida (Dudai 2002). Esta definición tan sencilla, es la primera aproximación de cualquier persona a la memoria. Una segunda definición funcional es la que refiere a la función biológica¹ de la memoria: “Memoria es la capacidad de predecir el futuro, en función de las experiencias pasadas”. Esta definición resalta el valor biológico de la memoria: ajustar nuestras acciones a un ambiente cambiante, pero con regularidades tan caprichosas que no podrían ser codificadas en un programa de desarrollo ontogénico.

De las definiciones presentadas anteriormente, funcionales, podríamos decir que la habilidad de almacenar información obtenida en experiencias pasadas es la que define las expectativas de nuestro futuro y así nuestras decisiones en el presente. Es decir que nuestra personalidad es, en gran medida, nuestra memoria. Y por ello esas definiciones, a veces menospreciadas por ser “poco operativas” son fundamentales. Es la fascinación por estudiar cómo se almacenan los recuerdos y entender cómo la experiencia moldea nuestra personalidad lo que motiva al estudio de la memoria; sin estas definiciones, la ciencia de la memoria no sería otra cosa que un insulso anecdótico. Sin embargo, para dicho estudio requerimos de otras definiciones que delimiten el objeto de estudio en el campo de la práctica empírica, definiciones “morfológicas”. Nuestra definición será: “Memoria” es el cambio y almacenamiento a lo largo del tiempo de una representación interna resultante de una experiencia comportamental, así como la capacidad de reactivar o reconstruir dicha representación². Una “representación interna” es una versión del mundo (ambiente interno y

¹ En Biología decimos que la función biológica de una característica es proveer al ser vivo que la posee de aquella propiedad que produce una presión selectiva positiva sobre la característica o bien una presión negativa sobre la pérdida de la característica. Debido a la escala (organizativa y temporal) de los procesos evolutivos, esta función suele ser inferida por la imaginación del biólogo más que por la evidencia observacional. Es por ello importante para el científico elaborar dichas especulaciones con responsabilidad, tratando de no caer en explicaciones adaptacionistas (Gould y Lewontin 1979) o teleológicas.

² Esta definición es una variante de la de Dudai (1992). En mi definición, intencionalmente, no distingo los procesos de “aprendizaje” –la generación de nuevas representaciones o el cambio de representaciones

externo al organismo) codificada en lenguaje neuronal y que potencialmente puede guiar el comportamiento (Dudai 1992, 2002). Esta definición tiene una serie de ventajas. Por un lado, permite inferir los aspectos funcionales³: la memoria consiste en cambiar representaciones internas, por lo que la memoria consiste en cambiar “la reacción al mundo o la acción en este” (Dudai 1992). Por otro lado, delimita el objeto de estudio: tiene un sustrato neuronal, pero sólo aquellas alteraciones neuronales que cambien una representación interna serán consideradas memoria⁴. Muchos procesos biológicos, resultantes del desarrollo, la enfermedad, estrés y otras situaciones pueden producir fenómenos de plasticidad neuronal que cambien representaciones internas, sin que por ello las consideremos memoria puesto que no responden a experiencias comportamentales. Sin embargo, las experiencias comportamentales ocurren durante estos procesos, son causadas por ellos y a veces son parte de ellos; como por ejemplo en el caso de la formación del sistema de lenguaje donde es tenue la delimitación entre experiencia y desarrollo.

De las fases de la memoria.

A partir de nuestra definición distinguiremos al menos tres fases en el proceso de memoria: adquisición, persistencia y recuperación.

Adquisición es el proceso por el cual se generan las nuevas representaciones internas persistentes a partir de las experiencias, que pueden ser producidas tanto por estímulos externos como internos. La adquisición implica un proceso de codificación, en el cual los estímulos producen cambios en propiedades neuronales (actividad eléctrica, conexiones sinápticas, cambios conformacionales en proteínas, etc.) y son transformados en representaciones internas en un código neuronal que potencialmente –dependiendo de el contexto externo e interno en cada momento– puede guiar el comportamiento del animal.

La capacidad de ciertas representaciones internas de persistir en el tiempo es la que nos lleva a considerarlas memorias, y distinguirlas así de otras clases de representaciones internas generadas por estímulos comportamentales, como ser los perceptos o las respuestas. La persistencia puede estar determinada por procesos activos, como procesos autocatalíticos o de *feedback* positivo (ejemplos serían la actividad eléctrica recurrente o la autofosforilación de CaMKII), cambios en la eficiencia sináptica, o remodelación de circuitos; pasivos (una vez

previas–, de “memoria” –el almacenamiento a lo largo del tiempo de las mismas– y de “recuperación” –el uso de la memoria en operaciones neuronales y comportamentales–.

³ Puesto que las definiciones funcionales surgen naturalmente de nuestra interacción con los objetos, son las que primero asignamos a ellos –y las que nos motivan a su estudio–. Esta relación inevitable entre el objeto definido y quien lo define (el hombre) nos lleva a una situación típica en ciencias de definir morfológicamente a un objeto X como “todo objeto que se vea como se ven todos los objetos definidos funcionalmente X” (a modo de ejemplo: “‘estrés’ es toda circunstancia de la vida de un animal que produce en el mismo un aumento de glucocorticoides en sangre”).

⁴ Si bien la idea de que el sustrato de la memoria es los cambios plásticos en las neuronas tiene más de un siglo (por ej. Ramón y Cajal 1894, p. 79), no es hasta la década del '60 que encontramos el primer trabajo que muestra formalmente una correlación entre ambos fenómenos (Bennet et al. 1964).

terminado un proceso activo inicial, el resultado persiste sin más intermedio que los procesos propios del mantenimiento del cerebro y sus células, independientemente de los procesos específicos de la memoria, como por ejemplo la formación de sinapsis o incorporación de nuevas neuronas en un circuito); o ambos (ver Lisman 2007 para algunos ejemplos de estos procesos en memoria de trabajo y memoria de largo plazo).

La recuperación⁵ es la capacidad de reactivar la representación interna de manera de que pueda guiar el comportamiento. Una vez que una experiencia comportamental ha sido codificada, los cambios fisiológicos (tanto a morfológicos como químicos) resultantes que influirán potencialmente el comportamiento se denominan *engrama* o *traza mnésica*. El engrama es la entidad física que persiste. Ante una nueva experiencia comportamental, la actividad neuronal inducida por estímulos (externos o internos) sobre el engrama producirá un comportamiento particular. Este comportamiento no tiene por qué evidenciarse necesariamente en un cambio motor en el individuo; puede consistir en la reelaboración del engrama o en la generación de estados fisiológicos particulares observables por ejemplo como cambios en ciertas características fisiológicas (frecuencia cardíaca, salivación, etc.) o en estados de conciencia que producen la sensación que denominamos “recuerdo”, una representación “vívida” y verosímil, con elementos sensoriales, de la experiencia que fue codificada. La recuperación es un proceso constructivo y reconstructivo. Es constructivo por un lado porque la representación interna que guía el comportamiento durante el acto de recuperación es el resultado de la interacción entre el engrama y los estímulos que inducen la reactivación del mismo; de manera que un mismo engrama puede dar lugar a infinidad de representaciones internas posibles (Loftus y Palmer 1974, Tulving 1983). Por otro lado, es un proceso reconstructivo puesto que la recuperación implica la generación de una representación interna y por lo tanto consiste en un estímulo comportamental capaz de re-codificarse en un engrama diferente (Loftus y Palmer 1974).

En general, en la literatura se trata estas fases como procesos bien diferenciados, reservándose el término “memoria” para la fase de persistencia. Es así que muchas veces se habla de “aprendizaje y memoria”, como dos procesos contiguos, pero diferentes, que llevan a la formación de representaciones internas. En general también, y especialmente en la literatura de “aprendizaje y memoria”, la recuperación es considerada un proceso pasivo, despojado de sus características constructivas y reconstructivas, convirtiéndose así en una herramienta experimental para evaluar el resultado de los procesos de aprendizaje y memoria y de los tratamientos efectuados sobre estos⁶. Sin embargo, esta visión demasiado simplificada no se corresponde con el fenómeno de memoria. Todo estímulo que genere aprendizaje, necesariamente involucrará la recuperación de representaciones internas preexistentes, que a su vez son estímulos internos que participan del proceso de adquisición, así como también

⁵ “retrieval” (T. del A.)

⁶ No es inusual, por ejemplo, evaluar la memoria de un mismo sujeto experimental reiteradas veces para conocer la evolución temporal del efecto de un tratamiento dado o para tener una línea de base antes de efectuar dicho tratamiento. Para un ejemplo de las consecuencias que puede tener esta forma tan simplificada de pensar la recuperación, compárese los trabajos de Lewis et al. (1968) y de Quartermain et al. (1970).

modulan los mecanismos perceptuales involucrados. Los mecanismos propios de la persistencia determinan el estado de estructuras cerebrales involucradas en la recuperación, de modo que esta puede ocurrir de distintas maneras según el estado de la memoria en ese momento (Kohlenberg y Trabasso 1968). A la vez que nuevos aprendizajes pueden actuar sobre los procesos de persistencia (Müller y Pilzecker 1900, Blake et al. 2011) y recuperación (Izquierdo y Chaves 1988). La recuperación puede modificar la persistencia de una memoria (Loftus y Palmer 1974, Sara 2000, Rasch y Born 2007), y a su vez genera estímulos internos capaces de inducir aprendizaje.

Las tres fases de la memoria que acabamos de referir surgen de la definición de memoria y por lo tanto son necesariamente verdaderas⁷. El estudio de la memoria, en la medida que aportó descripciones detalladas del proceso y de sus patologías, así como de los efectos de tratamientos de laboratorio y terapéuticos, ha llevado a la generación de hipótesis sobre la existencia de otras fases de memoria, descripciones teóricas analíticas de los procesos que subyacen al fenómeno de memoria.

Uno de los trabajos más influyentes en el estudio de las fases de la memoria fue el trabajo de Müller y Pilzecker publicado en 1900. En este estudio se describe el efecto del aprendizaje de una tarea sobre la memoria de otra tarea aprendida previamente. En estos experimentos, la capacidad de evocar una lista de palabras se veía disminuida si entre el aprendizaje de dicha lista y la evaluación de la memoria se interponía otra lista de palabras o una serie de fotografías de paisajes. Más aún, la lista interferente sólo era efectiva en producir una deficiencia en la evocación sólo si se la presentaba en un tiempo acotado luego del aprendizaje de la primera lista. Este fenómeno, la interferencia retrógrada (o amnesia retrógrada) fue interpretado originalmente bajo el modelo de perseverancia de la información. Este modelo propone que la información aprendida persiste en la actividad recurrente de algunos circuitos neuronales ("persevera") y que esta misma actividad recurrente induce la fijación ("consolidación") de la información para su persistencia a largo plazo a través de cambios estructurales en dichos circuitos. Esta interpretación fue reemplazada en la psicología experimental por modelos que proponen la competencia por espacio representacional entre memorias adquiridas en tiempos cercanos (Coons y Miller 1960, Hudspeth y Gerbrandt 1965, Schneider y Sherman 1968, Lewis 1979). Sin embargo, los estudios más "biológicos" del aprendizaje mantuvieron la idea de la perseverancia de la información, que llevaron a que en la década del '50 se propusiera la teoría de traza dual (Hebb 1949, Duncan 1949, McGaugh 1966): un aprendizaje generaría una "memoria de corto plazo", sostenida en la actividad reverberante en determinados circuitos, y esta actividad reverberante induciría cambios físicos en dichos circuitos, formando así una memoria más duradera, de "largo plazo" (Hebb 1949, Glickman 1961, Breen y McGaugh 1961). Entre los tratamientos utilizados para "lesionar" la traza perseverante e impedir su fijación se encuentran el electroshock convulsivo (Leonard y Zavala 1964, Maldonado 1968, Squire et al. 1975), enfriamiento (Lomber et al. 1996), hipoxia

⁷ Por ejemplo, si encontrásemos un proceso que implique la generación de representaciones internas que pueden guiar el comportamiento pero que no persisten, no cambiaría nuestro concepto de memoria, sino que definiríamos este proceso particular como otra cosa diferente a la memoria (en este caso, percepción).

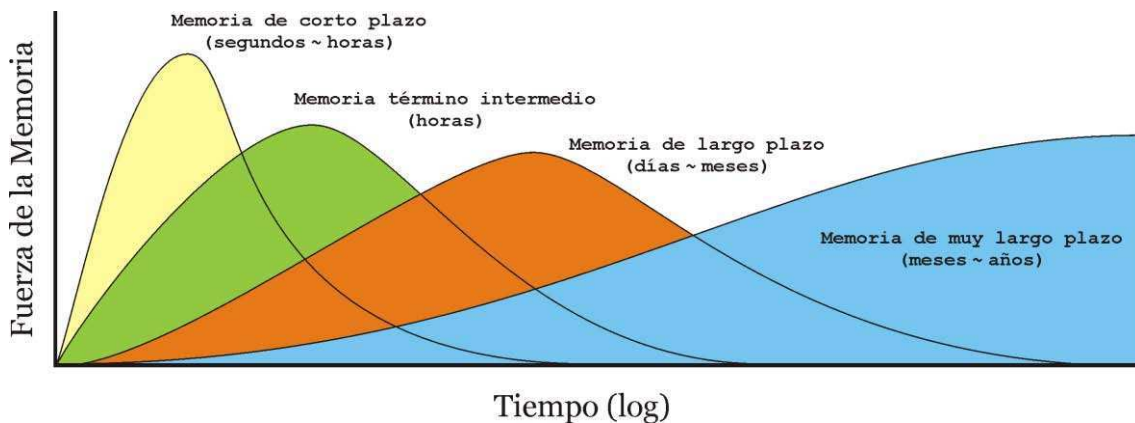
(Car y Wisniewska, 2006) e inhibidores de síntesis proteica (Barondes y Cohen 1968, Pedreira et al. 1996, Collatz et al. 2006), aunque entre los más relevantes se cuentan las lesiones no controladas por el experimentador (Scoville y Milner 1957, Levy et al. 2004).

En muchos casos se ha comprobado que estos procedimientos son eficaces para causar una deficiencia en la memoria sólo si son administrados en una cierta ventana temporal en torno a la adquisición; y la gravedad de la deficiencia, por lo general, decae de manera gradual cuanto más se aleja la aplicación del tratamiento amnésico del momento de la adquisición de la memoria que se evalúa, generando así lo que se denomina un gradiente de amnesia retrógrada (Müller y Pilzecker 1900, Duncan 1949, Scoville y Milner 1957, Quartermain et al. 1965, Squire et al. 1975, Squire et al. 1976b). Estos gradientes varían según el tratamiento interferente y los efectos se ven muchas veces recién un tiempo después, pero no inmediatamente después, del mismo (Geller y Jarvik 1968, Hinderliter et al. 1975). Esto, sumado a que muchas de estas ventanas de amnesia retrógrada se producen por interferencias con determinadas estructuras anatómicas del cerebro⁸, apoyó los modelos de trazas secuenciales como el de traza dual (McGaugh 1966, McGaugh 2000). Sin embargo, la observación de diferentes ventanas temporales de amnesia retrógrada en función del agente amnésico utilizado, llevó a extender estos modelos en cada paradigma experimental en función de las distintas ventanas observadas (Sutton et al. 2001, Gibbs 1991, Epstein et al. 2004, Margulies et al. 2005, Bekinschtein et al. 2007).

Las primeras observaciones del gradiente de amnesia retrógrada llevaron al desarrollo del concepto de consolidación de la memoria: la estabilización a lo largo del tiempo de una traza de memoria o, en otras palabras, el proceso –o procesos– que a lo largo del tiempo aumentan la resistencia de una memoria a los diversos tratamientos amnésicos. Por esta cuestión puramente histórica, la consolidación se define en función de tratamientos amnésicos: la ventana temporal en la que un tratamiento puede interferir con la subsecuente expresión de la memoria. Así, en el modelo de traza dual y en sus extensiones, las distintas trazas, que se denominan usualmente en función el tiempo en que se observan (“de largo plazo”, “de corto plazo”, etc.), no se definen por su duración o por características comportamentales (que pueden diferir: Smal et al. 2011, Suárez et al. 2010) sino por los agentes que interfieren retrógradamente con su expresión. Así, por ejemplo, la observación de que memorias que dependen de actividad intacta del hipocampo o de la amígdala para su expresión desde su adquisición hasta meses o años, pero luego se independizan de estas estructuras, ha llevado a la distinción clásica entre consolidación celular y consolidación sistémica. La consolidación celular se define operativamente como la ventana temporal en la cual la formación de una memoria de largo término (que se expresa al menos 24 horas después del entrenamiento) puede ser impedida por la inhibición de la síntesis de proteínas y se refiere a los procesos que ocurren a nivel celular (activación de genes, síntesis de proteínas, fosforilación u otras

⁸ El caso de gradiente de amnesia retrógrada más famoso en la neurociencia posiblemente sea el de HM, quien luego de una ablación bilateral de hipocampo mostró un gradiente de amnesia retrógrada para eventos de los últimos tres años, siendo esta total para el año y medio inmediatamente anterior a la operación; aunque podía recordar algunos eventos muy recientes (Scoville y Milner 1957).

modificaciones post-traduccionales, etc.). Consolidación sistémica se refiere a los procesos mucho más lentos (sin embargo véase Tse et al. 2007 sobre el rol del tiempo en la consolidación sistémica), que pueden durar días, años y hasta toda la vida de un individuo, que involucran a sistemas celulares y posiblemente la interacción entre regiones del cerebro, y que llevan a la formación de engramas que persisten durante tiempos largos, del orden de la vida del individuo: neurogénesis, sinaptogénesis, dependencia de la memoria de diferentes regiones cerebrales, etc. (Anagnostaras et al. 1999, Wiltgen et al. 2004, sin embargo cf. Viskontas et al. 2000 y Martin et al. 2005).



Un modelo “clásico” de consolidación de cuatro trazas de memoria. Una experiencia comportamental en el tiempo 0 inicia la formación de una memoria de corto plazo dependiente en una primera etapa de actividad eléctrica recurrente y cambios plásticos que persisten corto tiempo, por ejemplo dependientes de procesos autocatalíticos o de la expresión en membranas de proteínas sintetizadas previamente a la adquisición de la memoria; luego la memoria dependería de una traza de término intermedio, producida por los cambios plásticos dependientes de la síntesis de proteínas a partir de transcritos sintetizados antes de la adquisición de la memoria; una traza de largo plazo, dependiente de la síntesis de nuevos mensajeros e incluso cambios epigenéticos, permitiría mantener la memoria durante tiempos mayores; finalmente cambios estructurales en otras regiones cerebrales generarían una traza tal vez permanente, independiente de la estructura que sostuvo durante meses incluso la memoria original. Cada traza tiene sus propios mecanismos y sustrato neural, llegando incluso a depender de diferentes estructuras cerebrales. La formación de estas “memorias” puede producirse de manera serial o en paralelo. El eje “fuerza de la memoria” representa la capacidad de un evento recordatorio de activar el engrama y producir la expresión comportamental propia de esa memoria (desempeño).

La idea de que los cambios duraderos en la representación interna del mundo en un animal transcurren por distintas etapas ha despertado interrogantes acerca de si estas etapas ocurren de manera serial o en paralelo, de si las memorias de corto plazo son necesarias para la formación de memorias de largo plazo o si las distintas representaciones se forman de manera independiente. El modelo de procesamiento en paralelo se ve fuertemente apoyado en la interferencia con las memorias de corto plazo sin afectar las de largo plazo (Basso et al. 1982, Kane et al. 1997, Shirahata et al. 2006, Sherff y Carew 2004). Sin embargo este tipo de razonamiento se encuentra con el problema de que sólo puede ser utilizado para objetar los modelos de formación serial de trazas de memoria, pero no puede ser utilizado para refutar la

versión de procesamiento en paralelo: si un determinado agente amnésico interfiere con la memoria en el corto y en el largo plazo, eso sólo indicaría que el agente actuó sobre un mecanismo compartido por las dos memorias, pudiendo ser que procesos en paralelo utilicen un mecanismo común. Por otro lado, puesto que el efecto de interferencia se observa sólo a través de la falta de expresión del comportamiento propio de esa memoria, no se puede descartar que la interferencia haya sido sólo sobre mecanismos necesarios para la expresión de estas memorias pero no para su conversión en memorias de largo plazo. Las memorias de corto plazo permitirían al animal comportarse en función de las experiencias recientes mientras se forman memorias estables en el largo plazo. Pero también permitirían evaluar las experiencias siguientes en función de las recientemente adquiridas (Briggs et al. 2007, Suárez et al. 2010). Diferencias en la expresión del comportamiento a distintos tiempos y su correlato con los desafíos ecológicos a los que se enfrentan los animales apoyan esta propuesta (Menzel y Greggers 1992). Podría argumentarse que la posibilidad de “actualizar” las memorias de largo plazo durante las etapas de memorias de corto plazo indicaría cierto grado de procesamiento serial puesto que, de ser procesos completamente en paralelo, los efectos sobre una memoria activa en un determinado momento no deberían influir sobre la otra. Sin embargo ha de tenerse en cuenta que las memorias de largo plazo, aún cuando no se expresen en el corto, están siendo consolidadas y por lo tanto no se encuentran en un estado inactivo, pudiendo ser sensibles a la acción de moduladores o incluso alimentarse de las representaciones de corto plazo sin que ello implique una continuidad necesaria en los procesos mecanísticos de ambas.

Operativamente la consolidación se define en función de la acción de agentes amnésicos. Sin embargo, teóricamente, se refiere a los procesos de formación y fijación de engramas, y la amnesia resultante por distintos tratamientos es interpretada como resultante de la interferencia con dichos procesos. Por lo tanto, también es posible en principio evidenciar el proceso de consolidación a partir de agentes promnésicos, es decir, agentes que aumentan el desempeño propio de la memoria adquirida (Lashley 1917, Breen y McGaugh 1961, Breda et al. 1969, Davis et al. 1982, Boccia et al. 1998, Rodriguez et al. 1999, para una extensa revisión en la acción facilitadora de sistemas hormonales en mamíferos ver McGaugh 1983 y Cahill y MacGaugh 1996).

La teoría de la consolidación propone que la formación de una memoria implicaría un proceso de fijación o estabilización de dicha memoria, y que éste sucedería una sola vez⁹ y en un tiempo acotado, pasado el cual la memoria sería insensible a tratamientos disruptores (McGaugh 1966, Lewis 1969). Esta hipótesis ha sido desafiada desde sus orígenes. Muchas son las objeciones que se han planteado a esta hipótesis, y muchos y muy prudentes los

⁹ Posiblemente haya tantas teorías de consolidación como teóricos estudiando la consolidación. En 1973, Norman Spear indicó que uno de los problemas con los que tenía que lidiar la teoría de consolidación era “cómo se deben manejar los aspectos dinámicos de la memoria, esto es, con sucesivos ensayos de entrenamiento o sucesivas experiencias relacionadas, ¿debe toda la memoria reconsolidar de nuevo o simplemente la nueva información?” (Spear 1973, T. del A.). Éste, que posiblemente haya sido el primer uso en la literatura del término “reconsolidación”, nos muestra que el supuesto de la ocurrencia de la fijación una única vez no es un supuesto necesario de la teoría de consolidación.

experimentos que se han hecho para refutarla así como para defenderla (Coons y Miller 1960, Madsen y McGaugh 1961, Miller et al. 1969, Gold et al. 1973, Lewis 1979, Sara y Hars 2006). Aquí me centraré en dos de los principales cuerpos de evidencia que se han esgrimido en contra de la hipótesis de consolidación¹⁰. Una de las evidencias que ha desafiado esta hipótesis es el *efecto recordatorio*¹¹. Este efecto consiste en el rescate de la memoria luego de la aplicación de un agente amnésico por medio de la presentación de un recordatorio. Según la hipótesis de consolidación, luego de la interferencia con la fijación de la nueva representación interna no debería existir una memoria que rescatar (Chevalier 1965, McGaugh 1966, Luttges y McGaugh 1967). Típicamente este efecto se logra por la presentación de algún elemento presente durante el aprendizaje, sin llegar a constituir una nueva situación de aprendizaje completa (Lewis et al. 1968, Quartermain et al. 1970, Sara 1973, Sara et al. 1975, Smith y Spear 1979, Radyushkin y Anokhin 1999). El principal argumento en defensa de la hipótesis de consolidación es que muchos de estos efectos recordatorio podrían explicarse por fenómenos de *sumación*¹²: el recordatorio presentado es en sí mismo una experiencia que genera aprendizaje; la memoria generada por este aprendizaje, que por sí sola no generaría un comportamiento observable como el del entrenamiento original, podría sin embargo “sumarse” a una traza residual resultante pese al tratamiento amnésico y producir así el desempeño observado en la evaluación de la memoria, similar al que se produce en un animal no amnésico (Cherkin 1972, Gold et al. 1973, Gold y King 1974).

El segundo tipo de evidencia en contra de la hipótesis de consolidación es la *amnesia dependiente de un recordatorio*¹³. Este efecto consiste en la inducción de amnesia por la aplicación de un tratamiento vinculado necesariamente a la presentación de un recordatorio. La hipótesis de consolidación postula que, una vez completado el proceso de consolidación, la memoria es insensible a agentes disruptores. Sin embargo se ha observado que, una vez terminada la ventana temporal inicial de susceptibilidad a agentes disruptores, la presentación de un recordatorio inicia una nueva ventana de sensibilidad. La primera observación de este fenómeno, por Misanin, Miller y Lewis a finales de la década del '60, consistió en la inducción de un efecto amnésico por la aplicación de un electroshock convulsivo a ratas entrenadas en un condicionamiento de miedo 24 horas después de terminado el entrenamiento. La aplicación de un electroshock convulsivo en ese tiempo no tenía ningún efecto por sí solo, pero si era precedido por un recordatorio (un tono asociado al shock eléctrico) inducía un efecto amnésico indistinguible del que produce el mismo electroshock convulsivo cuando es aplicado inmediatamente después del entrenamiento (Misanin et al. 1968). Las amnesias inducidas luego de la presentación de un recordatorio son específicas de las memorias reactivadas

¹⁰ para una revisión crítica más extensa del concepto de consolidación, incluyendo la interpretación “neurobiológica” del trabajo seminal de Müller y Pilzecker, véase Lewis 1979.

¹¹ “reminder effect” (T. del A.)

¹² “sumation” (T. del A.)

¹³ “cue dependent amnesia” (T. del A.). Se ha optado por traducir “cue” por “recordatorio” en lugar de la traducción más literal, “clave”, puesto que se sobreentiende que la “clave” en cuestión es una clave recordatoria y usualmente en ciencias del comportamiento el término “cue” no se aplica al contexto de entrenamiento que, sin embargo, es un recordatorio efectivo para lograr la cue dependent amnesia como se verá más adelante.

(Howard y Meyer 1971, Kroes et al. 2014). En un trabajo posterior, DeVietti y Kirkpatrick (1976) describieron un gradiente completo de amnesia retrógrada post-recordatorio. La observación de gradientes de amnesia retrógrada, que fue replicada repetidas veces en varios paradigmas experimentales (Schneider y Sherman 1968, Davis y Klinger 1969, DeVietti et al. 1977, Summers et al. 1995, Mactutus et al. 1979, Yamada et al. 1992), así como de gradientes de facilitación retrógrada (Gordon 1977), fue uno de los mayores desafíos de la teoría de la consolidación y culminó con la publicación en 1979 del famoso trabajo de Donald Lewis en el que presenta una teoría alternativa que explica la evidencia respecto de amnesias experimentales no como resultante de la interferencia con el almacenamiento de la información adquirida sino como el producto de la interferencia con los patrones de actividad propios de la recuperación de dicha información. Sin embargo, la comunidad científica resistió el cambio de paradigma¹⁴ propuesto por Lewis y la teoría de la consolidación siguió teniendo un rol dominante, tal como se la enunció originalmente, hasta finales de la década del '90, cuando en una serie de trabajos se replicó el efecto de la amnesia dependiente de recordatorio aplicando antagonistas específicos de receptores de neurotransmisores (Przybylski y Sara 1997, 1999, Roullet y Sara 1998) o bien inhibiendo la síntesis de proteínas en la amígdala¹⁵ (Nader et al. 2000).

Puesto que los tratamientos que producen la amnesia dependiente de recordatorio son en muchos casos similares a los utilizados para interferir con la memoria inmediatamente después de la adquisición, muchos empezaron a describir este proceso como una *reconsolidación* de la memoria reactivada por el recordatorio. La teoría de la reconsolidación (Gordon y Spear 1973, Nader 2003) propone que las memorias transcurren por un proceso de consolidación luego de adquiridas, tal como propone el modelo de consolidación; pero cuando son reactivadas se labilizan, volviendo a un estado similar al que tenían luego de la adquisición, y deben volver a fijarse o reestabilizarse (deben “reconsolidar”) para persistir largo tiempo. Sin embargo, la susceptibilidad de una memoria a la disrupción luego de un recordatorio correlaciona inversamente con la edad de la memoria (Yamada et al. 1992, Milekic y Alberini 2002, Eiseberg y Dudai 2004, Suzuki et al. 2004, Boccia et al. 2006, Frankland et al. 2006,

¹⁴ El modelo de Memoria Activa/Memoria Inactiva de Lewis difiere del de Consolidación no sólo en los mecanismos propuestos para explicar las amnesias experimentales, sino en cuestiones de base que determinan la manera en que se puede (y no se puede) estudiar la memoria. En este sentido, se lo puede considerar un cambio de paradigma en el sentido que da Kuhn al término. La teoría de Reconsolidación, que se desarrollará más adelante, claramente no implica un paradigma diferente al de Consolidación (cf. nota 9).

¹⁵ El uso de inhibidores de síntesis proteica tiene un valor muy sobreestimado en el estudio de la memoria que parte de razonar que dicha interferencia pone en evidencia procesos de plasticidad neuronal que requieren de síntesis de proteínas. La falacia de este razonamiento fue puesta en evidencia por Yadin Dudai (1992): puesto que la síntesis proteica participa del “*housekeeping*” neuronal: la multitud de procesos necesarios para el normal funcionamiento de cualquier célula (las neuronas son células), entonces la única conclusión válida de la observación de que la interferencia con la síntesis proteica inhibe un proceso de memoria, es que las células son necesarias para dicho proceso. La idea actual de que la síntesis proteica participaría de los mecanismos de memoria se basa en la intervención sobre procesos mucho más específicos que la síntesis proteica a nivel de la actividad ribosomal, como el requerimiento de cambios epigenéticos o de la actividad de factores de transcripción específicos (Milekic et al. 2007, Maddox y Schaffé 2011, Jian et al. 2014).

Bustos et al. 2009), lo que recuerda al fenómeno de gradiente de amnesia retrógrada luego de la adquisición, pero considerando ahora a la combinación del recordatorio y el agente disruptor como un único tratamiento amnésico. Esto llevó a la interpretación alternativa de que la ventana de sensibilidad a la amnesia dependiente de un recordatorio podría estar revelando otra fase de la consolidación de la memoria (modelo de la *consolidación persistente*¹⁶, Dudai y Eisenberg 2004, Rodríguez-Ortiz et al. 2005, Alberini 2007).

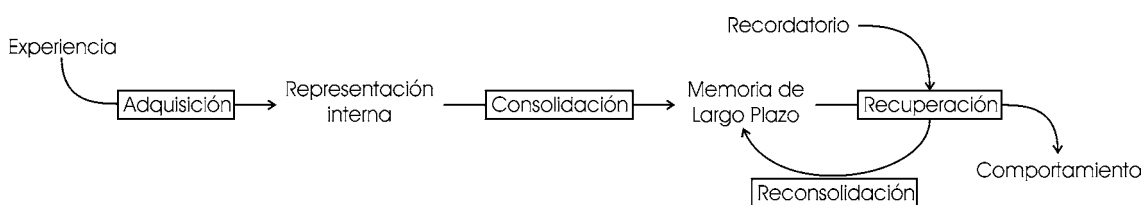
De la reconsolidación.

La presente Tesis se enmarca en la teoría de la Reconsolidación. Esta teoría propone que las memorias son adquiridas en forma de engramas de corta duración, del orden de minutos a horas. Coincidente con la persistencia de este engrama, ocurre un proceso de “fijación” o “estabilización”, denominado consolidación, en el que se construye un engrama de mayor persistencia. Si esta memoria de largo plazo se construye en paralelo a la de corto plazo o si es un proceso serial, en el cual el engrama de corto plazo es transformado en un engrama más persistente, es un tópico de discusión todavía vigente. Una vez finalizada la consolidación, la memoria persiste en un estado “inactivo”, que se evidencia por la resistencia de la memoria a agentes que pueden interferir con los procesos plásticos involucrados en la consolidación. Sin embargo, cuando una memoria es reactivada, puede retornar a un estado de labilidad que se evidencia por la sensibilidad de la memoria a ser interferida, de manera similar a lo que ocurría en el corto plazo, durante la consolidación inicial. La memoria lábil debe re-estabilizarse, es decir que debe transcurrir por una segunda ronda de consolidación, denominada por lo tanto “reconsolidación”. La teoría de la reconsolidación propone por lo tanto que la reactivación, además de poder producir la expresión comportamental de la memoria, puede conducir a dos procesos concatenados: un proceso inicial de labilización, en el cual la memoria reactivada retorna a su estado lábil, y un proceso de reconsolidación o re-estabilización en el que la memoria lábil se consolida otra vez.

La reconsolidación de una memoria, al igual que su consolidación inicial, se evidencia por la interferencia con distintos agentes, ya sean farmacológicos, lesiones o estímulos comportamentales. Por regla general, los agentes que han mostrado ser efectivos disruptores de la consolidación, también han sido efectivos para interrumpir la reconsolidación, en particular los inhibidores de síntesis proteica (Davis y Klinger 1969, Nader et al. 2000, Pedreira et al. 2002, Gainutdinova et al. 2005). Pero en varios trabajos se han encontrado diferencias en la interrupción de ambos procesos: los agentes amnésicos efectivos, las ventanas temporales, dosis e intensidad del tratamiento efectivas, la reversibilidad del efecto amnésico y las estructuras cerebrales involucradas en ambos procesos han mostrado diferir (Judge y Quartermain 1982, Mactutus et al. 1979, Taubenfeld et al. 2001, Anokhin et al. 2002, Child et al. 2003, Bahar et al. 2004, Salinska et al. 2004, von Herten y Giese 2005, Milekic et al. 2007,

¹⁶ “lingering consolidation” (T. del A.)

Stafford y Lattal 2009, Gazarini et al. 2013; para una revisión véase Alberini 2005). Estas diferencias llevaron a proponer que la consolidación y la reconsolidación serían procesos diferentes, y que la reconsolidación no debería ser considerada como un proceso de reconsolidación, es decir una recapitulación del proceso de consolidación inicial (Alberini 2005). Sin embargo, el razonamiento, basado exclusivamente en diferencias “mecánísticas”, incurre en el error de no reconocer que consolidación y reconsolidación difieren necesariamente entre sí tanto en la información sujeta a estos procesos como en el sistema (animal) que los realiza: puesto que la consolidación se produce luego el aprendizaje original y la reconsolidación es producida por un estímulo recordatorio luego de que el animal consolidó la memoria anterior, ni los estímulos ni el animal que aprende son los mismos en ambos procesos (Nader et al. 2005, Riccio et al. 2006, McKenzie y Eichenbaum 2011). El mismo razonamiento es extensible a los mecanismos de labilización¹⁷.



Modelo de memoria según la Teoría de la Reconsolidación. Los cuadros indican fases de la memoria, mientras que los términos libres indican los fenómenos que producen o resultan de estos procesos. La fase de Persistencia de la memoria se corresponde con todo el proceso desde la adquisición de la representación interna original a la recuperación de la misma, incluyendo el bucle de reconsolidación. La Memoria de Largo Plazo también es una representación interna, que puede diferir de la representación adquirida inicialmente tanto en la información contenida como en el sustrato mecánico de la misma y dichas diferencias son dinámicas (difiere también de sí misma en el tiempo) en función de los procesos de consolidación y reconsolidación.

Si bien la amnesia inducida por recordatorio fue mostrada en multitud de sistemas experimentales, también se han reportado casos negativos en los que no se pudo inducir amnesia retrógrada luego de un recordatorio (Dawson y McGaugh 1969, Squire et al. 1976a, Cammarota et al. 2004, Blaiss y Janak 2007; cf. Kroes et al. 2014, Amaral et al. 2007). Estos resultados indican que no todos los recordatorios inducen la labilización de la memoria recuperada y derivaron en preguntas acerca de cuáles son las condiciones para que la reactivación de una memoria produzca su labilización. Gerson y Hendersen (1978), compararon las condiciones para labilizar la memoria luego de entrenamientos de evitación activa y pasiva, variando sistemáticamente los contextos, claves y la presentación o ausencia de un refuerzo del entrenamiento: En estos experimentos el refuerzo (un shock eléctrico en las

¹⁷ La labilización de la memoria, es decir la desestabilización de circuitos preexistentes, es referida normalmente como una predicción de la teoría de Reconsolidación, y su evidencia se considera argumento en contra de la teoría de Consolidación. Sin embargo, ha de notarse que la consolidación de nuevas memorias implica también el remodelado de circuitos preexistentes y por lo tanto la labilización de memorias anteriores no es necesariamente contraria a este modelo (cf. nota 9).

patas del animal) no fue necesario para labilizar la memoria cuando el animal generaba expectativas de su ocurrencia. Sin embargo, cuando el animal no lo predecía (se le presentaba el contexto recordatorio en una situación “segura”), la memoria sólo se reactivó cuando el animal fue shockeado otra vez. Gerson y Hendersen, propusieron a modo de explicación que el recordatorio debía inducir miedo para producir la labilización de la memoria. Sin embargo, a partir de uno de sus controles, descartaron que el estado motivacional del animal fuese una condición necesaria para la labilización, y por lo tanto concluyeron que es el valor informativo del estímulo inductor de miedo (la predicción de la ocurrencia de una situación aversiva) lo que labiliza la memoria y no el estado emocional (miedo) inducido por éste.

Usando el modelo de memoria contexto-señal¹⁸ en el cangrejo *Neohelice granulata*, el grupo de Maldonado propuso que la falta de coincidencia entre la predicción que se produce durante la recuperación de la memoria y lo que efectivamente ocurre induciría la labilización de la memoria (Pedreira et al. 2004). En este modelo, los animales aprenden la asociación entre la arena experimental y un estímulo potencialmente peligroso, de manera que la subsiguiente presentación del contexto funcionaría como predictor de la ocurrencia de este estímulo. A diferencia de lo que ocurría en los experimentos de Gerson y Hendersen, en los experimentos de Pedreira et al. en *Neohelice* se observó que la memoria recuperada sólo era susceptible a disrupción por inhibidores de síntesis proteica o bloqueantes de receptores de glutamato cuando no se presentaba el refuerzo, es decir el estímulo potencialmente peligroso. Sin embargo, cuando el animal era presentado con este estímulo luego del recordatorio, la memoria recuperada era resistente al efecto de los agentes disruptores. Puesto que en este caso el estímulo potencialmente peligroso debería ser mejor inductor de miedo que el contexto de entrenamiento, se concluyó que la labilización de la memoria se producía cuando la predicción (ocurrencia del refuerzo) no se cumplía¹⁹. La hipótesis de que un error de predicción es una de las condiciones paramétricas que inducen la labilidad de la memoria planteó una predicción crítica que fue evaluada poco tiempo después: el proceso de labilización de la memoria no se inicia hasta que el animal es retirado de la arena de entrenamiento, lo que señalaría la terminación del evento reactivador de la memoria y por lo tanto es el momento a partir del cual se puede determinar el error de predicción (Pérez-Cuesta et al. 2007). Diseños experimentales similares a los utilizados en cangrejo permitieron extender esta hipótesis a memorias declarativas en humanos (Forcato et al. 2007, Sevenster et al. 2012, 2013, Rodríguez et al. 2013). Una generalización de esta teoría propone que la reconsolidación ocurriría cuando se incorpora nueva información a la memoria (Morris et al. 2006, Lee 2008).

¹⁸ El paradigma experimental de memoria que se utilizará en esta Tesis, que se desarrollará en detalle más adelante en este capítulo. Por ahora, al lector que no esté familiarizado con el mismo le bastará con saber que es un modelo de memoria asociativa.

¹⁹ Es interesante notar que el único caso en los experimentos de Gerson y Hendersen en el que el contexto de entrenamiento sin refuerzo no produjo reactivación de la memoria, fue luego de un entrenamiento de evitación activa, en el cual el contexto por sí solo era seguro, es decir, no predecía el refuerzo negativo. La presentación del refuerzo negativo en la situación segura (en discordancia, por lo tanto, con las expectativas), así como la presentación de claves predictoras del refuerzo sin la presentación de éste, sí produjeron la labilización de la memoria.

Desde esta teoría más general, una predicción que no se cumple indicaría necesariamente la disponibilidad de nueva información (cf. Rescorla y Wagner 1972).

Un recordatorio no reforzado también puede inducir un proceso de *extinción* de la memoria: la disminución en la amplitud y frecuencia de una respuesta condicionada cuando el estímulo condicionado es presentado sin refuerzo (Myers y Davis 2002). Los procesos de reconsolidación y extinción parecen ser mutuamente excluyentes (sin embargo cf. Stollhoff et al. 2005 y Duvarci et al. 2006), y se ha observado que entre las condiciones de un recordatorio para inducir uno u otro proceso se encuentra el número de presentaciones del recordatorio (Eisenberg et al. 2003; Rossato et al. 2006), la duración de las mismas (Gordon et al. 1979, Pedreira y Maldonado 2003; Power et al. 2006) y la edad de la memoria al momento de presentar el recordatorio (Gordon et al. 1979, Boccia et al. 2006, Baratti et al. 2008). Otras condiciones que determinarían que una memoria se labilice o no ante la presentación de un recordatorio son la edad de dicha memoria (Milekic y Alberini 2002, Eisenberg y Dudai 2004) y la *dominancia* de la traza reactivada: cuando hay más de un aprendizaje asociado a una clave, cada uno produciendo efectos contrarios sobre el desempeño²⁰, la presentación de esta clave produciría la labilización de la traza dominante, es decir aquella que se expresa comportamentalmente (Eisenberg et al. 2003, Rodríguez-Ortiz et al. 2005).

De la función biológica de la reconsolidación. Sistemas moduladores extrínsecos.

La fijación de la información requiere de varios procesos mecánicos, cada uno con una escala de tiempo particular. Mientras que cierta actividad eléctrica ordenada es necesaria en una escala de tiempo del orden de la experiencia que se almacena (Duncan 1949), la síntesis de proteínas es necesaria en una escala de tiempo que excede por mucho la del elemento a recordar (Bekinschtein et al. 2007) y ciertos procesos que involucrarían la interacción de sistemas requieren de tiempos aún mucho mayores, en una escala de tiempo del orden de la vida del individuo que aprende (Scoville y Milner 1957, Squire y Spanis 1984). Si bien ningún animal en su ambiente natural suele recibir un electroshock convulsivo o una inyección de inhibidores de síntesis proteica, estos procesos pueden ser interferidos por otras experiencias comportamentales, ya sea por la información que proveen o por los cambios que pueden inducir en el estado interno o en la atención del animal (Izquierdo 1989). Así otros eventos pueden destruir o modificar la información que se almacena si ocurren de manera contingente con estos procesos, que parecieran estar ocurriendo durante toda la vida del animal. Esta situación podría revelar una limitación de los sistemas de memoria: nunca ocurrió (o no es posible) un mecanismo de memoria que permita, en una escala temporal mucho

²⁰ Esta es una limitación puramente práctica, no teórica: si bien el modelo de dominancia de traza se propone para cualquier situación donde compita más de una traza, operativamente es necesario que cada memoria se exprese en el sentido opuesto para poder determinar empíricamente cuál es la dominante.

menor, almacenar la información de manera persistente o, de existir, podría tener un costo muy alto que no sea compensado por los beneficios de un almacenamiento rápido y fiel de la información (Mery y Kawecki 2005). Sin embargo, el que una memoria reactivada pueda requerir de una repetición de estos procesos sugiere que podría haber algún tipo de valor adaptativo en los procesos de estabilización de la memoria especialmente lentos. Nótese que no es el argumento del requerimiento de una ventana de reconsolidación luego de un recordatorio el que invita a pensar de esta manera, sino el que esta ventana puede llegar a ser necesaria, pero no siempre lo es. Puesto que la recuperación de una memoria requiere algún tipo de actividad de los circuitos que la subyacen, podría suponerse que los estados de labilidad, y la subsecuente reestabilización, ocurren necesariamente cada vez que una memoria se reactiva (Lewis 1979, Sweatt 2007) y reflejan también una limitación de “los mejores mecanismos que ocurrieron”. Sin embargo, una memoria puede activarse sin necesariamente volverse susceptible a interferencias (Squire et al. 1976a). La desestabilización de la memoria reactivada ocurre en condiciones en las que el sistema que aprende genera expectativas de nueva información, situación que se ha manipulado explícitamente en varios sistemas experimentales (Pedreira et al. 2004, Rodríguez-Ortiz et al. 2005, Morris et al. 2006, Amaral et al. 2007, Forcato et al. 2007), y en algunos casos ha mostrado ser condición necesaria para la incorporación de nueva información (Frenkel et al. 2005a, Forcato et al. 2007, 2010, Lee 2008, Rodríguez et al. 2013, Fustiñana 2013). Se ha propuesto entonces que los períodos de labilidad de la memoria podrían tener el valor funcional²¹ de permitir al organismo actualizar la información adquirida. Esta actualización de la información, estaría determinada por la información provista por eventos relacionados con la información adquirida. La forma más simple de determinar que un evento está relacionado con determinada información almacenada, sería por la contingencia o cercanía temporal con los momentos en que dicha información se activa, ya sea cuando se adquiere, cuando se reactiva luego de un recordatorio, o durante el sueño (Rasch y Born 2007). La actualización de la memoria podría ser de dos tipos: incorporación de nueva información (Mowrer y Gordon 1983, Boller y Rovee-Collier 1994, Rossato et al. 2006, Lukowiak et al. 2007, Hupbach et al. 2007, Forcato et al. 2010, sin embargo cf. Tronson et al. 2006 y Suárez et al. 2010) o cambios en la fuerza de la memoria. La fuerza de la memoria²² refiere a la probabilidad de expresión del comportamiento asociado a una memoria, dado un recordatorio de la misma. Esta probabilidad de expresión refleja la certeza y la relevancia de la memoria, es decir, cuán confiable considera el sistema la predicción que se realiza (por ejemplo, la asociatividad en los modelos de aprendizaje de tipo Rescorla-Wagner) y cuán importante es modificar el comportamiento en función de dicha predicción, lo que implicaría inhibir otros comportamientos que podrían resultar más beneficiosos. Si una memoria es activada reiteradas veces, posiblemente la información

²¹ Cf. nota 1.

²² El concepto de fuerza de la memoria es un supuesto crítico para la interpretación de todos los trabajos realizados en el marco de la teoría de Consolidación, incluyendo aquellos que consolidan la teoría de Consolidación (y con ella, la de Reconsolidación). A grandes rasgos, y a riesgo de simplificar un poco – pero no mucho– el problema, podríamos decir que sin fuerza de la memoria no hay consolidación. Para críticas a este concepto, véase Miller y Springer 1974, Lewis 1979, Tulving 1983.

almacenada refiera a elementos que seguirán apareciendo frecuentemente en la vida del organismo y conviene aumentar su fuerza. En este sentido, se ha propuesto que la reconsolidación produce *per se* un fortalecimiento de la traza que se reactivó: cada vez que una memoria se desestabiliza, se reestabilizaría en una versión más reactiva de la misma (Rovee-Collier et al. 1980, Nadel et al. 2007, Inda et al. 2011, Forcato et al. 2011, 2013, Fustiñana 2013, Kroes et al. 2014, Sara 2000). Otra propuesta, que no es mutuamente excluyente con la anterior, es que los períodos lábiles permiten reevaluar la fuerza de una memoria, sin que ello implique necesariamente un aumento de la misma²³. El sentido en el cambio de la fuerza de la memoria dependerá de la relación entre la información activa y el contexto, externo pero también interno, en que ocurre dicha activación.

Las memorias pueden ser modificadas de manera bidireccional, es decir aumentando o disminuyendo su expresión, por tratamientos que son efectivos por un tiempo limitado luego de la adquisición. En muchos casos la modulación de la memoria puede ser producida por tratamientos que no afectan directamente al cerebro (Gold y Van Buskirk 1976, Clark et al. 1995) y además un mismo tratamiento puede afectar diferentes memorias. Esto llevó a postular la existencia de mecanismos extrínsecos de modulación de la memoria: sistemas que no actúan como base neural para el almacenamiento de la información, pero que pueden influenciarla durante un tiempo limitado (Cahill y McGaugh 1996). Estos sistemas permitirían regular el almacenamiento de la información, de manera que esta se produzca en función de la relevancia que tiene la experiencia para el animal. Dado que no somos sistemas de almacenamiento perfectos, capaces de almacenar toda la información, así como de recuperarla toda y organizarla de manera funcional, un sistema que permita decidir qué se guarda y qué no tiene tanta importancia en nuestra vida como los sistemas mismos que se encargan de almacenar la información. Casos de mal funcionamiento de estos sistemas podrían dar lugar a patologías como las fobias o el estrés post-traumático. Un sistema, para ser considerado modulador, debe satisfacer al menos tres propiedades: capacidad de modular bidireccionalmente la memoria, ejercer sus acciones en una ventana temporal acotada e influenciar distintos tipos de memorias. Un sistema modulador, puesto que actuaría determinando qué se almacena y qué no, debería poder tanto facilitar o impedir el almacenamiento de las memorias, dependiendo de las condiciones en que se adquieran. Puesto que es un sistema “extrínseco”, es decir que no es el sistema que almacena la información, la inactivación de un sistema modulador debería impedir el almacenamiento de una memoria sólo si se produce en el momento en que este sistema es requerido para tomar la decisión de si almacenar o no la información. Si la inactivación de un sistema en cualquier

²³ Nótese que no existe una reactivación en la que el animal no reciba información acerca de la relevancia de la información recuperada. Por el simple hecho de haber reactivado la memoria, independientemente de que la información reactivada haya sido pertinente o no, al menos la posibilidad de que ocurran estímulos reactivadores de dicha información se muestra significativa. Sería en principio posible evocar una memoria de manera “espontánea”, por lo menos en el laboratorio, pero en este caso se podría estar dando al animal información específica acerca de la poca pertinencia de la memoria reactivada. En este sentido, ambas hipótesis podrían no ser contrastables por no poder realizarse un experimento donde la reactivación de la memoria ocurra sin que exista información acerca de su relevancia.

momento produce amnesia, entonces lo más probable es que ese sistema sea el lugar donde se almacena físicamente la información²⁴ (por ej. Shema et al. 2007). Finalmente, los sistemas moduladores son “ciegos” a la información que se está almacenando; la determinación de la relevancia de lo que sea que se esté almacenando depende de la situación en que se produce el almacenamiento, no del contenido de la memoria. Obviamente, la información que se almacena dependerá de la experiencia y por lo tanto puede correlacionar con la actividad de los sistemas moduladores, también determinada por la experiencia. Así, una experiencia traumática podrá afectar el almacenamiento de la memoria de sí misma, pero también modulará el almacenamiento de memorias de otros eventos, no relacionados pero cercanos en el tiempo²⁵.

Pero, ¿qué sucede cuando una memoria no se expresa como resultado de una interferencia con los mecanismos de memoria o con los sistemas moduladores extrínsecos? Se ha descrito la posibilidad de revertir estas amnesias, es decir de rescatar la memoria que no se expresa, lo que prueba que –al menos en los casos en que se pudo rescatar la memoria– la amnesia no es necesariamente la falta de memoria, sino que puede existir una memoria que no se expresa aún cuando está almacenada. La pregunta fundamental entonces es si en el momento en que la memoria falla en expresarse ante un recordatorio, puede haber sin embargo una reactivación y la elaboración de una predicción (ésta es la “definición funcional” de memoria que se presentó al principio de este capítulo). Esta pregunta ha sido respondida de manera positiva, aprovechando las ventajas de un proceso fundamental en la dinámica de la memoria: la extinción. Cuando un estímulo neutro es asociado a un refuerzo, la presentación del mismo estímulo neutro sin el estímulo reforzador puede llevar a la reducción de la respuesta propia de dicha asociación. Esta reducción en la expresión comportamental de la memoria, que se denomina “extinción”, se debe a la formación de una nueva memoria donde el estímulo neutro es asociado a la no-presencia del refuerzo (Myers y Davis 2002). Para que esto ocurra, es necesario que el animal realice la predicción de la ocurrencia del refuerzo durante el recordatorio, de manera que la no-ocurrencia del mismo sea percibida por el animal como un fenómeno saliente (Ouyang y Thomas 2005). El grupo de David Riccio realizó un

²⁴ Aquí se presenta una visión sumamente simplificada del problema de identificar mecanismos y loci de memoria. Para empezar, no hay por qué suponer un único locus de memoria, ni tampoco que éste sea el mismo en el tiempo. Como se indicó al discutir la definición de memoria y sus fases, la memoria es un proceso dinámico que se puede considerar a su vez dependiente de varios subprocesos y de sus interacciones, por lo que el resultado de la interferencia con “la memoria” al inactivar una región del cerebro no tiene una interpretación tan evidente como la que se plantea aquí. El concepto de sistema modulador servirá como pivote en las discusiones que seguirán en esta Tesis, pero de ninguna manera se tratará de determinar que tal o cual sistema sea un sistema modulador.

²⁵ Obviamente, que un animal entre o no en estados “aprendedores” sin discriminar qué se aprende y qué no, puede tener consecuencias poco adaptativas. Una solución sofisticada encontrada por la evolución, ha sido la interacción de los sistemas de estrés con sistemas atencionales y de *arousal* (Cahill et al. 2003, Roozendaal et al. 2006b), de manera de facilitar el almacenamiento de información no siempre que el animal se estrese, sino en presencia de estímulos “llamativos”. Sin embargo, el principio general de “ceguera a la información” sigue siendo válido: cuando el animal se estresa y, además, está en presencia de estímulos llamativos, se facilita el almacenamiento de cualquier información adquirida en ese momento.

inteligente experimento en el que un grupo de animales fue entrenado en una tarea asociativa y tratado con hipotermia, un típico agente amnésico. Cuando la memoria no podía ser expresada, presentaron a los animales con el estímulo condicionado (ante el cual los animales no respondían a causa de la amnesia) sin el refuerzo, un típico protocolo de extinción. Luego se trató a los animales con un protocolo que permite restablecer la memoria amnésica por hipotermia y se realizó una segunda evaluación de la respuesta al estímulo condicionado. El resultado fue que, mientras que en un grupo control que no fue tratado con el protocolo de extinción se pudo restablecer completamente la memoria interferida por hipotermia, los animales sujetos a la extinción no mostraron el desempeño propio de esa memoria, demostrando así haber generado la memoria asociativa entre el estímulo neutro y la no-ocurrencia del refuerzo, la “memoria de extinción”, aún cuando la predicción del mismo no se observó en la primera evaluación (Morgan y Riccio 1994).

Otra estrategia experimental que permite revelar la posibilidad de reactivar y modificar memorias que no se expresan, es la manipulación de las mismas durante la reconsolidación. Esta situación ha sido demostrada en multitud de experimentos en los que, luego de entrenamientos de baja intensidad, de tratamientos amnésicos o de olvido, se ha reestablecido la posibilidad de expresar comportamentalmente la memoria utilizando tratamientos que implican un recordatorio (Gordon y Spear 1973, Sara 1973, DeVietti y Kirkpatrick 1977, Rovee-Collier et al. 1980, Rodriguez et al. 1993, 1999, Blaiss y Janak 2006, Tronson et al. 2006)²⁶. Sin embargo, siguiendo la tradición experimental de asociar la memoria con la expresión comportamental de la misma, los trabajos citados han sido interpretados en términos de modulación de la “fuerza” o reactividad de la memoria. Estos estudios han puesto el énfasis de sus interpretaciones en los conceptos de “disponibilidad” y “accesibilidad” de la información (Tulving y Pearlstone 1966). Los modelos de deficiencias en el almacenamiento proponen que luego de tratamientos amnésicos o a causa de entrenamientos insuficientes, no se almacena correctamente la información, es decir no está disponible para poder ser expresada en el comportamiento. Los casos de memorias que no se expresan, pero cuya expresión puede ser rescatada sin reentrenar el ítem específico a recordar, prueban que la información se encuentra almacenada, por lo tanto disponible, pero no puede ser utilizada en el comportamiento. Se propuso entonces la existencia de vías de recuperación²⁷, mecanismos que determinan el acceso a ítems específicos del espacio representacional, que pueden formarse deficientemente luego de un entrenamiento débil, ser debilitados por tratamientos amnésicos o por el paso del tiempo, o bien no activarse por la competencia con otra información. La activación de algunas de estas vías durante la recuperación “fallida” de una memoria inaccesible permitiría o bien reelaborarlas para facilitar el acceso a la memoria en el largo plazo, o bien mantenerlas en un estado de mayor excitabilidad que facilitaría su activación en el corto plazo (Lewis 1969, Sara

²⁶ Las citas escogidas refieren a una selección de casos cuyos efectos son atribuibles a fenómenos de reconsolidación o señalización pre-evaluación (“*pre-test cueing*”, T. del A.). He preferido no referirme a los casos de reinstalación y rescate (“*reinstatement*” y “*saving*”, T. del A.) puesto que pueden ser trivialmente explicados por el argumento de sumación que se discute en este capítulo.

²⁷ “*retrieval links*” (T. del A.)

et al. 1975, Lattal y Abel 2004, Riccio et al. 2006). Sin embargo se ha planteado una interpretación alternativa, particularmente difícil de poner a prueba: la memoria “amnésica” podría estar disponible, ser además accesible, pero no expresarse comportamentalmente aún cuando los circuitos que la subyacen se hayan reactivado (Morgan y Riccio 1994, Cahill et al. 2001). La gran dificultad de esta hipótesis es que si la memoria se evalúa a partir de su efecto en el comportamiento, ¿cómo diferenciar aquellos casos en que no se accedió a una memoria, de aquellos en los que se accedió, pero no se produjo el comportamiento correspondiente? La solución en principio, planteada de manera abstracta, es sencilla²⁸: se debe buscar alguna manera de afectar a la memoria diferencialmente cuando esta se activa o no, independientemente de su expresión, de manera que esta afectación se pueda expresar comportamentalmente en alguna otra condición en que la memoria sea accesible y expresable (si no existiera esta condición, nos encontraríamos ante el problema de determinar si la memoria se encuentra disponible o no, en cuyo caso no tendría mucho sentido avanzar sobre la pregunta de la accesibilidad). El caso del experimento de Morgan y Riccio comentado anteriormente es un ejemplo de esta aproximación. Sin embargo, como puede verse en la discusión de ese trabajo, las interpretaciones posibles son varias y en particular los autores, aunque plantean la posibilidad de que una memoria accesible no se esté expresando, expresan mayor simpatía por la hipótesis de inaccesibilidad (Morgan y Riccio 1994).

Como se comentó anteriormente, al caracterizar el proceso de reconsolidación en el modelo de memoria contexto-señal en *Neohelice*, se demostró que dicha memoria puede reconsolidar sólo cuando el recordatorio que la activa genera una predicción que no se cumple. Evidentemente, es necesario para ello que la memoria se reactive²⁹. Esta característica se empezó a emplear en los trabajos que utilizan este modelo experimental, u otros similares, como un control de rutina del proceso de reconsolidación. En un estudio sobre la acción de un supuesto modulador extrínseco de la memoria, el estrés por privación de agua³⁰, sobre la memoria resultante luego de un entrenamiento de baja intensidad (que no generaba un cambio observable en el desempeño de los animales cuando eran evaluados en el largo plazo) se observó que un recordatorio contingente con el estrés en el momento en que los animales eran incapaces de expresar la memoria, producía en una sesión de evaluación subsiguiente un desempeño equivalente al de animales con un entrenamiento completo. Este efecto se observaba solamente en el caso de que el recordatorio no incluyera el refuerzo asociado al mismo en el entrenamiento, pero no se observaba cuando el recordatorio era acompañado por

²⁸ Una solución más sencilla aún de plantear sería evaluar la memoria al nivel del engrama, es decir “medir” la representación interna. Aunque teóricamente posible, el estado del arte no nos permite realizar esta medición hoy en día. Entre otras cuestiones, nos falta conocimiento sobre los mecanismos computacionales que rigen la codificación y decodificación de la información mnésica.

²⁹ Esto es casi una tautología: podríamos definir “memoria” como predicción (Eichenbaum y Fortin 2009 y la definición de memoria al principio de este capítulo) y por lo tanto la activación de la memoria no es otra cosa más que la generación de una predicción.

³⁰ Según la definición de sistema modulador extrínseco de Cahill y McGaugh (1996), el sistema de respuesta al estrés hídrico cumple con dos de las tres propiedades requeridas para ser considerado un sistema modulador: afecta la memoria de manera bidireccional (Delorenzi et al. 1995, Frenkel et al. 2010a), y su capacidad de afectar la memoria está acotada en el tiempo (Delorenzi et al. 1996). No se ha probado que afecte a otros aprendizajes distintos al de la memoria contexto-señal.

el estímulo asociado (Frenkel et al. 2005a). Siguiendo la tradición heredada de los modelos de modulación de la consolidación, estos resultados se interpretaron inicialmente en los términos canónicos de una modificación en la “fuerza” de una “memoria débil” o “traza de memoria”, es decir cambios plásticos en el cerebro que no son suficientes para generar una memoria funcional, una representación interna reactivable por un recordatorio. Sin embargo, una revisión de los resultados por el mismo grupo cayó en la cuenta de que aún cuando los animales amnésicos no eran capaces de expresar comportamentalmente la memoria, debían elaborar una predicción y contrastarla con la experiencia concurrente para poder modificar la fuerza de la memoria (Frenkel et al. 2010a).

De los objetivos de la presente tesis y de la metodología para alcanzar dichos objetivos.

Un tópico fundamental en el estudio de la memoria es el de la naturaleza de las amnesias experimentales. Este tópico es de interés no sólo por su significancia en el entendimiento de los mecanismos que subyacen al fenómeno de memoria, sino por su relevancia en el entendimiento de las distintas patologías de la memoria. Hasta este momento, dos grandes marcos teóricos se han esgrimido para explicar los casos en que la memoria se expresa y los que no, sean estos últimos amnesias experimentales, entrenamientos de baja intensidad, olvido o extinción: el de las deficiencias en el almacenamiento, por las que los cambios en una representación interna no persisten, y el de las deficiencias de recuperación, por las que memorias almacenadas, disponibles, no se pueden expresar comportamentalmente. Dentro de esta última interpretación, la visión más dominante es la de que las memorias disponibles no se expresan debido a una deficiencia en la accesibilidad a las mismas. Los resultados recientes en el modelo de memoria contexto-señal apoyan sin embargo una visión diferente: que las memorias disponibles pueden ser accedidas pero, aún cuando fueron reactivadas, no se expresan comportamentalmente. Esta hipótesis, que ya ha sido planteada con anterioridad (Morgan y Riccio 1994, Miller y Matzel 1988, Denniston et al. 2001, Urcelay y Miller 2008) se encuentra con el problema a nivel experimental de cómo demostrar la activación de una memoria en el momento en que no se expresa. El modelo de memoria contexto-señal permite sin embargo resolver esta cuestión mediante el uso de un control específico del proceso de reconsolidación con el que se pone a prueba la capacidad de la memoria de activarse, no a través de evaluar la toma de control del comportamiento, sino a través de evaluar el efecto de la información activada sobre otros procesos (la labilización y reconsolidación de la memoria). El objetivo de esta tesis es dar inicio a la caracterización de esta “deficiencia de expresión”. Para ello se utilizará el modelo de memoria contexto-señal, en el que se ha descrito este fenómeno para el caso particular de los entrenamientos de baja intensidad y para la amnesia inducida por saralasin, un antagonista de receptores de angiotensina, que participarían del sistema modulador activado por privación de agua. Con el

objetivo de replicar estas observaciones utilizando otros agentes amnésicos y con el objetivo de estudiar los mecanismos involucrados en este proceso, se evaluará la posibilidad de revertir la amnesia inducida por la interferencia de distintos agentes farmacológicos con la consolidación de la memoria. Se utilizarán drogas cuyo efecto amnésico ya ha sido descrito en este modelo: escopolamina, que bloquea de manera competitiva los receptores de acetilcolina de tipo muscarínicos, y sulfasalazina, que inhibe la entrada al núcleo del factor de transcripción NF- κ B, necesaria para que se exprese la memoria en el largo plazo. De esta manera, en un sistema en el que ya se ha descrito la acción de una hormona en la determinación de la expresión de la memoria en el largo plazo, se evaluará el posible rol en este proceso de un neurotransmisor y de un factor de transcripción, es decir de elementos que participan de la comunicación inmediata entre neuronas y de los mecanismos intracelulares que regulan la transcripción de genes. Este objetivo se desarrollará en el Capítulo III, donde se desarrollará brevemente el estado del conocimiento respecto a los mecanismos bajo estudio en general y específicamente en sus efectos en la memoria contexto-señal.

Otro objetivo será evaluar la posibilidad de rescatar la expresión de memorias amnésicas a partir de estímulos naturalistas. Hasta ahora se ha mostrado que un estímulo estresante naturalista, la privación de agua, puede aumentar la expresión de la memoria actuando en las fases de consolidación, reconsolidación y recuperación. En el marco de la modulación extrínseca de la memoria, estos sistemas (extrínsecos) cumplen con un rol adaptativo al regular el uso de distintos ítems de información. Este marco ha sido propuesto como complemento de los modelos de deficiencias de almacenamiento. La propuesta de esta tesis es que si bien los sistemas extrínsecos cumplen un rol de regulación de la información, no lo hacen seleccionando qué se almacena, sino qué se expresa de lo que se almacenó. Si esto es así, la expresión de la memoria debería poder ser manipulada por distintos estímulos comportamentales relevantes para la vida del animal, y esta regulación debería poder darse tanto de manera positiva (aumentando la expresión de la memoria, como ya se probó para el caso de la privación de agua), como de manera negativa. En función de esto, se propone buscar un estímulo naturalista que induzca un efecto amnésico sobre un entrenamiento completo, y evaluar si la amnesia resultante se debe a una deficiencia de disponibilidad o acceso, o a una deficiencia de expresión. Este objetivo será tratado en el Capítulo IV.

La expresión de una memoria es un fenómeno que debe resolverse en el momento de la recuperación, y se sabe que estímulos estresantes y cambios en el estado interno del animal pueden afectar el desempeño de un animal tanto por sus acciones en momentos cercanos a la adquisición de la información, como en el momento en que ésta se recupera. Si una memoria que no se expresa es sin embargo accesible y la información almacenada está siendo utilizada aún en ausencia de la toma de control del comportamiento, debe haber un sistema de toma de decisiones que determine esta expresión en base al estado de la memoria almacenada (determinado durante la consolidación por la acción de los sistemas moduladores extrínsecos). La manipulación de este sistema permitiría por lo tanto bloquear la expresión de la memoria aún cuando esta se ha almacenado sin interferencias, pero la memoria que no se expresa sería

reactivable. En el contexto del valor funcional propuesto para los sistemas moduladores extrínsecos, los estímulos en el momento de la recuperación deberían interactuar con el estado de expresión de la memoria determinado durante la consolidación para decidir la expresión o no de la memoria almacenada. Un caso típico de modulación de la expresión por cambios en el contexto de recuperación, es el cambio en la fase circadiana en que se evalúa al animal. El último objetivo de esta tesis, que será tratado en el Capítulo V, es evaluar la posibilidad de reactivar una memoria adquirida sin ninguna interferencia, pero que no se expresa en función de la situación recordatorio.

Puesto que en esta Tesis se estudiará la modulación positiva de la reconsolidación, a continuación se presentarán los experimentos necesarios, en caso de observarse una correlación entre un efecto y la presentación un recordatorio, para atribuir este efecto a un proceso de reconsolidación. Estos experimentos “controles” –un nombre que parece designar un experimento “de segunda mano”, que sin embargo evalúa críticamente una hipótesis alternativa al igual que cualquier “tratamiento experimental”– están extensamente revisados en Tronson y Taylor 2007. En primer lugar, si el efecto observado se atribuye a la acción de un tratamiento sobre la reconsolidación, habrá que realizar los controles pertinentes para verificar que dicho tratamiento es realmente el causante del efecto. El ejemplo más típico sería el caso de que el tratamiento fuese una droga, en cuyo caso se la compararía con la administración de una sustancia placebo o vehículo³¹. Por otro lado, se deberá probar que el estímulo recordatorio empleado es necesario para el efecto³². Esto se logra no presentando a los animales controles el estímulo recordatorio; idealmente, se reemplaza este estímulo por otro no asociado a lo aprendido, pero que permita una manipulación equivalente de los animales. Finalmente, una vez probado que tanto el tratamiento aplicado como el recordatorio son necesarios para producir el efecto observado, se debe probar que la contingencia entre ambos es también necesaria. Esta evaluación deberá tener en cuenta no sólo la dinámica temporal de los procesos iniciados por el tratamiento (por ejemplo, el tiempo que toma a una droga llegar a su sitio de acción), sino también la dinámica temporal de los procesos iniciados por la reconsolidación. Este último punto es normalmente desconocido (de hecho, podría ser la pregunta del experimento propuesto), pero se puede controlar de todas maneras mostrando que debe haber una relación temporal entre ambos. Es decir que, dado un tiempo de aplicación del tratamiento y de la presentación de un recordatorio que produce un efecto sobre la

³¹ Nótese que este control demuestra la necesidad de la droga, pero no su suficiencia ni permite descartar la necesidad de los componentes del placebo o del vehículo; es decir que no permite descartar una interacción, como por ejemplo que el efecto del placebo se “potencie” a causa de la droga, hipótesis alternativa que podría ser problemática por ejemplo al trabajar con sistemas que modulan respuestas complejas, como por ejemplo el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

³² Formalmente hablando, no es necesario el estímulo recordatorio sino la reactivación de la memoria que este produce. Ésta podría ocurrir no sólo cuando el individuo es presentado con un recordatorio del aprendizaje, sino también a partir de claves internas que sirvan como recordatorio o incluso se ha propuesto que de manera espontánea en distintas etapas del procesamiento de la memoria que podrían ocurrir, por ejemplo, durante el sueño (Dudai y Eisenberg 2004, Rasch y Born 2007). En los diseños empleados en esta Tesis, el estímulo recordatorio es la manipulación que el experimentador utilizará para inducir la reactivación de la memoria.

memoria, la aplicación del tratamiento en otros tiempos respecto del recordatorio no lo producirá. Finalmente, la reconsolidación es un proceso que requiere de un tiempo para desarrollarse. Se ha propuesto que en el corto tiempo de iniciado el proceso de reconsolidación y hasta pasado un cierto tiempo crítico, la memoria mantendría propiedades comportamentales similares a las de la memoria que fue reactivada. Entonces, un control para probar que se está trabajando específicamente en el proceso de reconsolidación consiste en evaluar el efecto esperado a corto y largo plazo. Si dicho efecto se debe a una interferencia con el proceso de reconsolidación, debería observarse sólo en el largo plazo, pero no en una ventana temporal pequeña acotada a la presentación del recordatorio (Nader 2003, Frenkel et al. 2005a, Tronson y Taylor 2007). Esto permitiría distinguir efectos sobre el proceso de reconsolidación de efectos sobre la recuperación de la memoria causados por la plasticidad de los circuitos necesarios para la recuperación que pueda ocurrir sólo como consecuencia de que dichos circuitos fueron utilizados durante la presentación del recordatorio y no por procesos de desestabilización y reestabilización como propone la teoría de reconsolidación (Gisquet-Verrier y Riccio 2012).

Una de las hipótesis alternativas más fuertes a las interpretaciones acerca de procesos de reconsolidación posiblemente sea la hipótesis de nuevos aprendizajes producidos por el estímulo que se usa como recordatorio. Un nuevo aprendizaje inducido por el recordatorio podría formar una nueva memoria que luego sería recuperada junto con la original, pudiendo generar en el observador la sensación de que la memoria original fue modificada. En muchos casos, los estímulos que se utilizan para evaluar la memoria original son los mismos que se usan como recordatorios. En otros casos, aún cuando el estímulo físico que se presenta al animal en el recordatorio no sea el mismo que se utilizará en la evaluación final, por el simple hecho de haber recuperado la memoria original, ésta funcionará a su vez como un estímulo generador de aprendizaje. Y finalmente, cualquier nueva memoria que se forme requerirá de un proceso de consolidación que también implicará una ventana de tiempo hasta que la nueva memoria se consolide, tal como ocurre con la reconsolidación. Por regla general, las nuevas memorias suelen expresarse más intensamente en el corto plazo (por ej. Smal et al. 2011), por lo que uno podría esperar una interacción mayor en el corto que en el largo plazo, exactamente en contra de lo que se esperaría luego de un proceso de reconsolidación. Sin embargo, se debe tener cuidado de no confundir el desempeño del animal, por lo general evaluado en un único parámetro comportamental, unidimensional, con la memoria, que puede presentar varios matices cualitativos. En la mayoría de los trabajos dedicados al estudio de los mecanismos de la reconsolidación, la misma suele evidenciarse a través de agentes amnésicos, es decir agentes que producen una disminución en el desempeño de la memoria. En estos trabajos suele asumirse que el único nuevo aprendizaje que podría explicar esta disminución es la extinción de la memoria original, a la cual se la considera un nuevo aprendizaje que compite con e inhibe al aprendizaje original (Myers y Davis, 2002). La hipótesis alternativa de extinción se controla por resultados negativos al tratar de evidenciar dicho proceso a partir de algunas de sus propiedades, como la recuperación espontánea (Tronson y Taylor 2007). Sin embargo, otros aprendizajes diferentes a la extinción pueden producir tanto un aumento como una

disminución en el desempeño de la memoria evaluada. Y esta situación es particularmente importante en los casos en que se evidencie la reconsolidación por un efecto facilitador de la memoria, es decir que aumenta el desempeño (Gold et al. 1973, Gold y King 1974). El argumento de *sumación* de trazas propone que:

“...el efecto [recordatorio] requiere que al menos parte del engrama debe permanecer intacto después del tratamiento de amnesia retrógrada. (...) La amnesia incompleta inducida por el electroshock convulsivo permite la consolidación de un engrama débil que está subumbral cuando se lo evalúa 24hs después, pero que puede ser elevado por encima del umbral por un tratamiento recordatorio, porque la entrada de información del recordatorio induce la formación de un nuevo engrama. No hay necesidad desde esta visión de invocar ningún efecto del recordatorio sobre el propio mecanismo de recuperación. (...) dicho aprendizaje no contingente puede resultar en un engrama subumbral que coopera con el engrama subumbral del entrenamiento que sobrevivió al tratamiento de amnesia retrógrada hasta alcanzar un nivel acumulado que puede ser recordado.”³³

Para poder eliminar esta alternativa se han empleado diversas estrategias, como evaluar la transferencia de elementos específicos de la memoria original (Gordon y Spear 1973) o asociar el aprendizaje original a claves que servirán de recordatorio pero que no estarán presentes en la evaluación final, y que o bien son irrelevantes para la tarea o bien se espera que tengan un efecto contrario al producido por un proceso de sumación (Smith y Spear 1979). El estudio sistemático de las condiciones que debe tener un recordatorio para inducir el proceso de reconsolidación permitió desarrollar mejores controles para este fenómeno, puesto que permiten presentar al animal con distintos estímulos, todos ellos recordatorios de la tarea original a la vez que acarrean información que puede generar un nuevo aprendizaje que afecte la evaluación final, pero que difieren entre sí en cuanto a si inician o no el proceso de reconsolidación. En particular, en el modelo de memoria contexto-señal en *Neohelice*, que se desarrollará en detalle más adelante, se ha visto que una memoria asociativa entre un estímulo neutro y uno aversivo entra en reconsolidación cuando el recordatorio que se presenta es breve y no incluye un refuerzo del entrenamiento, es decir se presenta la clave neutra sin mostrarle al animal el estímulo aversivo asociado (Pedreira et al. 2004). Puesto que las presentaciones no reforzadas de un estímulo neutro en este tipo de condicionamientos pueden producir extinción, siguen siendo necesarios otros controles en el caso de que se observen efectos amnésicos en la reconsolidación. Sin embargo, en el caso de efectos que aumentan el desempeño de la memoria, como los que se discutirán en esta tesis, esta particularidad de la reconsolidación permite controlar estos efectos presentando al animal con un recordatorio más completo (puesto que incluye tanto la clave neutra como la aversiva), del que se espera que, en caso de generar memorias nuevas, éstas modifiquen el desempeño en el mismo sentido del aumento que se trata de controlar, puesto que el recordatorio incluye un reentrenamiento, y que sin embargo no induce reconsolidación. En oposición, un recordatorio con menos cantidad de de claves presentes en el entrenamiento y en la evaluación final de la memoria, que no implica un reentrenamiento explícito y sí podría suponer un entrenamiento en sentido opuesto

³³ Cherkin 1972 (T. del A.)

al desempeño del animal, permite iniciar el proceso de reconsolidación. El uso de estos recordatorios que permiten disociar memorias reactivadas y además labilizadas de memorias reactivadas pero que no entran en la fase de reconsolidación fue puesto a punto inicialmente en el modelo de memoria contexto-señal en *Neohelice*, pero luego fue extendido a otros modelos, en particular a modelos de memoria en humanos (Forcato et al. 2007, Sevenster et al. 2012). Aunque en otros modelos animales se han evaluado las condiciones necesarias para que un recordatorio induzca reconsolidación de una memoria, en la mayoría de los casos se deben realizar importantes cambios en las condiciones de entrenamiento (Morris et al. 2006, Rodriguez-Ortiz et al. 2005) siendo imposible aplicar este razonamiento a un experimento control, puesto que el “control” diferiría del “tratamiento experimental” no sólo en las condiciones de recordatorio y el efecto logrado por estas sino también en la memoria que se está estudiando. En muchos casos, los recordatorios inducen labilización independientemente de que impliquen un refuerzo o no³⁴. Este fenómeno es fácilmente explicable si se tiene en cuenta que se puede observar un cambio en el desempeño de los animales tratados con recordatorios reforzados, es decir un reentrenamiento. El hecho de que los animales continúen demostrando aprendizaje luego del recordatorio indica que la predicción no fue cumplida (Rescorla y Wagner 1972), y esta interpretación es sostenida por estudios que manipulan el entrenamiento de manera de llevar el desempeño a un nivel asintótico en el que un recordatorio no incorpore nueva información (Rodriguez-Ortiz et al. 2005). Recientemente, la observación de que algunas drogas que por sí mismas no cambian el desempeño de la memoria pero que impiden los efectos tanto amnésicos como promnésicos de otras drogas y del reentrenamiento, ha llevado a proponer mecanismos disociables de labilización y reconsolidación, siendo el primero necesario para el segundo (Ben Mamou et al. 2006, Lee et al. 2008, Milton et al. 2013, Fustiñana 2013). Aunque esta interpretación (al igual que la referente al rol del error de predicción) requiere una investigación más intensa, la posibilidad de manipular farmacológicamente el recordatorio de manera de poder impedir la desestabilización de la memoria reactivada, ofrece una posibilidad de controlar los aspectos relacionados con nuevos aprendizajes en paradigmas clásicos, sin necesidad de modificar las condiciones del entrenamiento.

³⁴ Nótese que la manipulación de las expectativas del animal para inducir o no la reconsolidación ya se realizó, mucho antes que en el modelo de memoria contexto-señal en *Neohelice*, en un modelo de evitación activa en rata (Gerson y Hendersen 1978). Sin embargo, el uso de este protocolo de manera sistemática como control fue desarrollado en el modelo del cangrejo, en el que el recordatorio con mayor cantidad de claves no induce reconsolidación, lo que permite controlar la sumación. En el protocolo de evitación activa, el recordatorio que induce reconsolidación es el de menor cantidad de claves. Los protocolos de evitación activa, por otro lado, han dejado de emplearse en estudios de amnesia experimental debido a la dificultad para controlar otros aspectos.

Del paradigma de Memoria Contexto-Señal

La memoria contexto-señal de *Neohelice granulata* (*Chasmagnathus granulatus*), el tipo de memoria número 257 (Tulving 2007), es un paradigma experimental de memoria en el cual los cangrejos aprenden a asociar un estímulo visual potencialmente peligroso con el contexto donde éste sucede (Maldonado et al. 1997, Maldonado 2002, Tomsic y Romano 2013). En condiciones naturales, en las rías de San Clemente del Tuyú, en Argentina, el cangrejo *Neohelice granulata* es predado por la gaviota cangrejera (Berón 2003). En el laboratorio (y también en el campo: Fathala et al. 2010a, 2010b), la presentación de una pantalla opaca que se mueve horizontalmente por encima del animal produce una respuesta de escape. La probabilidad de efectuar la respuesta de escape disminuye gradualmente con la presentación reiterada de este estímulo y es reemplazada por una respuesta de congelamiento en la que el animal permanece rígido de manera activa, con el segundo y tercer par de patas ambulatorias extendidas y las quelas flexionadas frente al área oral (Pereyra et al. 1999).

Si este estímulo aversivo (el “Estímulo Visual de Peligro”, EVP) se presenta más de 10 veces de manera espaciada, a intervalos regulares de aproximadamente tres minutos, se produce una memoria de largo plazo que se puede evidenciar hasta por lo menos cinco días después (Hermitte et al. 1999) como una disminución en la respuesta de escape³⁵ de los animales cuando se los vuelve a exponer al EVP. Esta disminución en la respuesta de escape se generaliza en el corto plazo (unas pocas horas), es decir que se expresa tanto en el mismo contexto como en uno diferente a aquel en que se entrenó a los cangrejos; pero se expresa de manera contexto-específica –solamente en el mismo contexto donde se entrenó a los animales– cuando se la evalúa en el largo plazo (Tomsic et al. 1998, Suárez et al. 2010).

Se ha estudiado en este modelo las fases de consolidación y de reconsolidación. La expresión de la memoria contexto-señal en el largo plazo requiere de síntesis proteica luego del entrenamiento (Pedreira et al. 1995, 1996, Hermitte et al. 1999) y se ha propuesto la participación de una vía de señalización intracelular que se iniciaría por la entrada de Ca^{2+} mediada por receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (Troncoso y Maldonado 2002), involucraría una serie de quinasas cuya activación dependería de dicha entrada de Ca^{2+} (Romano et al. 1996a, 1996b, Locatelli et al. 2002, Feld et al. 2005, Merlo et al. 2002), y finalmente la activación del factor de transcripción NF- κ B (Freudenthal et al. 1998, Freudenthal y Romano 2000; para una extensa revisión de estos trabajos, ver Romano et al. 2006a, 2006b, Tomsic y Romano 2013 y la introducción del Capítulo III).

Como es de esperar en cualquier paradigma de memoria que se estudie extensamente, la memoria contexto-señal en *Neohelice* ha mostrado un alto grado de elaboración y complejidad y una gran dificultad para ser encasillada en los modelos clásicos de aprendizaje. El parámetro experimental que se usa para definir el comportamiento, las vibraciones

³⁵ Se registran las vibraciones en la arena experimental producidas por el animal cuando escapa. Por lo tanto, aún cuando la respuesta propia de esta memoria sea el congelamiento, éste se observa como una disminución en la respuesta de escape. Para una descripción más detallada de los parámetros del entrenamiento y de la forma de registro, véase el Capítulo II.

producidas en la arena experimental por el escape del animal, disminuye de manera gradual en un espectro continuo y cumple con varias de las características paramétricas que definen la habituación. Sin embargo la respuesta se define a partir de parámetros muestrales, no individuales, que reflejan la probabilidad de que cada animal responda al EVP con una respuesta discreta de escape o congelamiento³⁶ (Pereyra et al. 1999, 2000). Parámetros fisiológicos indican que el animal evoca la memoria antes de ser presentado con el EVP, en respuesta a claves contextuales o discretas asociadas con el mismo (Burnovicz y Hermitte 2010, Frenkel et al. 2012), y parámetros comportamentales muestran que la memoria puede extinguir o reconsolidar en ausencia del EVP, procesos que requerirían la reactivación de la memoria (Tomsic et al. 1998, Hepp et al. 2009, Pedreira et al. 2002). El análisis de curvas de reentrenamiento mostró que los animales, además de aprender las características del contexto, el EVP y la relación entre ellos, aprenden otras características de la situación de entrenamiento como la duración del intervalo entre ensayos (Pedreira et al. 1998). En base a éstas y otras evidencias (para revisiones ver Maldonado 1997, 2002, Tomsic et al. 2009) se han elaborado varias interpretaciones, no necesariamente excluyentes, de la memoria contexto-señal que la presentan como compuesta de al menos dos subprocesos: una memoria contexto-señal propiamente dicha que implica una asociación entre el contexto y el EVP, y una memoria “señal” que refiere al aprendizaje de propiedades del EVP, incluyendo su frecuencia de aparición, que diferirían en sus propiedades tanto a nivel mecánico (por ejemplo en el requerimiento de síntesis proteica, Hermitte et al. 1999) como comportamental. Se ha propuesto que el cambio comportamental ante el EVP refleja un aprendizaje de tipo pavloviano, en el que un estímulo condicionado, el contexto, sería asociado con un estímulo incondicionado, el EVP, de manera de producir una respuesta condicionada, que se revela en este paradigma experimental a través del cambio de respuesta al EVP³⁷ (Maldonado 1997, 2002). También se ha propuesto que el componente asociativo sería mejor descripto por una

³⁶ En rigor, el repertorio de respuestas posibles es más extenso. Pereyra et al. (1999) describieron tres respuestas: de congelamiento activo, escape y una respuesta defensiva en la que el animal se yergue y levanta las quelas en posición de combate. En mis propias observaciones, además de las respuestas mencionadas, he observado una respuesta de congelamiento en la que el animal lleva las patas y quelas hacia el centro del cuerpo, de manera de reducir su volumen aparente, y permanece inmóvil, pero sin la rigidez característica del congelamiento activo.

³⁷ La respuesta condicionada no sería en este caso el congelamiento, sino el “prepararse” para congelarse. Esta “preparación” diferenciaría, por ejemplo, la memoria asociativa contexto-señal, de la memoria señal que puede expresarse en un contexto diferente pero nunca en el primer ensayo de la evaluación. En una evaluación de varios ensayos (formalmente un reentrenamiento), el primero generaría esta preparación al congelamiento, que se observa recién en el siguiente. Aunque no hubo éxito en muchos intentos de buscar otros parámetros que se modifiquen sólo por la presencia del estímulo condicionado (por ej. Hermitte y Maldonado 2006, Klappenbach et al. 2012), se debe considerar la dificultad de encontrarlos en un paradigma que fue puesto a punto para trabajar con un único parámetro. Cambios mayores en el paradigma sí han permitido detectar una respuesta condicionada (Burnovicz y Hermitte 2010, Fustiñana et al. 2013) pero, puesto que implican cambios en el protocolo de entrenamiento y por lo tanto en la información adquirida, su extrapolación al modelo “clásico” de memoria contexto-señal es por lo menos discutible. Evidencias más directas de la reactivación de algún tipo de memoria sólo por la presentación del estímulo condicionado se encontraron midiendo la expresión de proteínas marcadoras de actividad neuronal luego de la presentación del recordatorio (Frenkel et al. 2012), aunque no se puede asumir que reflejen la actividad de la misma traza de memoria que subyace al comportamiento propio de la memoria contexto-señal.

habituación asociativa: la exposición al contexto permitiría activar una representación del EVP que permite reducir la respuesta incondicionada cuando éste se presenta. En este caso, el congelamiento no sería una respuesta condicionada, sino una segunda respuesta incondicionada que sólo puede expresarse luego de la inhibición de la respuesta más probable, el escape (Tomsic et al. 2009). Como reflejo de la gran complejidad de esta memoria, a nivel mecánico se han encontrado procesos que correlacionan con la memoria contexto-señal, tanto en la adquisición como en su recuperación en los ganglios supraesofágico y ópticos (Freudenthal et al. 1998, Freudenthal y Romano 2000, Tomsic et al. 2003, Sztarker y Tomsic 2008, Federman et al. 2009) y se han encontrado evidencias de modularidad en el procesamiento de distintos aspectos informacionales de la memoria (Sztarker y Tomsic 2011).

Pero más allá de cuál sea el modelo que mejor describa la memoria contexto-señal, todos ellos coinciden en proponer una memoria asociativa entre un estímulo aversivo y el contexto donde este ocurre. La presentación del contexto de entrenamiento luego de adquirida la memoria contexto-señal es suficiente para reactivarla y dicha reactivación puede evidenciarse midiendo la respuesta de los animales a una subsiguiente presentación del EVP. La reactivación de esta memoria puede dar lugar a su expresión comportamental, que se observa cuando el animal es enfrentado nuevamente al EVP, pero también puede dar lugar a otros procesos como la extinción o la reconsolidación (Tomsic et al. 1998, Pedreira et al. 2002). Que el recordatorio produzca uno u otro proceso depende de la duración del mismo: recordatorios breves, del orden de 5 o 10 minutos producen reconsolidación, mientras que recordatorios extensos, de 40 minutos a 2 horas, producen extinción (Pedreira et al. 2003, Hepp et al. 2009). Se ha propuesto algún tipo de mecanismo que permite decidir entre ambos procesos y que esta decisión dependería de la información adquirida durante la recuperación de la memoria reactivada y se tomaría en el momento en que termina el evento recordatorio (Pérez-Cuesta et al. 2007, Pérez-Cuesta y Maldonado 2009). Entre los elementos que son evaluados a la hora de decidir el inicio de estos procesos, uno de ellos es lo que se dio en llamar la falta de coincidencia entre lo que se espera y lo que realmente ocurre. Como resultado del aprendizaje contexto-señal, los animales presentados con el contexto de entrenamiento generarían una expectativa de ocurrencia del EVP³⁸. Si se satisface esta expectativa presentando el refuerzo la memoria se expresa comportamentalmente, probando así que la traza de memoria fue reactivada, pero no se produce extinción ni reconsolidación. Sin embargo, si se presenta el contexto de entrenamiento y se retira al animal sin haberle presentado el refuerzo, se dará inicio a alguno de los dos procesos, dependiendo del tiempo que haya durado la exposición al contexto (Pedreira et al. 2004, Pérez-Cuesta et al. 2007).

Un entrenamiento con un menor número de ensayos (típicamente 5 o 6) genera una memoria que se expresa de manera generalista (en cualquier contexto) a corto plazo (al menos hasta 4 horas luego del entrenamiento, Smal et al. 2011), pero no se observa en el largo plazo

³⁸ Podemos afirmar esto en parte porque la memoria contexto-señal puede extinguir, y dicha extinción tiene las características de una memoria CS-No Us (Hepp et al. 2009), por lo que es razonable pensar que hubo una predicción del EVP, que convierte la no ocurrencia de éste en un fenómeno positivo. También véanse los argumentos presentados en la nota anterior.

(Pedreira et al. 1998). Sin embargo, este entrenamiento “débil” genera una traza de memoria que se puede evidenciar por ejemplo facilitando con estrés la recuperación (Frenkel et al. 2005b) o la reconsolidación (Frenkel et al. 2005a, 2010a). Esta traza facilitable depende de síntesis proteica (Frenkel et al. 2010a) y la especificidad al contexto de entrenamiento para su expresión facilitada en el largo plazo nunca se evaluó.

II.

Metodología

Metodología y Diseño Experimental

Animales.

Se utilizaron cangrejos machos de la especie *Neohelice granulata* (*Chasmagnathus granulatus*) (Dana, 1851; Sakai, 2006) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). Estos animales semiterrestres habitan las zonas de transición de agua dulce y salada, en la costa este de Argentina, Uruguay y Brasil (Spivak 2010). Es un poderoso regulador osmótico (Bromberg et al. 1995). *Neohelice granulata* es predado principalmente por aves (Berón 2003), así como por coespecíficos (Mendez Casariego et al. 2011).



Figura 1: Ejemplar macho de la especie *Neohelice granulata* (*Chasmagnathus granulatus*).
(Fotografía: Fernando Locatelli)

Los ejemplares utilizados para los experimentos fueron todos machos, con un ancho de caparazón de entre 2,7 y 3,0 cm y un peso promedio de 17 g (Fig. 1), recolectados en aguas de menos de un metro de profundidad en las rías de San Clemente del Tuyú (Buenos Aires, Argentina). La captura de los animales fue realizada por investigadores del Laboratorio de Neurobiología de la Memoria, utilizando la técnica de pesca con mediomundo y cabezas de lisa, provistas por una pescadería local, como carnada. Los animales fueron transportados al laboratorio dentro de las 24 horas siguientes a la captura y alojados en un bioterio, en cubas plásticas (48×35×17 cm) con 2 cm de agua marina artificial (Marinemix, Cristal Sea, USA), con 12‰ de salinidad y pH = 7,4–7,6. Se alojaron 20 cangrejos en cada cuba, y fueron mantenidos con un ciclo luz-oscuridad de 12-12 horas, con renovaciones completas de agua cada dos días. La temperatura se mantuvo constante entre 22–24°C, tanto en el bioterio como en la sala experimental. La manipulación de los animales se realizó siempre entre las 8:00 y las 20:00 hs (ciclo de luz), y dentro de los diez días desde su llegada al laboratorio. Cada animal fue utilizado en un sólo experimento.

El Actómetro.

La arena experimental, el *actómetro* (Fig. 2), es un contenedor plástico, opaco y de color anaranjado, de base circular y paredes cóncavas (23 cm de diámetro superior y 9 cm de diámetro inferior, 10,5 cm de altura) con agua de mar artificial hasta una altura de 0,5 cm. El recipiente se encuentra iluminado desde arriba por una lámpara de 5W. Cuatro micrófonos (transductores piezoeléctricos) colocados en la base del recipiente, del lado externo, convierten las vibraciones del recipiente en señales eléctricas que son registradas por una computadora. Sobre el actómetro, a 12 cm del borde superior, se encuentra una pantalla plástica rectangular (25 x 7,5 cm), negra y opaca, que puede ser movida por un motor colocado en uno de sus extremos y controlado por computadora. El movimiento de la pantalla describe un ángulo horizontal de 90° sobre el recipiente y luego vuelve a su posición inicial (Fig. 3). Este movimiento se repite dos veces durante 9 segundos (con 2 segundos de intervalo entre ciclos) y genera una respuesta de escape en los animales no entrenados (Maldonado 2002). A este estímulo se lo denomina *Estímulo Visual de Peligro* (EVP). Se utiliza un solo animal por vez en cada actómetro.



Fig. 2: El Actómetro.



Fig. 3: Esquema del actómetro y el movimiento del EVP.

La habitación donde se realizan los experimentos posee 40 actómetros, separados uno de otro por particiones opacas, permitiendo así trabajar con 40 animales simultáneamente. Además, la sala contiene cajoneras con recipientes cilíndricos (cuatro por cajón, 15 cm \varnothing x 15 cm de alto) con 0,5 cm de agua de mar artificial, para alojar individualmente a los sujetos entre sesiones. No hay iluminación dentro de las cajoneras.

Diseño Experimental.

A continuación se mencionan las características generales de los diseños experimentales empleados. En cada capítulo se darán detalles específicos.

Cada experimento duró dos, tres o cuatro días y se utilizaron 2 o 4 grupos de entre 30 y 40 cangrejos. Cada animal, previamente a ser utilizado en un experimento, pasó por una prueba de selección en la cual se lo voltea manualmente, quedando apoyado sobre el dorso. Sólo se usaron aquellos animales que inmediatamente volvieron a la posición normal. Esta prueba se realiza puesto que los animales que tardan en recuperar la postura normal suelen mostrar baja respuesta a una variedad de estímulos (movimiento horizontal o vertical de una pantalla, shock eléctrico de 6V) y suelen mostrar síntomas de mala salud (Godoy y Maldonado, 1995). Puesto que la habitación donde se realizan los experimentos posee 40 actómetros, los sujetos pertenecientes a distintos grupos (tratamientos experimentales) son asignados a 10 actómetros, de manera que simultáneamente se manipulen todos los tratamientos. Los animales son asignados a cada actómetro y tratamiento de manera pseudoaleatoria. Este procedimiento es repetido cuatro veces hasta completar los 40 sujetos por tratamiento. Las cuatro repeticiones se realizan en el mismo día y nunca se utilizan conjuntamente datos de animales entrenados en distintos días ya que la intensidad de respuesta de los animales al EVP puede variar entre capturas y entre días dentro de una misma captura. Una baja respuesta al EVP de los grupos controles en cualquier etapa del experimento, así como un cambio brusco en esta respuesta entre sesiones de un mismo experimento (por lo general, disminución de la respuesta), son considerados criterios de eliminación del experimento puesto que reflejan un deterioro de los animales. Diferencias importantes entre cada bloque de 10 animales también son consideradas criterios de eliminación. Todos estos criterios son evaluados mediante la observación de los datos por el experimentador, sin aplicar criterios estadísticos formales. Otros criterios derivados de la observación de los animales en las etapas de captura y alojamiento en el bioterio complementan a los mencionados.

Cada experimento constó de una serie de etapas denominadas *Sesiones*, separadas por períodos de tiempo en los que los animales permanecen alojados en cajoneras oscuras. Normalmente los experimentos constaron de tres sesiones: una *Sesión de Entrenamiento*, una *Primera Sesión de Evaluación* y una *Segunda Sesión de Evaluación*. Durante la fase de

entrenamiento uno o dos grupos de animales (*entrenados, E*) fueron tratados con un *Protocolo de Entrenamiento Fuerte (PEF)*: luego de 10 minutos de adaptación al actómetro, se presenta el EVP 15 veces, separadas por intervalos entre estímulo de 171 segundos. A cada grupo entrenado se le asigna un grupo control (*C*) que permanece en el actómetro la misma cantidad de tiempo sin ser estimulado o siendo estimulado una sola vez luego de diez minutos de adaptación al actómetro para obtener un nivel de respuesta inicial y verificar que sea comparable al de los grupos entrenados. Diferencias en la respuesta inicial entre grupos controles y entrenados son consideradas como criterio de eliminación del experimento puesto que hacen imposible asignar cualquier diferencia posterior a la adquisición de una memoria resultante del entrenamiento. De esta manera quedaron conformados pares de grupos E-C, donde todos los sujetos fueron tratados de la misma manera en el resto del experimento, es decir que cada par de grupos pudo diferir de otro par en la sustancia inyectada, el protocolo de reactivación o algún otro tratamiento; pero dentro de un par E-C la única diferencia entre los grupos de sujetos fue el protocolo de estimulación en la sesión de entrenamiento.

En la *Primera Sesión de Evaluación*, que funciona como sesión de reactivación de la memoria, los animales fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento (el actómetro) por 10 minutos. Luego de este tiempo de exposición los animales pueden ser estimulados con el EVP o no, según el protocolo específico de cada experimento. En los casos en los que los animales son estimulados, la respuesta al estímulo es registrada y analizada como se detalla más adelante para evaluar la expresión comportamental de lo aprendido durante la *Sesión de Entrenamiento*. En la mayoría de los experimentos (capítulos III y IV, pero no en el capítulo V), esta exposición al contexto de entrenamiento es seguida de 2hs de privación de agua, un protocolo que se ha visto que es capaz de producir efectos facilitadores de la expresión de la memoria (ver capítulo I y a continuación).

En la *Segunda Sesión de Evaluación* los animales son reexpuestos al contexto de entrenamiento por 10 minutos, luego de lo cual se les presenta el EVP. La respuesta al EVP es registrada y analizada para evaluar la expresión comportamental de la memoria.

En cada capítulo se describen los protocolos experimentales con más detalle, incluyendo sesiones adicionales o variantes en la forma de presentación de los estímulos. En particular, en el capítulo IV se utilizó una variante del paradigma, denominada Condicionamiento Contextual Pavloviano (Fustiñana 2013, Fustiñana et al. 2013). En esta variante, tanto durante el período de adaptación al actómetro como durante la mayor parte del intervalo entre ensayos, el actómetro es iluminado con dos lámparas colocadas bajo el mismo y no con la lámpara superior. Este cambio en la iluminación es percibido por los animales como un cambio drástico en las características del contexto (Pérez Cuesta et al. 2007). Cada intervalo entre ensayos de 171 segundos está compuesto por 153 segundos con la iluminación inferior y 18 segundos con iluminación superior; que son seguidos por el ensayo, que consiste en una presentación de 9 segundos del Estímulo Visual de Peligro con iluminación superior, tal como en el paradigma clásico de memoria contexto-símbolo. El mismo esquema se repite en las

sesiones de evaluación. La reactivación sin presentación del refuerzo, consiste en la exposición de los animales al actómetro con la misma secuencia de luces que ocurriría en una evaluación reforzada (10 minutos con luz inferior y 27 segundos de luz superior). Este protocolo, que se describe con más detalle en el capítulo IV, se asume en esta Tesis similar al paradigma clásico de memoria contexto-señal, y su elección fue circunstancial en el momento de realizar los experimentos.

Privación de agua

En todos los experimentos de los capítulos III y IV los animales fueron expuestos a un protocolo de privación de agua inmediatamente después de la presentación al contexto durante la Primera Sesión de Evaluación, o sesión de reactivación de la memoria. Para ello, mientras los animales permanecen en los actómetros, se retira el agua de los recipientes cilíndricos donde se conservan a los animales entre sesiones. Al término de la exposición al actómetro, los animales son colocados en las cajoneras sin agua. Luego de dos horas, se coloca gentilmente, tratando de perturbar lo menos posible al animal, agua de mar artificial hasta una altura de 0,5cm.

Este protocolo ha mostrado ser un facilitador de las fases de consolidación, recuperación y reconsolidación de la memoria contexto-señal (Frenkel et al. 2002, 2005a, 2005b, 2010a). Además de los efectos facilitadores mencionados, este protocolo produce un aumento de sodio en hemolinfa (Frenkel et al. 2002). En el ganglio supraesofágico, se observa un aumento general en la concentración de angiotensina II (Frenkel et al. 2002), pero también cambios en su distribución (Frenkel et al. 2010b). Los efectos facilitadores en la consolidación y recuperación son bloqueados por saralasin, un antagonista de receptores de angiotensina II (Frenkel et al. 2002, 2005b). También se observa un aumento de la concentración del factor de transcripción κ B (NF- κ B) en núcleos del ganglio supraesofágico (Frenkel et al. 2002) luego de la privación de agua; aunque no se ha podido establecer si este aumento en la fracción nuclear de NF- κ B media los efectos facilitadores de la privación de agua.

Análisis Estadístico.

Operacionalmente³⁹, se define la memoria contexto-señal (MCS) como la diferencia significativa de actividad entre el grupo entrenado y su correspondiente grupo control ($E < C$);

³⁹ Según Endel Tulving (2007, T. del A.): “Brevemente, una definición operacional describe operaciones concretas que un observador imparcial de la naturaleza –sí, creían en la existencia de observadores imparciales en los viejos días– realiza para crear o construir la entidad a ser definida. La construcción, esto es la descripción de cómo usted ‘llegó ahí’, define qué es lo que usted quiso definir. (...) La gran ventaja con las definiciones operacionales es que nadie puede argumentar contra usted cuando las usa. O al menos no lo tienen permitido, de acuerdo a la teoría. Las definiciones operacionales son totalmente objetivas y se supone que los científicos aman la objetividad. Si alguien disiente con su definición operacional, usted sólo debe apagar su audífono”.

por lo tanto, decimos que un grupo entrenado muestra retención de lo aprendido cuando exista dicha diferencia. Los análisis estadísticos sólo se realizaron sobre animales provenientes del mismo esfuerzo de captura y que fueron entrenados simultáneamente. Nunca se realizó un análisis estadístico sobre datos provenientes de distintos experimentos.

Los datos fueron analizados utilizando comparaciones planeadas a priori y análisis de varianza (ANOVA) de un factor seguido de comparaciones a posteriori por el método de Tuckey ($\alpha < 0,05$) (Rosenthal & Rosnow, 1985). En cada experimento, que por lo general consiste en dos pares de grupos E-C son relevantes tres comparaciones entre tratamientos: cada grupo E con su correspondiente grupo C, y los grupos C entre sí. La diferencia significativa entre un grupo E y su correspondiente grupo C (E<C) se interpreta como retención de la memoria, según la definición operativa de memoria, y por lo tanto es evaluada con contrastes ortogonales. Sin embargo, los tratamientos realizados podrían tener efectos en la respuesta motora de los animales no relacionados con la memoria contexto-símbolo. Si un tratamiento aumentase o disminuyese significativamente la actividad motora de los animales en general, independientemente de si fueron entrenados o no, esto podría generar efectos “techo” o “piso” respectivamente, y daría como resultado una aparente amnesia: los grupos E-C no mostrarían diferencias entre ellos puesto que las respuestas serían máximas o mínimas tanto para los animales entrenados como para sus controles. Por lo tanto, si un par E-C con un determinado tratamiento se corre con otro par en simultáneo que controla dicho tratamiento, la comparación entre los grupos C valida el empleo de la definición operativa de memoria. Aún cuando la comparación entre grupos C está planeada a priori, no es ortogonal con las otras dos comparaciones, por lo que no se puede realizar el análisis de contrastes ortogonales. Históricamente se han analizado estos contrastes como si fuesen ortogonales; pero puesto que no lo son, esto lleva necesariamente a errores en la estimación de la significancia de las diferencias encontradas. La solución que encontramos y que se aplica por primera vez en esta Tesis, es la realizar una comparación a posteriori, luego del análisis de la varianza mediante la prueba de Tuckey, y validarla luego con una prueba independiente. La preferencia por realizar las comparaciones C-E con el análisis a priori se basa en que esta comparación es la que define operacionalmente la memoria en este paradigma y es aquella en donde se prefirió mayor potencia para discriminar los casos de animales que muestran retención de aquellos que tienen un comportamiento amnésico. El problema evidente con realizar contrastes ortogonales en la comparación E-C pero analizar una posible diferencia C-C con Tuckey, es que la interpretación del experimento en términos de fenómenos relacionados con la memoria, que parte de las comparaciones realizadas a priori, es validada por un resultado negativo en una prueba de menor potencia que la que se utiliza para definir la memoria. Así, una diferencia en el efecto de los tratamientos sobre los grupos controles cuya magnitud estuviese en el orden de la magnitud de efecto del entrenamiento, podría no ser detectada por esta prueba. Para controlar este aspecto, los grupos controles fueron comparados de manera independiente, entre sí, mediante una prueba de t. El resultado de dicha prueba sólo se utilizó para evaluar, según un criterio de umbral ($\alpha < 0,05$), la consideración del resultado de la prueba a posteriori.

En todos los casos se informa sólo el resultado de la prueba a posteriori para no generar interpretaciones erróneas por el uso de varias pruebas estadísticas en simultáneo e independientemente sobre los mismos datos. En caso de que la prueba de t entre los grupos C-C no muestre diferencias significativas será válido considerar que, puesto que esta prueba es más potente aún que los contrastes ortogonales, la falta de diferencias significativas según Tuckey no es atribuible a su baja potencia, al menos dentro del umbral de sensibilidad de los contrastes que determinan la presencia o ausencia de memoria. Los datos de actividad registrados por la computadora fueron transformados logarítmicamente para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedacia de la prueba ANOVA. Puesto que las unidades de medición son arbitrarias, se eligió mostrar gráficamente los datos utilizando las medidas transformadas. Estas medidas permiten expresar los datos como medias y error estándar, que por lo general resultan más cómodas para el lector. El análisis estadístico se realizó con el programa InfoStat v.2013 (FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Inyecciones.

Todas las inyecciones se realizaron en el saco pericárdico, para ello los animales fueron inyectados a través del lado derecho de la membrana cefalo-torácica dorsal usando agujas (0,4mm \emptyset) con un tope para controlar la profundidad de inyección (4mm). El volumen de inyección siempre fue de 50 μ l/animal. Las drogas fueron diluidas en solución salina para crustáceos: NaCl (450mM), KCl (10mM), MgCl₂ (10mM) y CaCl₂ (15mM) (adaptada de Bond-Buckup et al. 1991). La sulfasalazina fue diluida en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO, 15% en solución salina de crustáceos, pH=7,4). Las concentraciones utilizadas de cada droga se describen en los capítulos correspondientes, así como la preparación del buffer con DMSO.

Aspectos éticos.

Los animales son capturados en su ambiente natural en San Clemente del Tuyú. Luego de más de 30 años de experimentación, no parecen observarse efectos en el ambiente de estas extracciones, aunque ningún estudio formal ha sido realizado. Aunque el número de animales extraído puede parecer alto (llegando hasta 2000 animales en una quincena), este número no parece representar una proporción significativa, según se observa en el campo. El número de animales empleado en cada experimento ha sido elegido en función de la varianza propia de estos animales (grande en comparación con otros modelos animales típicos, que son criados en bioterio) para asegurar una buena chance de resultados positivos cuando los animales retienen lo aprendido y lo expresan comportamentalmente. Bajo esta consideración, se ha tratado de minimizar el número de animales empleados, llegando así a que 40 animales por tratamiento es un número razonable.

En todos los casos se ha tratado de minimizar el sufrimiento de los animales. Cuando los animales no fueron inyectados, o la inyección consistió en solución salina, los animales con signos saludables fueron devueltos a un lugar cercano al lugar de captura. El lugar de devolución de animales se eligió considerando que estuviera lo suficientemente lejos como para evitar recapturar a los mismos animales, pero a la vez poblado por animales de la misma especie y sin barreras geográficas evidentes más allá de la distancia, por lo que se supone que no se está forzando un flujo génico entre ambas regiones. En todos los casos donde hubo que sacrificar a los animales, el sacrificio se realizó colocándolos en frío. Por ser animales que no controlan metabólicamente su temperatura, este tratamiento implica una disminución muy rápida de la actividad metabólica del animal. Los animales “dormidos” por unas horas de esta manera pueden recuperarse y muestran una sobrevida y actividad normal.

Varios experimentos que he realizado no son presentados en esta tesis por no haber concluido satisfactoriamente en respuestas a las preguntas objetivo. Muchos de estos experimentos han implicado la realización de pruebas de inmunohistoquímica en cangrejo, que implican disección y sacrificio obligatorio de los animales. En estos casos, las disecciones fueron realizadas en animales previamente congelados para evitar el sufrimiento de los sujetos. También he realizado experimentos con roedores (rata y ratón), algunos de los cuales implicaron cirugía o inyecciones. Todos los experimentos, y mi entrenamiento, fueron realizados, al igual que en cangrejo, en condiciones que minimizan el sufrimiento de los animales así como el número de animales empleados. Cuando correspondió, los animales fueron anestesiados y sacrificados con métodos estándar en los cuales fui previamente entrenado por investigadores y técnicos experimentados. En todos los experimentos y prácticas, tanto con cangrejos como con roedores, si por motivos no previstos en el diseño experimental, algún animal mostró signos de sufrimiento o la posibilidad del mismo, fue sacrificado inmediatamente mediante los procedimientos mencionados.

III.

Resultados

Capítulo III

De los mecanismos que determinan la expresión de la memoria

Los trabajos previos de nuestro grupo de trabajo mostraron que memorias que no se expresaban a causa de un entrenamiento insuficiente o la intervención farmacológica en la consolidación por saralasin, un antagonista de receptores de angiotensina II, eran sin embargo reactivables (Frenkel et al. 2005a, 2010a). Este fenómeno sugiere que durante la consolidación se produjo una deficiencia en la expresión de largo plazo de la memoria consolidando y nos lleva a proponer la existencia de mecanismos específicos que determinan dicha expresión. El objetivo de este capítulo será verificar la reproducibilidad del fenómeno utilizando otros agentes amnésicos que nos permitan inferir en parte los mecanismos que determinan la expresión a largo plazo de la memoria. Se utilizarán drogas cuyo mecanismo de acción se ha descrito y cuyo efecto amnésico en el modelo de memoria contexto-señal ya ha sido probado. La estrategia será similar a la empleada previamente por Frenkel et al. (2005a, 2010a): una vez inducido el efecto amnésico, se recordará a los animales presentándolos con el contexto de entrenamiento en dos condiciones diferentes: sin refuerzo, de manera que se induzca la labilización de la memoria si es que esta está almacenada y se reactivó; y con una presentación del estímulo incondicionado a modo de refuerzo, de manera de no inducir labilización de la memoria (Pedreira et al. 2004). Se razona que si la amnesia resulta de una deficiencia en la expresión, pero la memoria persiste y se puede reactivar, entonces será posible evidenciar su reactivación en una evaluación posterior de la expresión si ésta es facilitada durante la reconsolidación. En caso de que se vea una mejora en la expresión de la memoria en la evaluación posterior a la reactivación, que dicha mejora se produjo por la facilitación de la reconsolidación (y no, por ejemplo, por un fenómeno de sumación) se prueba por la ausencia de facilitación en el grupo al que se le presenta un recordatorio que no labiliza la memoria.

Rol de NF- κ B en la determinación de la expresión de la memoria

Del rol de la vía de señalización de NF- κ B en la consolidación.

El entrenamiento de memoria contexto-señal en *Neohelice* induce al menos dos ventanas de activación del factor de transcripción κ B (*Nuclear Factor κ B*, NF- κ B): una ventana inicial que comienza a la media hora de iniciado el entrenamiento, cuando los animales ya transcurrieron por 10 ensayos, suficiente para generar una memoria de largo plazo, y que termina antes de las 3 horas; y una segunda ventana que se puede observar a las 6 horas

luego del entrenamiento y decae entre las 12 y 24 horas (Freudenthal y Romano 2000). NF- κ B es un factor de transcripción constitutivo que normalmente se encuentra en el citoplasma unido a una proteína inhibitoria, I κ B, que ocluye la secuencia de traslocación al núcleo. Este factor de transcripción, que se ha descrito en multitud de especies y se ha propuesto que está evolutivamente conservado (ver Huguet et al. 1997), participa en multitud de procesos en el sistema nervioso central como neuroprotección, plasticidad neuronal, respuestas inflamatorias; y ha sido relacionado con enfermedades neurodegenerativas (Mattson y Camandola 2001, Mattson y Meffert 2006). En estudios *in vitro*, la actividad de NF- κ B se ha relacionado con procesos de plasticidad neuronal, como ser potenciación y depresión de largo plazo (Albensi y Mattson 2000, Freudenthal et al. 2004). Se observó también un aumento en la activación de NF- κ B en ratas entrenadas en un condicionamiento de miedo (Yeh et al. 2002); y en ratones knock-out que no presentan NF- κ B en las sinapsis se han observado deficiencias en el aprendizaje de tareas espaciales (Meffert et al. 2003). La inhibición de la actividad de NF- κ B por medio de un oligonucleótido con la secuencia consenso de este factor o bien impidiendo la degradación de I κ B ha sido efectiva para inducir amnesia tanto en cangrejo como en ratón (Merlo et al. 2002, Freudenthal et al. 2005, Merlo y Romano 2007). También se ha propuesto un rol para NF- κ B en la extinción y en la reconsolidación de la memoria (Merlo et al. 2005, Boccia et al. 2007, Merlo y Romano 2008, Si et al. 2012, Yang et al. 2012). En *Neohelice*, NF- κ B se activa luego de dos horas de privación de agua, al igual que luego de una inyección de angiotensina II (Frenkel et al. 2002). La privación de agua puede modular durante la consolidación o la reconsolidación la expresión de largo plazo de la memoria contexto-señal (Frenkel et al. 2002, 2005a), así como la angiotensina II también tiene efectos moduladores al menos durante la consolidación (Delorenzi et al. 1995, 1996) y aumenta no sólo como consecuencia de la privación de agua sino también en condiciones de alta salinidad, que han mostrado tener un efecto facilitador de la consolidación (Delorenzi et al. 2000). La saralazina, un antagonista competitivo de receptores de angiotensina II, induce en la consolidación una deficiencia en la expresión de largo término (Frenkel et al. 2010a). Esto ha llevado a proponer que el mecanismo por el cual la privación de agua modularía la memoria sería mediante el aumento de la activación de NF- κ B. Puesto que la privación de agua estaría modificando la expresión y no el almacenamiento de la memoria contexto-señal, proponemos que NF- κ B estaría participando de la determinación de la expresión a largo plazo de la memoria contexto-señal y no de su almacenamiento. Para evaluar esta hipótesis, utilizaremos una droga inhibidora de la activación de NF- κ B: la sulfasalazina. La sulfasalazina inhibe la activación del factor de transcripción NF- κ B, por medio de la inhibición de la actividad de la proteína I κ B kinasa. En condiciones normales esta proteína puede fosforilar a I κ B, que impide la traslocación de NF- κ B al núcleo, lo que induce su degradación por proteasoma (Kaltschmidt et al. 2005). Luego de un entrenamiento en el paradigma de memoria contexto-señal, la administración de sulfasalazina en cualquiera de las dos ventanas de activación de NF- κ B, pero no fuera de éstas, induce amnesia (Merlo et al. 2002). Esta droga también ha mostrado efectos amnésicos en un paradigma de evitación pasiva en ratón (Freudenthal et al. 2005).

La metodología para evaluar esta hipótesis será similar a la que empleó previamente Frenkel et al. (2005a) para estudiar los entrenamientos débiles. Se utilizará la sulfasalazina para inducir amnesia en la consolidación, tal como fue descrito previamente (Merlo et al. 2002) y luego se evaluará la posibilidad de revertir el efecto amnésico mediante la presentación de un recordatorio. En caso de que se logre dicha reversión, se evaluará si la misma ocurre utilizando un recordatorio reforzado (con una nueva presentación del EVP). Este recordatorio no induce labilización de la memoria (Pedreira et al. 2004). El razonamiento, tal como se explicó en el capítulo I, es que si la amnesia es revertida por el recordatorio debido a que este puede inducir nuevo aprendizaje que se complemente o sume a memorias residuales que puedan haber sobrevivido al tratamiento con la droga, entonces dicha reversión debería ocurrir luego de todo tipo de recordatorio, y ser mayor cuanto mayor información aporte el recordatorio (en particular, el recordatorio reforzado). Por el contrario, si la amnesia es revertida luego de un recordatorio que labiliza la memoria, pero no luego de uno que, aún cuando reactiva un mayor número de atributos de la memoria original, no la puede labilizar, entonces la explicación más parsimoniosa del fenómeno será atribuir a la facilitación de la reconsolidación el rescate de la memoria inhibida por la sulfasalazina. En otras palabras, se concluirá que la inhibición de la consolidación por sulfasalazina no impide que se genere una predicción cuando se presenta un recordatorio, aún cuando la memoria no se exprese.

Efecto amnésico de la sulfasalazina.

Diseño experimental.

El experimento duró tres días y consistió de cuatro tratamientos experimentales (Fig. III.1, panel superior). El primer día, en la *Sesión de Entrenamiento*, dos grupos de animales fueron entrenados en el paradigma de memoria contexto-señal, tal como se describe en el capítulo II (grupos "Entrenados", *E*, 15 presentaciones del EVP con intervalo constante entre estímulos de 171 seg.), mientras que otros dos grupos de animales fueron expuestos simultáneamente al contexto de entrenamiento, pero no se les presentó el estímulo visual de peligro (grupos "Control", *C*). 15 minutos antes del entrenamiento cada par Entrenado-Control fue inyectado o bien con sulfasalazina (10mM, diluida en dimetilsulfóxido 15%, en solución salina de crustáceos, según descripción en el capítulo II, y buffer Hepes, 10mM, pH = 7,6; ajustado con HCl si necesario) (*E-sulfa*, *C-sulfa*) o bien con solución vehículo (*E-veh*, *C-veh*). La concentración de la droga y el tiempo de la inyección fueron elegidos en función de que previamente se mostró que la sulfasalazina inyectada en ese tiempo bloquea la primera ventana de activación del factor de transcripción NF-κB, necesaria para la consolidación de la memoria; mientras que una inyección luego del entrenamiento no alcanzaría a interferir con dicha ventana (Merlo et al. 2002). La memoria contexto-señal fue evaluada en la *Primera Sesión de Evaluación* y en la *Segunda Sesión de Evaluación*, a 24 y 48hs del entrenamiento,

colocando a los animales durante 10 minutos en el actómetro y presentándoles al final de este tiempo el estímulo visual de peligro una sola vez. En la primera Sesión de Evaluación, al retirar a los animales de los actómetros, se los sometió a un protocolo de privación de agua tal como se describe en el capítulo II.

Resultados.

Se analizó por separado los datos de las tres sesiones. La respuesta al primer ensayo del entrenamiento de los dos grupos E, los únicos que tuvieron una presentación del EVP, fue sometida a una prueba t que no reveló diferencias entre los tratamientos ($p = 0,41$), por lo que se asume que se partió de grupos homogéneos en su respuesta al EVP. En la Primera Sesión de Evaluación (Fig. III.1, panel inferior izquierdo), una prueba de ANOVA ($F(3,143) = 9,65$; $p < 0,0001$) con contrastes ortogonales mostró diferencias significativas entre los grupos *E-veh* y *C-veh* ($C-veh > E-veh$; $p < 0,0001$), pero no entre los grupos *E-sulfa* y *C-sulfa* ($p = 0,34$). Una prueba de Tuckey no mostró diferencias entre los grupos controles, aunque sí entre los grupos entrenados. Un resultado similar se obtuvo en la Segunda Sesión de Evaluación, en la que los contrastes ortogonales revelaron diferencias entre los grupos inyectados con vehículo ($p = 0,007$) pero no entre los grupos tratados con sulfasalazina ($p = 0,19$). La prueba de Tuckey ($F(3,143) = 3,21$; $p = 0,025$) no reveló diferencias entre los grupos controles (Fig. III.1, panel inferior derecho).

Conclusiones.

En la Primera Sesión de Evaluación, el par tratado con solución vehículo mostró buena retención de la memoria, lo que nos permite descartar efectos inespecíficos del tratamiento de inyección sobre la adquisición o retención de la memoria contexto-señal⁴⁰. Por el contrario, el par inyectado con sulfasalazina no reveló la retención de la memoria, corroborando así los efectos amnésicos previamente reportados para esta droga (Merlo et al. 2002). Los mismos resultados se repitieron en la Segunda Sesión de Evaluación, 24 horas más tarde, lo que muestra que los efectos amnésicos de la sulfasalazina persisten en el tiempo y que la memoria no reaparece como consecuencia del protocolo de evaluación aplicado en la Primera Sesión de Evaluación.

⁴⁰ Cf. nota 31 del Capítulo I.

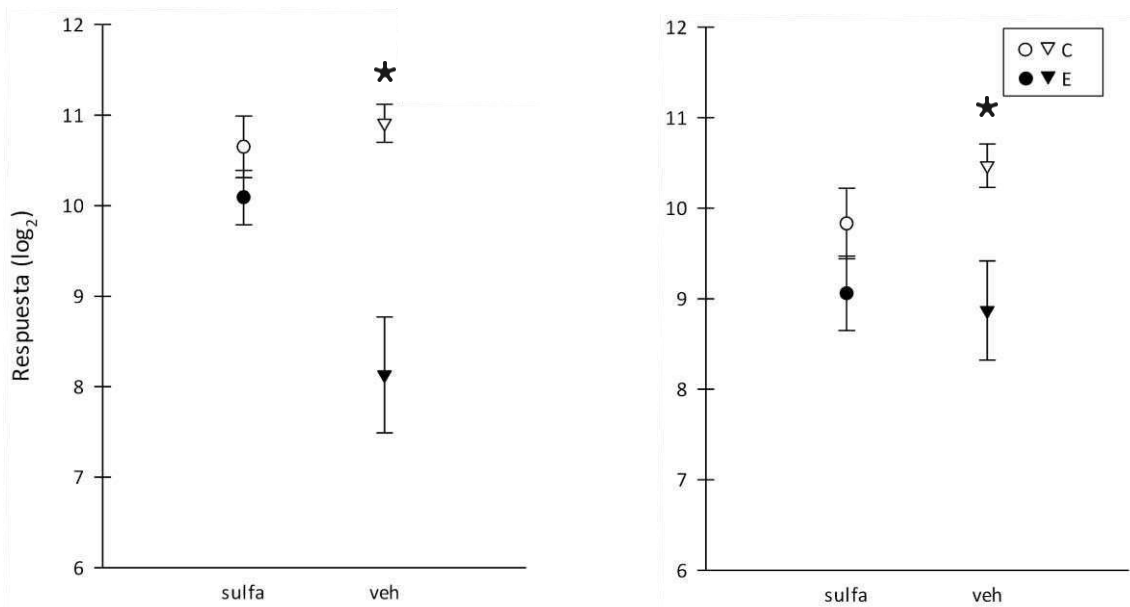
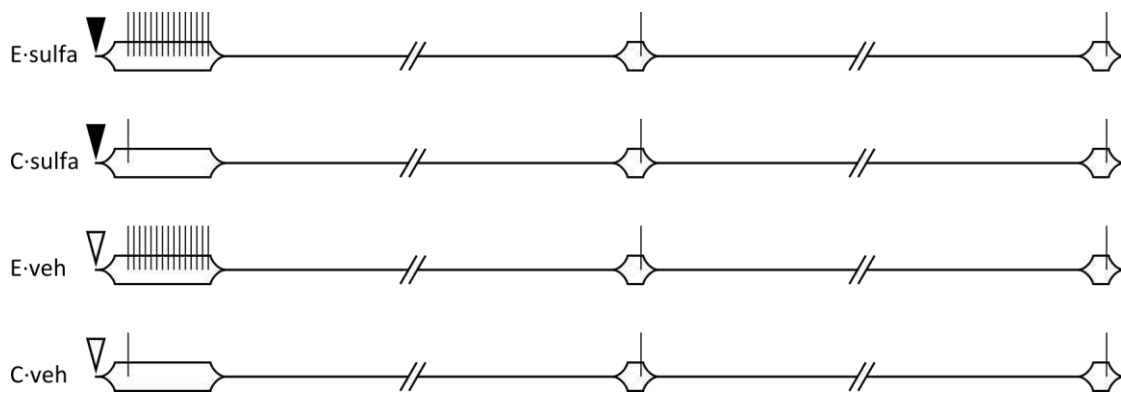


FIG III.1 Efecto amnésico de la sulfasalazina: La inyección de sulfasalazina luego del entrenamiento induce amnesia a 24 y 48 horas. Esquema superior: diseño experimental. Los ensanchamientos en la línea de tiempo representan la exposición de los animales al actómetro. Las líneas verticales representan la presentación del EVP. Las flechas verticales representan la inyección de sulfasalazina (flechas llenas) o solución fisiológica (flechas vacías). Gráficos inferiores: respuesta de los animales en la Primera Sesión de Evaluación (izquierda) y en la Segunda Sesión de Evaluación (derecha). La notación de los grupos según el texto. * representa diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos C y E correspondientes.

Efecto del tipo de recordatorio sobre la amnesia inducida por sulfasalazina.

Diseño experimental.

El experimento (Fig. III.2, panel superior) duró tres días. El primer día, la *Sesión de Entrenamiento*, fue idéntica a la del experimento anterior: dos grupos de animales fueron entrenados en el paradigma de memoria contexto-señal y otros dos grupos permanecieron en el actómetro la misma cantidad de tiempo. La única diferencia fue que esta vez todos los animales fueron inyectados con sulfasalazina (10mM, quince minutos antes del entrenamiento, al igual que en el experimento anterior). El segundo día, en la *Sesión de Reactivación*, un par de grupos control y entrenado fueron expuestos durante diez minutos al actómetro y se les presentó una vez el EVP, tal como en las sesiones de evaluación del experimento anterior (grupos *C-sulfa-R+* y *E-sulfa-R+*). El otro par de grupos también fue colocado 10 minutos en los actómetros, pero se los retiró al término de ese intervalo sin presentarles el EVP (grupos *C-sulfa-R-* y *E-sulfa-R-*). Todos los animales fueron privados de agua por dos horas luego de retirarlos del actómetro. El tercer día, en la *Sesión de Evaluación*, todos los animales fueron colocados en los actómetros y luego de diez minutos de exposición al contexto de entrenamiento, se les presentó una vez el EVP.

Resultados.

Los datos registrados en cada sesión fueron analizados por separado. En la Sesión de Entrenamiento se compararon las medias de los grupos E, los únicos a los que se presentó el EVP, con una prueba de t que no mostró diferencias significativas entre ambos ($p = 0,18$), por lo que se puede considerar que se parte de grupos homogéneos. El segundo día, en la sesión de reactivación (Fig. III.2, panel inferior izquierdo), una prueba t entre los grupos a los que se presentó el EVP reveló diferencias significativas ($C-sulfa-R+ > E-sulfa-R+$; $p = 0,036$), aunque la magnitud de efecto (diferencia entre medias: 1,08) es mucho menor que la observada en el par tratado con solución vehículo en el experimento anterior (2,78)⁴¹. El tercer día (Fig. III.2, panel inferior derecho), la respuesta de los cuatro grupos durante la evaluación fue analizada con ANOVA y contrastes ortogonales: los contrastes ortogonales no revelaron diferencias entre los grupos control y entrenado para cualquiera de los dos tipos de reactivación ($E-sulfa-R+$ vs. $C-sulfa-R+$, $p = 0,19$; $E-sulfa-R-$ vs. $C-sulfa-R-$, $p = 0,74$), ni tampoco la prueba de ANOVA encontró algún efecto de los tratamientos ($F(3,132) < 1$).

⁴¹ Nótese que la escala es logarítmica con base 2.

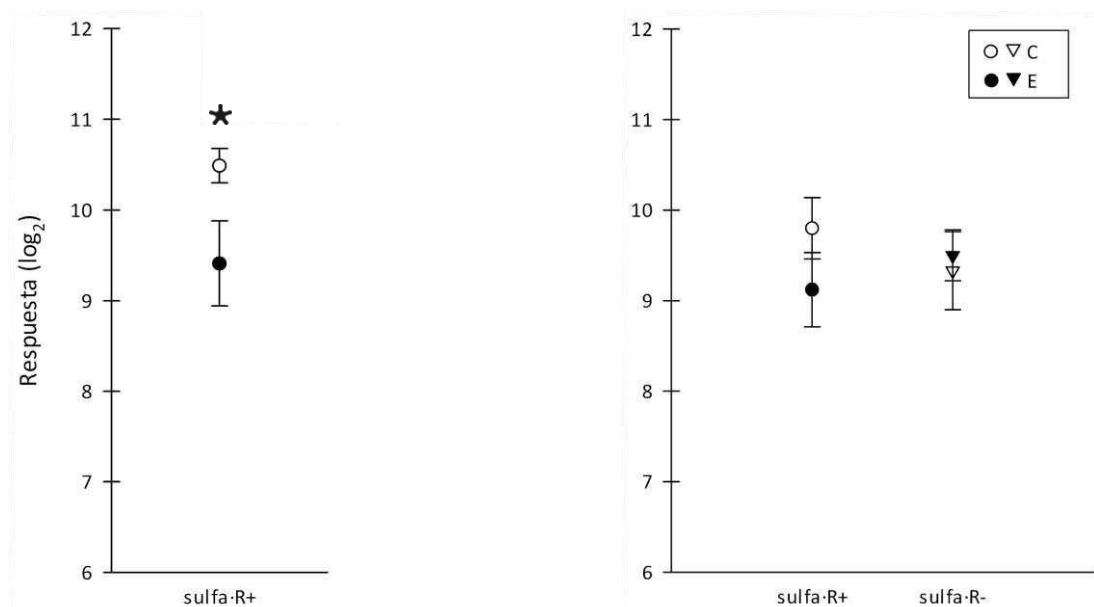
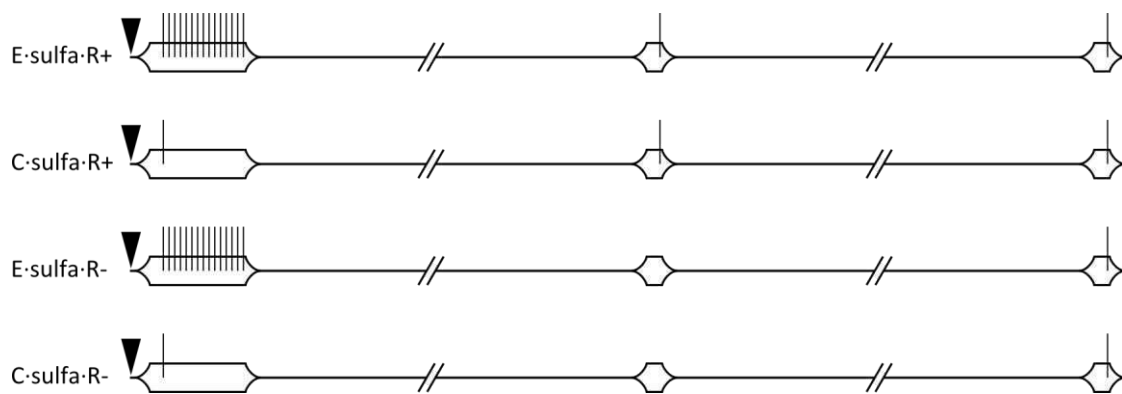


FIG III.2 Efecto del tipo de recordatorio sobre la amnesia inducida por sulfasalazina: La inyección de sulfasalazina luego del entrenamiento induce amnesia a 48, pero no 24 horas, y no es afectada por la presentación de un recordatorio sin refuerzo. Esquema superior: diseño experimental (ídem la figura anterior). Gráficos inferiores: respuesta de los animales en la Sesión de Reactivación (izquierda) y en la Sesión de Evaluación (derecha). La notación de los grupos según el texto. * representa diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos C y E correspondientes.

Conclusiones.

A diferencia del experimento anterior, esta vez la sulfasalazina no indujo amnesia a las 24 horas. Sin embargo, sí se pudo detectar el efecto amnésico en la evaluación a 48 horas. La retención a 24 horas parece menor de lo que se esperaría si los animales no hubiesen sido tratados; sin embargo, una comparación directa entre animales de distintos experimentos, que corresponden a distintas capturas de cangrejos, no es del todo conveniente ya que estas diferencias podrían deberse a otros factores que no se están considerando. A las 48 horas, la amnesia se observa tanto en el grupo que fue presentado con un refuerzo como en el que no, por lo que se puede concluir que no hubo un efecto del tipo de recordatorio, como se hubiese esperado si un recordatorio sin refuerzo indujese la labilización de la memoria y permitiese revertir la amnesia por un proceso de reconsolidación. De haber obtenido el resultado predicho, es decir el rescate del efecto amnésico, el que dicha amnesia fuera parcial durante la reactivación, es decir que hubiera una expresión parcial de la memoria, no permitiría sacar conclusiones acerca de la posibilidad de reactivar una memoria que no se expresa luego del tratamiento con la droga. Sin embargo, dado que la amnesia no se revirtió, se podría concluir que la deficiencia inducida por la sulfasalazina no se puede explicar solamente como una deficiencia de expresión.

Dado que el efecto de la droga fue parcial a 24 horas, a diferencia de lo observado en el experimento anterior, se optó por repetir el experimento para verificar la reproducibilidad del fenómeno observado.

Efecto del tipo de recordatorio sobre la amnesia inducida por sulfasalazina.

Réplica.

En este experimento, se buscó replicar el resultado del experimento anterior. Puesto que en dicho experimento la actividad de los animales en el primer ensayo del entrenamiento fue un poco más baja (aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa) en el grupo entrenado que no tuvo efecto amnésico, se decidió reducir cualquier posible efecto sobre la varianza de los animales que pudiese verse reflejado en ese primer ensayo y que pudiese producir alguna tendencia en los valores. Para ello, todos los animales fueron presentados con un EVP antes del entrenamiento, y luego se los distribuyó en los distintos tratamientos experimentales de manera de forzar la homogeneidad en ese ensayo. Esta técnica, conocida como bloqueo, tienen una serie de consecuencias sobre el análisis (se elimina parte de la varianza entre animales) que no se consideraron en el análisis actual de los datos, que se prefirió realizar de manera idéntica al del experimento anterior. Esto podría producir un ligero, espurio incremento en la razón entre varianzas calculada en el análisis de ANOVA.

Diseño experimental.

El experimento se realizó de manera idéntica al anterior con la salvedad de que, antes del entrenamiento de 15 ensayos, todos los animales recibieron un ensayo adicional (el único que recibieron los controles en la Sesión de Entrenamiento; Fig. III.3, panel superior). Los animales se distribuyeron en los distintos grupos de manera de asegurar que la respuesta media de cada tratamiento a ese único ensayo fuese similar. Para ello, en cada corrida experimental se ordenaron los valores de actividad de todos los animales y se asignó de manera sistemática un animal a cada tratamiento en un orden predeterminado (descendente). En cada corrida, se alteró el orden de los tratamientos, de manera de distribuir los sesgos propios de cada corrida (el primer tratamiento siempre obtiene los valores más altos de cada bloque). En todo lo demás (droga, tipo de reactivación, etc.), la metodología fue la misma que se describió en el experimento anterior. Las denominaciones de los grupos serán las mismas utilizadas en el experimento anterior.

Resultados.

Una prueba de t entre los grupos E en el primer ensayo del entrenamiento en la Sesión de Entrenamiento no revela diferencias significativas ($p = 0,09$). En la Sesión de Reactivación (Fig. III.3, panel inferior izquierdo), una prueba de t entre los dos grupos a los que se presentó el recordatorio no llegó a revelar diferencias significativas ($p = 0,059$) con un $\alpha = 5\%$, sin embargo este valor se encuentra en el límite y la diferencia entre medias (1,03) es bastante similar a la del experimento anterior⁴². El tercer día, en la Sesión de Evaluación (Fig. III.3, panel inferior derecho), una prueba de ANOVA no reveló ningún efecto de los tratamientos ($F(3,124) = 1,08$; $p = 0,36$). Los contrastes ortogonales tampoco revelaron retención de la memoria al comparar los grupos entrenados con sus respectivos controles ($E\cdot sulfa\cdot R+$ vs. $C\cdot sulfa\cdot R+$: $p = 0,46$; $E\cdot sulfa\cdot R-$ vs. $C\cdot sulfa\cdot R-$: $p = 0,11$).

Conclusiones.

Los resultados obtenidos en esta réplica fueron similares a los del experimento anterior. Esta vez, el criterio de memoria definida operacionalmente falló en revelar la memoria en la evaluación a 24 horas luego del entrenamiento. Sin embargo, puesto que este es un criterio en base a un umbral arbitrario para la prueba estadística⁴³, y el valor obtenido se encuentra en el

⁴² Téngase en cuenta que, al haber homogenizado la respuesta a un ensayo pre-entrenamiento, el efecto esperado es eliminar parte de la varianza no explicada por los tratamientos, y por lo tanto, debería aumentar la potencia de la prueba.

⁴³ El umbral del 5% es un criterio que tuvo sentido en épocas en que, al necesitar de tablas para evaluar la significancia de una prueba estadística, se debía trabajar en base a umbrales establecidos a priori. Hoy día, con la potencia computacional moderna que permite calcular los valores p exactos, este criterio tal vez deba considerarse anacrónico y se deba optar por un análisis más exacto basado tanto en el valor de p

límite, lo más razonable es tomar una posición conservadora y considerar que, si bien no se puede afirmar categóricamente que los animales muestren retención de lo aprendido, tampoco es válido considerar que no hubo expresión de la memoria. En este caso se debe considerar la posibilidad de que haya habido una amnesia parcial, es decir, que si bien hubo una deficiencia en la expresión del comportamiento típico de la memoria contexto-señal, esta deficiencia podría no ser completa. Otra vez se falló en encontrar recuperación del efecto amnésico y la amnesia al tercer día se mostró total, aun cuando pudiese haber habido un cierto grado de reactivación de la traza mnésica durante la Sesión de Reactivación.

Es notorio que la diferencia entre medias en el primer ensayo en este experimento (0,51) fue la misma que en el experimento anterior (0,56) y sin embargo la significancia aumentó bastante (el p-value disminuyó a la mitad). Este efecto es atribuible a la importante reducción en la varianza dentro de los tratamientos ($\text{Var}[E\cdot\text{sulfa}\cdot R+] = 2,44$; $\text{Var}[E\cdot\text{sulfa}\cdot R-] = 1,59$; contra 3,02 y 2,88 respectivamente en el experimento anterior). Este efecto puede ser atribuible a varios factores, o incluso a una combinación de los mismos: variaciones entre los esfuerzos de captura o condiciones particulares de cada experimento, que los animales hayan tenido un ensayo previo o a la homogenización de grupos producida por la selección realizada en el ensayo previo. Como se indicó, el análisis de este experimento está forzado a imitar el del anterior aún a sabiendas de que se realizó un bloqueo, y eso impone limitaciones a tener en cuenta al sacar conclusiones. Sin embargo, este método de bloqueo ha sido utilizado en otros trabajos del laboratorio y la posibilidad de que los efectos del mismo pesen tanto en la varianza dentro de los grupos (que, de hecho, es el objetivo de esta preselección) debería tenerse en cuenta y sería conveniente realizar análisis de interacción que validen su uso.

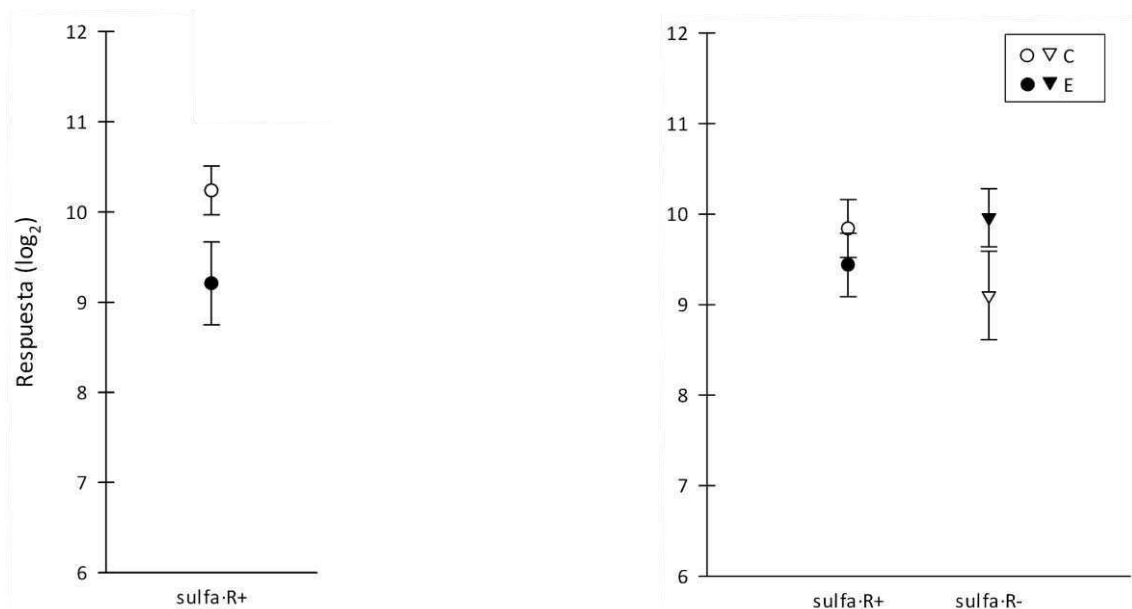
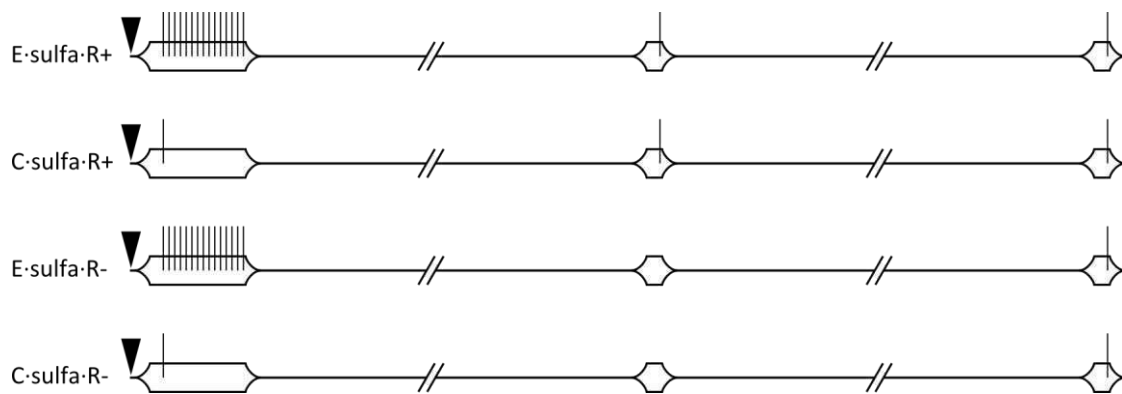


FIG III.3 Efecto del tipo de recordatorio sobre la amnesia inducida por sulfasalazina.

Réplica: La inyección de sulfasalazina luego del entrenamiento induce amnesia a 48, pero no 24 horas, y no es afectada por la presentación de un recordatorio sin refuerzo, tal como ocurrió en el caso mostrado anteriormente. Esquema superior: diseño experimental (idem las figuras anteriores). Gráficos inferiores: respuesta de los animales en la Sesión de Reactivación (izquierda) y en la Sesión de Evaluación (derecha). La notación de los grupos según el texto. * representa diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos C y E correspondientes.

Conclusiones: Rol de NF- κ B en la determinación de la expresión de la memoria.

Un recordatorio capaz de labilizar la memoria contexto-señal, contrario a la predicción inicial, no pudo impedir el efecto amnésico inducido por sulfasalazina, un inhibidor de la activación del factor de transcripción κ B. El efecto de la reactivación se evaluó a las 48 horas post-entrenamiento, un tiempo para el que se había descrito el efecto amnésico de la sulfasalazina. Sin embargo, la evaluación inicial a las 24 horas, el momento en que se aplicó el recordatorio, mostró resultados variables entre experimentos: mientras que en uno de los experimentos se observó una amnesia completa, en otros dos el efecto fue parcial. En caso de haber obtenido el resultado predicho, es decir en caso de haber observado una expresión intacta de la memoria a 48 horas, esta expresión parcial hubiese invalidado una interpretación inequívoca siguiendo la línea de razonamiento planteada inicialmente. El objetivo es evaluar la posibilidad de recuperar una memoria que no se expresa, lo que probaría una disociación entre mecanismos de reactivación y de expresión. En caso de que la memoria se exprese, aunque sea de manera parcial, la recuperación del efecto amnésico podría ser trivialmente explicada por ejemplo por los modelos clásicos de deficiencias en el almacenamiento (Gold et al. 1973). En ese caso, hubiese sido necesario repetir los experimentos realizando la primera sesión de evaluación a 48 horas y la segunda sesión un día después. Sin embargo, puesto que el efecto encontrado fue el contrario, es decir no hubo recuperación de la memoria y ello pese a que la memoria se expresó parcialmente durante la reactivación, se rechaza la hipótesis inicial.

Rol de la señalización muscarínica en la determinación de la expresión de la memoria

De la actividad colinérgica muscarínica y la expresión de la memoria.

Uno de los sistemas de neurotransmisión más estudiados en memoria es el sistema colinérgico muscarínico. Gran parte del interés en este sistema se debe a que se atribuye a las deficiencias en la transmisión muscarínica parte de la sintomatología de la enfermedad de Alzheimer, así como deficiencias cognitivas asociadas con la vejez (Coyle et al. 1983). Una de las drogas más utilizadas para estudiar este sistema es la escopolamina, un antagonista competitivo de receptores muscarínicos, también conocida como hyoscina o burundanga, siendo este último el nombre más popular con el que se la denomina, sobre todo en referencia a usos delictivos. En particular, muchos autores llegan a emplear esta droga en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer, aunque la validez de estos modelos es muy discutida puesto que tanto la enfermedad de Alzheimer como los síntomas seniles suelen ir acompañados por deficiencias en otros sistemas de transmisión cuya interacción con el

sistema muscarínico tiene probados efectos en la memoria (Decker y McGaugh 1991, Cole et al. 1994).

Se ha propuesto que la escopolamina afecta la adquisición de la memoria y, en dosis muy altas, la consolidación. Esta propuesta se basa principalmente en que las dosis efectivas cuando se inyecta esta droga antes o después del entrenamiento difieren en varios órdenes decimales de magnitud. En un paradigma de evitación pasiva en ratas, dosis de 0,03 $\mu\text{g/g}$ son efectivas para inducir amnesia cuando son inyectadas antes del entrenamiento, mientras que las dosis efectivas post-entrenamiento oscilan entre los 10 y 30 $\mu\text{g/g}$ (Rush 1988). Incluso los efectos de dosis muy altas post-entrenamiento pueden ser muy parciales, al punto de que los criterios de detección clásicos (un techo de 300seg en el paradigma de evitación pasiva) pueden ser insuficientes para detectarlos (Glick y Zimmerberg 1972, Glick y Greenstein 1972, Rush 1988). También se ha visto que la inyección pre-entrenamiento modifica el desempeño en la adquisición de entrenamientos de varios ensayos y la droga no tiene efectos amnésicos a largo plazo cuando el entrenamiento se realiza "a criterio", es decir, se continúa entrenando al animal hasta que alcance el desempeño de un grupo control inyectado con solución vehículo (Decker et al. 1990a). Esto, sumado a que en humanos se han verificado efectos de la droga a corto plazo en la atención (Dunne y Hartley 1986), ha llevado a proponer que la inyección previa al entrenamiento impediría adquirir la información propiamente, pero una vez adquirida (ya sea porque la droga se inyectó después o como resultado de un entrenamiento extendido) ésta se retendría intacta en el tiempo. Dosis muy altas, sin embargo, actuarían sobre la consolidación de la memoria. Esta diferencia podría radicar en que los efectos sobre la consolidación de una deficiencia parcial del sistema muscarínico fuesen compensadas por la acción de otros sistemas. En particular, los efectos de la escopolamina tanto en el desempeño en una evaluación de largo plazo (24 horas), así como en el olvido, se potencian en combinación con deficiencias en el sistema noradrenérgico (Decker y McGaugh 1989, Decker et al. 1990b). La actividad noradrenérgica en hipocampo mediaría los efectos facilitadores de muchas situaciones estresantes, producidos a través de la acción de sistemas moduladores extrínsecos (Cahill y McGaugh 1996). En particular, los efectos facilitadores producidos por un aumento de la actividad de glucocorticoides estarían mediados por la amígdala (Roosendaal y McGaugh 1997, Roosendaal et al. 2006a, 2006b, McGaugh et al. 1996), y se ha probado que la inyección de escopolamina directamente en la amígdala puede impedir la facilitación producida por la inyección de agonistas de glucocorticoides inyectados sistémicamente (Power et al. 2000). Por lo tanto, proponemos que estos efectos son sobre la expresión de largo plazo de la memoria. Por otro lado, el agonismo de la actividad colinérgica mediada por receptores muscarínicos durante la consolidación produce efectos facilitadores sobre la memoria a largo plazo (Baratti et al. 1979). Postulamos entonces que el sistema colinérgico muscarínico actúa durante la consolidación de la memoria determinando la expresión a largo plazo de la memoria almacenada. Por lo tanto, las amnesias inducidas por escopolamina post-entrenamiento serán reversibles si reactivan por la presentación de un recordatorio no reforzado, mientras que un recordatorio con refuerzo no tendrá ningún efecto facilitador. Por el contrario, la amnesia

inducida por escopolamina pre-entrenamiento no será reversible. Esta droga ha sido utilizada previamente en el modelo de memoria contexto-señal en *Neohelice*, y ha mostrado efecto amnésico tanto al ser administrada pre- como post-entrenamiento. Las dosis efectivas fueron sin embargo las mismas en ambos puntos, aunque no se realizó una curva dosis respuesta para la inyección pre-entrenamiento (Berón de Astrada y Maldonado 1999). Si bien las dosis efectivas en *Neohelice* son menores que en roedores, debe considerarse que la biodisponibilidad en estos modelos difiere en función de que el cangrejo posee un sistema circulatorio semi-cerrado y carece de barrera hematoencefálica. Por regla general, las dosis efectivas en este modelo suelen ser mucho menores que en otros modelos (cf. la discusión final en el artículo de Berón de Astrada y Maldonado 1999).

Diseño experimental.

El experimento duró tres días y consistió de cuatro tratamientos experimentales denominados *E·scp·R+*, *C·scp·R+*, *E·scp·R-*, *C·scp·R-* (Fig. III.4, panel superior). El primer día se realizó la *Sesión de Entrenamiento*, en la que dos grupos de animales fue entrenados (grupos “Entrenados”, *E*, 15 presentaciones del EVP con intervalo constante entre estímulos de 171 seg.) y los animales de otros dos grupos tuvieron un entrenamiento control (grupos “Control”, *C*), que consistió en una sola presentación del EVP simultánea a la primera del grupo entrenado para establecer los valores basales de respuesta, y permanecieron en el contexto de entrenamiento el resto del tiempo sin recibir nuevas presentaciones del EVP. Inmediatamente luego de la sesión de entrenamiento, todos los animales fueron inyectados con 50 µl de escopolamina diluida en solución salina ($10^{-4}M \approx 0,1 \mu g/g$). Se eligió esta dosis por ser la más alta cuyo efecto amnésico fue descrito en *Neohelice*, siendo además que con una dosis 10 veces menor se observó un efecto amnésico completo (Berón de Astrada y Maldonado 1999). Luego de la inyección, los animales permanecieron en cajoneras hasta la siguiente sesión, 24 hs después. El segundo día (*Sesión de Reactivación*), todos los animales fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento. Un par de grupos E-C fue expuesto al contexto y luego retirados de los actómetros (grupos sin refuerzo, *R-*), mientras que los otros dos grupos fueron expuestos al contexto por 5 minutos y recibieron una presentación del EVP al final de esta exposición (grupos con refuerzo, *R+*). Todos los animales fueron privados de agua durante dos horas inmediatamente después de la sesión de reactivación. El tercer día, en la *Sesión de Evaluación*, todos los animales fueron colocados en el actómetro y recibieron una presentación del EVP. Se registró la actividad de los animales durante todas las presentaciones del EVP.

Resultados.

Los datos fueron analizados por separado para cada una de las tres sesiones. En el primer ensayo del entrenamiento, una prueba de ANOVA no reveló un efecto de los diferentes tratamientos ($F(3,132) < 1$), lo que indicaría que se parte de grupos homogéneos. Durante la reactivación (Fig. III.4, panel inferior izquierdo) una prueba de t entre los únicos dos grupos a los que se presentó el EVP (E·scp·R+, C·scp·R+) no reveló efecto de los tratamientos ($p = 0,27$). Sin embargo, en la Sesión de Evaluación (Fig. III.4, panel inferior derecho) una prueba ANOVA seguida de contrastes ortogonales entre los grupos entrenados y controles, mostró un efecto del tipo de entrenamiento sólo para aquellos grupos que no recibieron una presentación del EVP en la sesión de Reactivación (E·scp·R+ \approx C·scp·R+, $p = 0,18$; E·scp·R- < C·scp·R-, $p < 0,002$). Comparaciones a posteriori entre los distintos tratamientos usando el método de Tuckey no revelaron diferencias entre los grupos, en particular entre los controles ($F(3,132) < 0,005$; C·scp·R+ \approx C·scp·R-, $p > 0,05$).

Conclusiones.

En la Sesión de Reactivación no se observaron diferencias entre el grupo entrenado y su control, lo que muestra el efecto amnésico de la escopolamina. Sin embargo, al día siguiente sí se pudo observar una diferencia entre el grupo entrenado y su control, indicativa de expresión de la memoria, solamente en aquellos animales que durante la Sesión de Reactivación fueron presentados con un recordatorio sin refuerzo. Los animales presentados con un recordatorio reforzado no mostraron memoria en la Sesión de Evaluación. Todos los animales comenzaron el experimento con niveles de respuesta similares y no se ha podido observar ningún efecto de los distintos tipos de recordatorio en los grupos controles. Esto indicaría que la diferencia entre Entrenado y Control observada en los grupos R- corresponde a la expresión de la memoria contexto-señal y permite descartar otros efectos de la presencia o ausencia del refuerzo, como la sensibilización de la respuesta de congelamiento o bajos niveles de respuesta como consecuencia del estrés.

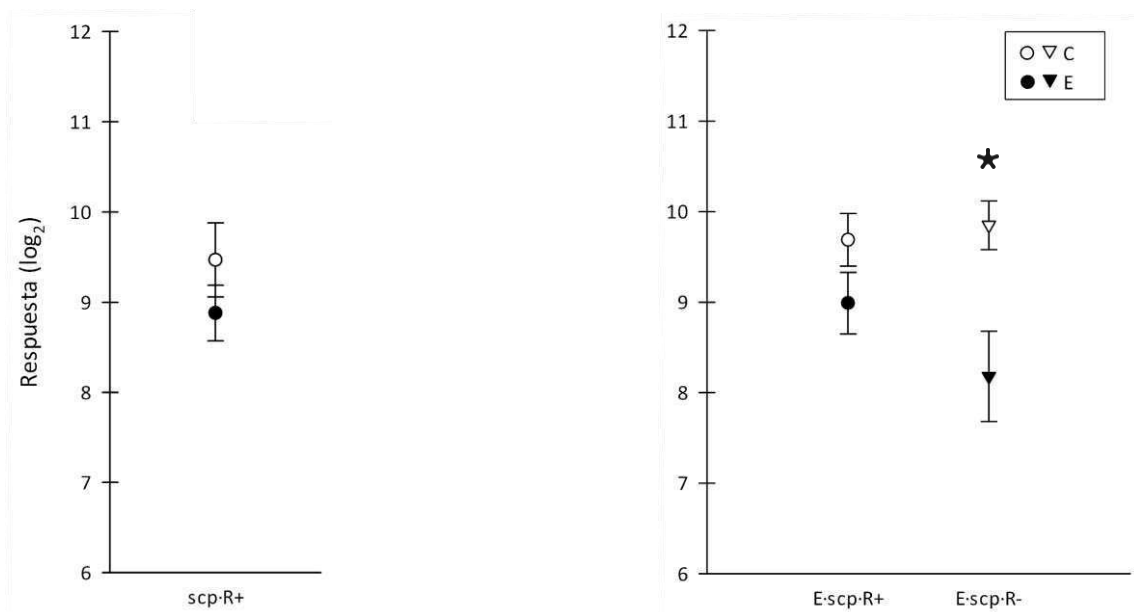
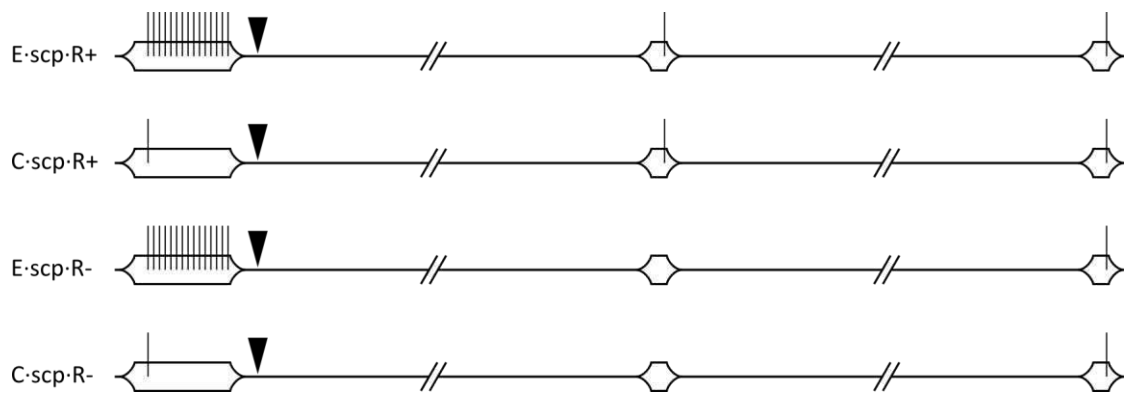


FIG III.4 Efecto del tipo de recordatorio sobre la amnesia inducida por escopolamina: La inyección de escopolamina luego del entrenamiento induce amnesia a 24 y 48, que se revierte por la presentación de un recordatorio sin refuerzo. Esquema superior: diseño experimental (ídem las figuras anteriores). Las flechas llenas representan inyección de escopolamina. Gráficos inferiores: respuesta de los animales en la Sesión de Reactivación (izquierda) y en la Sesión de Evaluación (derecha). La notación de los grupos según el texto. * representa diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos C y E correspondientes.

Conclusiones: Rol del sistema muscarínico en la expresión de la memoria.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis propuesta: la amnesia inducida por escopolamina post-entrenamiento fue revertida por un recordatorio, lo que indicaría que esta droga causó una deficiencia en la expresión de la memoria, pero no impidió el almacenamiento de la representación de la asociación entre el contexto y el EVP ni impidió el acceso a esta representación, que fue reactivada, y pudo reconsolidar sólo cuando se frustró la predicción. Esta hipótesis se continuó evaluando en una serie de trabajos que realicé junto con Pedro Caffaro. Puesto que están publicados en otro informe (Caffaro 2011) los resultados no se mostrarán aquí, pero se describirán brevemente para complementar la discusión de los resultados obtenidos. Los detalles de cada experimento están descritos en la tesina de grado de Pedro Caffaro (2011) y en formato de “paper” (Caffaro et al. 2012). En una serie de experimentos utilizando el paradigma de Condicionamiento Contextual Pavloviano⁴⁴ se replicó el resultado obtenido en el modelo de memoria contexto-señal: la misma dosis (0,1 µg/g) de escopolamina post-entrenamiento generó amnesia cuando los animales fueron evaluados a 24 horas, pero esta amnesia se revirtió en el grupo reactivado sin un refuerzo, mientras que se mantuvo en el grupo al que se presentó un refuerzo en la sesión de reactivación. Por otro lado, se repitió el experimento inyectando la misma dosis de droga inmediatamente antes del entrenamiento. Los resultados obtenidos replicaron lo observado para la amnesia inducida por la inyección post-entrenamiento. Con inyección pre-entrenamiento se realizó una serie de controles adicionales: en paralelo a un grupo inyectado con escopolamina, otro grupo fue inyectado con solución salina, y ambos fueron evaluados (con un refuerzo) a 24 y 48 horas. Este experimento verificó la necesidad de la droga para observar el efecto amnésico en ambas evaluaciones. Contrario a lo observado previamente en *Neohelice* (Berón de Astrada y Maldonado 1999) y a lo descrito en un paradigma de evitación pasiva en ratón (Decker et al. 1990a), no se encontraron diferencias en la curva de adquisición al comparar con el grupo inyectado con vehículo. También se verificó la necesidad del recordatorio empleando un grupo de animales al que no se le presentó el contexto recordatorio a 24 horas, sino que se los colocó en un recipiente diferente para asegurar una manipulación similar (ver discusión sobre controles clásicos de reconsolidación al final del capítulo I). Puesto que, en oposición a lo predicho, se observó reversión del efecto amnésico también para la inyección pre-entrenamiento, podría proponerse que, por algún artefacto del experimento que no se controló adecuadamente, el comportamiento propio de la memoria contexto-señal emerge siempre que se aplique una reactivación sin refuerzo, independientemente del tipo de amnesia producida. Proponemos que sólo aquellas amnesias producto de una deficiencia en la expresión de la

⁴⁴ Este paradigma que, momentáneamente y para simplificar la discusión en esta sección, podríamos describirlo como una variante del paradigma de memoria contexto-señal, se describe con detalle en el capítulo II: Metodología y Diseño Experimental y en el capítulo IV. La elección de uno u otro paradigma es caprichosa y las diferencias entre ambos no afectan el razonamiento propuesto, por lo que las predicciones son indistintas para ambos modelos. Las similitudes entre ambos modelos están descritas en otros trabajos (Carbó Tano 2013, Fustiñana 2013, Fustiñana et al. 2013).

memoria deberían poder revertirse mediante este protocolo. Otras amnesias, que sí se deben a fallas en el almacenamiento o a la imposibilidad de acceder a la información, no deberían ser reversibles. Esto se ha verificado para el caso de la sulfasalazina descrito en este capítulo y para el efecto amnésico de la cicloheximida, un inhibidor de síntesis proteica (Frenkel et al. 2010a). Sin embargo, se trató de verificar este efecto específicamente para la escopolamina. Para ello, se trató a los animales con dosis mucho más altas (5 µg/g) de droga. El razonamiento fue que estas dosis más elevadas podrían causar efectos inespecíficos y que eventualmente afectarían otros procesos, entre ellos los necesarios para la persistencia de la memoria. Tanto en el caso de la inyección pre- como post-entrenamiento no se observó reversión de la amnesia causada por dosis altas de escopolamina. En ambos casos las curvas de adquisición fueron indistinguibles de las de un grupo tratado con solución vehículo.

Discusión del Capítulo III.

En este capítulo se estudió el efecto amnésico de dos drogas diferentes: sulfasalazina, un inhibidor de la activación de NF-κB, y escopolamina, un antagonista competitivo de receptores muscarínicos de acetilcolina. En función del aumento de actividad de NF-κB producido por un protocolo de privación de agua o por una inyección de angiotensina II, se propuso que los efectos facilitadores de estos tratamientos estarían mediados por la actividad de NF-κB (Frenkel et al. 2002, Romano et al. 2006a). La privación de agua modula durante la consolidación la expresión de largo plazo de la memoria (Frenkel et al. 2005a), al igual que la actividad angiotensinérgica (Frenkel et al. 2010a) que, se ha propuesto, mediaría los efectos facilitadores del estrés hídrico (Frenkel et al. 2002, 2005a). Partiendo de esta base, propusimos que NF-κB no participa de la formación de una representación interna de la asociación entre el contexto de entrenamiento y el EVP sino que determina, durante la consolidación de esta memoria, la capacidad de expresarse en el largo plazo. Los resultados obtenidos, sin embargo, nos llevan a rechazar esta hipótesis. Aún cuando hubo cierto grado de expresión de la memoria –y por lo tanto ocurrió necesariamente la reactivación de la misma– al ser presentados los animales con un recordatorio, la amnesia inducida por la sulfasalazina fue completa el último día. Aún cuando la amnesia fue parcial el segundo día, la interpretación del resultado obtenido en la última evaluación no se ve afectada por ello. Los experimentos previos publicados con esta droga en *Neohelice* realizaron las evaluaciones a no menos de 48 horas. En otros paradigmas se han descrito tratamientos amnésicos que tardan más de un día en desarrollarse, e incluso muestran características comportamentales complejas que sugieren algún tipo de “consolidación” del efecto amnésico. Casualmente, esta situación se observó en un caso de amnesia inducida por MK-801 (Solntseva y Nikitin 2010), un bloqueante de receptores de NMDA, el mismo tipo de receptores que induciría la activación de NF-κB (Meffert et al. 2003).

La sulfasalazina es un inhibidor de una vía de señalización que se inicia con la entrada de calcio en las sinapsis y culmina con la activación de NF- κ B por la degradación de I κ B (éste es el paso que inhibe sulfasalazina). NF- κ B se localiza en botones sinápticos y se ha propuesto que, además de sus funciones como iniciador de la transcripción, podría estar involucrado en mecanismos de señalización sinapsis-núcleo-sinapsis necesarios para la especificidad del tránsito de proteínas hacia la sinapsis durante fenómenos de plasticidad sinápticos como la potenciación de largo término (Meberg et al. 1996, Freudenthal y Romano 2000, Salles et al. 2012, Salles et al. 2014). Estos fenómenos plásticos han sido propuestos como mecanismos para la fijación de memorias, aunque también se ha sugerido que podrían participar en otros procesos que afectarían la saliencia de procesos neurales, afectando la fijación de manera indirecta (Shors y Matzel 1997), y bien podría participar en la determinación de la expresión a largo plazo de las memorias almacenadas. Los resultados de los experimentos con sulfasalazina de este capítulo no permiten descartar un rol de NF- κ B en la determinación de la expresión de largo plazo de la memoria. Podemos afirmar que la deficiencia en la expresión de la memoria producida por la inhibición de la actividad de este factor implica algún tipo de deficiencia o bien en la persistencia o bien en aspectos de la recuperación de la memoria diferentes a su capacidad de expresarse, como por ejemplo el acceso a la memoria almacenada. Sin embargo es posible que exista también un componente de plasticidad mediada por NF- κ B involucrado en la determinación de la expresión de largo plazo de la memoria. Por ejemplo, es posible que el incremento en actividad de NF- κ B inducido por la activación del sistema angiotensinérgico participe de la plasticidad de circuitos que determinan la expresión de las memorias contingentes a la activación de este sistema. En caso de que un mecanismo que participe de la determinación de la capacidad de expresar una memoria; participe también de la persistencia de, o la capacidad de acceder a, dicha memoria, será imposible demostrar con esta metodología la participación de dicho mecanismo en la expresabilidad de la información puesto que dicha información no existirá o no será accesible.

En la segunda parte de este capítulo, se estudió la amnesia inducida por escopolamina, un bloqueante de receptores muscarínicos. Esta amnesia se pudo revertir utilizando un recordatorio que induce labilización de la traza de memoria, pero no cuando se empleó un recordatorio que no lo hace. En función de esto, concluimos que la escopolamina no interfirió con la adquisición de la memoria o con su persistencia. Si hubiese sido éste el caso, no hubiese habido una memoria que reactivar. Este argumento, que se utilizó repetidas veces para argumentar en contra de la interpretación de amnesias experimentales como deficiencias en el almacenamiento, suele ser rechazado argumentando que nuevos aprendizajes pueden explicar el comportamiento en la sesión de evaluación, en particular el reentrenamiento o nuevas memorias que se suman a trazas residuales que sobrevivieron al tratamiento amnésico. Sin embargo, en nuestro experimento, el grupo de animales explícitamente reentrenado no mostró una reversión del efecto amnésico. El rescate de la expresión de la memoria en nuestro experimento no correlaciona con la presencia de un recordatorio, sino con la capacidad de éste

de labilizar la traza mnésica. En otras palabras, podemos afirmar que fue la reelaboración de la memoria reactivada lo que permitió recuperar su expresión luego del tratamiento amnésico y, por lo tanto, que necesariamente existe una memoria reactivable que sobrevive al tratamiento amnésico. También proponemos que la escopolamina no impidió el acceso a la traza de memoria durante la presentación del recordatorio. Se ha propuesto que, como resultado de ciertos tratamientos amnésicos, sobreviven trazas de memoria “disponibles” pero no “accesibles” (Tulving y Pearlstone 1966). Durante la consolidación de la memoria no sólo se elaboraría la información a almacenar, sino que también se formarían las “vías de recuperación”, es decir se prepararía el sistema para que esa información pueda ser recuperada a partir de los estímulos recordatorios adecuados (Lewis 1969). Si un tratamiento amnésico interfiriese con estas vías de recuperación, la información almacenada no sería recuperada a partir de los estímulos recordatorios que sí la evocarían en una situación no amnésica. En estos casos, un reentrenamiento completo o la presentación de algunas de las claves recordatorias no permitirían reactivar inmediatamente la memoria pero sí permitirían reelaborar las vías de recuperación (Sara 1973, Sara et al. 1975). Esta explicación tampoco se adecúa a nuestros resultados puesto que la mera presencia del recordatorio debería ser suficiente para producir el rescate de la expresión de la memoria; y cuanto más completo sea el recordatorio, mayor eficiencia debería tener como recuperador de la memoria amnésica (Deweer y Sara 1985). Sin embargo, que la traza de memoria que persiste luego del tratamiento amnésico es accesible se demuestra puesto que el rescate de la expresión de la memoria depende críticamente de que el recordatorio genere una predicción que se frustre. Evidentemente, un error de predicción requiere de la realización previa de la predicción que se frustra, y por lo tanto ha sido necesario el acceso a la traza de memoria y a la información contenida en la misma (la representación interna del mundo), que no fue expresada comportamentalmente, pero sí en algún tipo de evaluación interna que determinó la labilización y reconsolidación de la memoria.

En muchas ocasiones los efectos amnésicos descritos para dosis muy altas de escopolamina post-entrenamiento se reflejan sólo cuando se ajustan los criterios de detección del paradigma experimental, como al correr el techo de cuantificación de la latencia a cruzar a un compartimento peligroso en un paradigma de evitación pasiva (Glick y Zimmerberg 1972, Glick y Greenstein 1972, Rush 1988). Esto resulta significativo porque si bien estos experimentos revelan que la escopolamina afectó la memoria, el enunciado de que ésta no se almacenó correctamente resulta complicado de sostener en vista de que el animal comienza la evaluación mostrando retener lo aprendido. Una reinterpretación, que se adecua más a la evidencia presentada en este capítulo, es que una memoria intacta comienza expresándose y dicha expresión se modifica durante la evaluación. Sería la interacción entre la expresabilidad de la memoria, determinada durante la consolidación, y la información contenida por el recordatorio (interacción que evoluciona con el tiempo de exposición al recordatorio, cf. Sara et al. 1975) lo que determina los cambios en la expresión de la memoria durante la evaluación.

Curiosamente, el mismo resultado que se muestra en este capítulo para la amnesia inducida por la administración de escopolamina luego del entrenamiento se reprodujo para la amnesia inducida por la administración de escopolamina antes de éste. Es bastante aceptado en la literatura que la escopolamina pre-entrenamiento impide la adquisición de la memoria (Rush 1988, Decker et al. 1990a, Blake et al. 2011). Sin embargo, nuestros resultados muestran lo contrario y sugieren que la droga tiene efectos similares en la consolidación de la memoria cuando se administra antes o después del entrenamiento. La afirmación de que la droga afectaría la adquisición se basan principalmente en dos evidencias experimentales: las dosis efectivas pre-entrenamiento son menores que post-entrenamiento, sugiriendo diferentes mecanismos involucrados en cada caso; y las curvas de adquisición se ven afectadas por la droga. El argumento acerca de las diferencias de dosis pre- y post-entrenamiento resulta razonable en cuanto que las diferencias en tiempo absoluto son pequeñas⁴⁵ como para atribuirles el efecto. Sin embargo, el argumento falla en que se considera la dinámica de formación de la memoria de una forma simplistamente secuencial: una visión más comprehensiva del proceso considera que adquisición y consolidación no son fenómenos perfectamente dissociables sino que la consolidación es una continuación de la adquisición y está determinada por ésta. En otras palabras, si bien el argumento esgrimido por James McGaugh (1966) acerca de la interpretación de los efectos de tratamientos post-entrenamientos como no atribuibles a la adquisición es válido, no está permitido asumir el caso contrario: que aquellos efectos pre-entrenamiento diferenciables de los efectos post-entrenamiento reflejan características del proceso de adquisición. Un claro ejemplo es que una manera típica de generar memorias asociativas que no se expresen en el largo plazo consiste en disminuir la intensidad del refuerzo: la información que se adquiere (la intensidad del refuerzo) es la que determina cómo se consolidará la memoria. Evaluaciones en el corto plazo demuestran que estos refuerzos de baja intensidad son percibidos y sus correspondientes memorias adquiridas. Pero según el razonamiento de que los efectos de tratamientos post-entrenamiento pueden ser unívocamente atribuidos a la consolidación de la memoria (habida cuenta de que se descarten efectos sobre la recuperación u otros procesos necesarios para la expresión del comportamiento, como actividad motora, percepción, etc.), es de notar que los efectos amnésicos de la escopolamina pre-entrenamiento pueden ser revertidos por tratamientos post-entrenamiento, como la administración de naloxona, un antagonista de receptores de opiodes⁴⁶ (Rush 1986). El otro razonamiento empleado para justificar el supuesto efecto de escopolamina en la adquisición es el efecto que la droga tiene sobre el comportamiento del animal en el corto término, una medida clásica de la adquisición de la memoria. Si bien el comportamiento del animal en el corto plazo puede ser utilizado para mostrar de manera positiva que ocurrió la adquisición de la memoria, no se puede descartar

⁴⁵ Muchas de estas evidencias se observaron en protocolos de evitación pasiva en ratas en los que la diferencia temporal entre el tratamiento pre- y post-entrenamiento no alcanza los diez minutos (ver por ejemplo Rush 1988).

⁴⁶ Este experimento se realizó en el mismo laboratorio y usando el mismo paradigma en el cual se describió la distinta eficacia de las dosis pre- y post-entrenamiento de la escopolamina.

que ella haya ocurrido a partir de resultados negativos como tampoco es válido basarse en diferentes medidas experimentales del comportamiento en evaluaciones a corto plazo para asumir diferencias en la adquisición de la memoria (Tomsic et al. 1991, Kane et al. 1997). Las evaluaciones en el corto plazo siguen siendo evaluaciones de la memoria y reflejan la recuperación de esta, pudiendo verse afectadas por multitud de causas diferentes a la adquisición, como ser los efectos del tratamiento amnésico en dichas sesiones de evaluación o incluso la consolidación de la memoria. En particular, la escopolamina afecta procesos atencionales (Dunne y Hartley 1986), lo que induciría a pensar que la percepción de los estímulos, necesaria para la adquisición, podría verse afectada, pero también podría afectar la capacidad de evocar la memoria durante las evaluaciones contingentes o inmediatamente posteriores al entrenamiento. La naloxona por ejemplo, que tal como se indicó más arriba puede revertir los efectos de la escopolamina cuando es administrada post-entrenamiento (y, por lo tanto, esta reversión dependería de sus efectos sobre la consolidación), puede producir también cambios en las curvas experimentales “de adquisición” cuando se administra pre-entrenamiento en modelos de aprendizaje por múltiples ensayos (Romano 1991). Sin embargo, este razonamiento tiene un fuerte sostén en experimentos del grupo de McGaugh en el que se muestra que los efectos amnésicos de la inyección pre-entrenamiento pueden ser impedidos si se entrena al animal hasta alcanzar un criterio de comportamiento durante la adquisición por varios ensayos similar a la de animales controles no tratados con la droga (Decker et al. 1990a). Este resultado se interpretó afirmando que si se extiende el entrenamiento hasta que la adquisición de la memoria se corresponda con la adquisición de los animales controles, pese al efecto de la droga, entonces la memoria adquirida como consecuencia del entrenamiento prolongado consolida normalmente. Pero este razonamiento sigue incurriendo en el error de equiparar el la expresión de la memoria en el corto plazo con la adquisición. Estos resultados son perfectamente consistentes con la idea de que la escopolamina pre-entrenamiento pueda estar modificando la forma en que la memoria se expresará en el largo plazo: La determinación de la capacidad de la memoria de expresarse en el largo plazo ocurriría en paralelo con la adquisición de la información a recordar (por ejemplo la asociación contexto-refuerzo incondicionado) y dependería de la activación de sistemas moduladores extrínsecos. Estos sistemas se activan como consecuencia de eventos que ocurran en torno a la adquisición de la información, pero también son activados por los mismos eventos que producen el aprendizaje (por ejemplo, la activación de la amígdala producida por estímulos incondicionados aversivos). En particular, la intensidad del entrenamiento (en función por ejemplo del número de ensayos, el parámetro que se manipuló en el trabajo de Decker et al., 1990a) participaría de la determinación de la expresión de la memoria (Frenkel et al. 2005a). En este sentido, es un resultado esperable que los efectos de una droga que afecta la expresión de la memoria sean compensados por otros fenómenos que produzcan el efecto opuesto como, por ejemplo, el sobreentrenamiento. En qué grado eventos estresantes tendrán o no la oportunidad de revertir los efectos sobre la expresión de una droga, dependerá de los mecanismos de acción de la droga. Una droga que afecte la determinación de la memoria actuando en las etapas más “río

abajo” de este proceso o que afecte de manera irreversible un mecanismo común a todos los fenómenos que pueden actuar sobre la expresión de largo término, producirá efectos que no podrán ser compensados por un entrenamiento más extenso o por algún tipo de estrés facilitador de la expresión como la privación de agua en el caso de *Neohelice*. La escopolamina es un antagonista competitivo de receptores de acetilcolina, por lo que sus efectos serán dependientes del grado de activación del sistema colinérgico. Además, se ha probado en mamíferos su interacción con otros sistemas, como el serotoninérgico (Cole et al. 1994) o el noradrenérgico (Decker y McGaugh 1989, Decker et al. 1990b), siendo este último el ejemplo paradigmático de sistema de modulación extrínseco (Cahill y McGaugh 1996). También el efecto de la escopolamina pre-entrenamiento puede ser impedido por la co-inyección de losartán, un conocido facilitador de la memoria que actúa a través de sus efectos en el sistema angiotensinérgico (Dennes y Barnes 1993).

Esta primera aproximación farmacológica sugiere que los receptores muscarínicos de acetilcolina estarían mediando la determinación de la expresión a largo término de la memoria en *Neohelice* y que posiblemente estén actuando en una etapa temprana del procesamiento de esta característica de la memoria. Sin embargo, no se deberían sacar conclusiones apresuradas puesto que la metodología es por ahora insuficiente para extraer conclusiones a nivel celular o subcelular. A diferencia de la vía de señalización de NF- κ B, que fue extensamente estudiada en *Neohelice* (Romano et al. 2006b), con respecto al sistema colinérgico sólo se cuenta con un trabajo que evaluó los efectos de escopolamina en distintos aspectos de la memoria contexto-señal (Berón de Astrada y Maldonado 1999). Ni siquiera la presencia de acetilcolina o sus receptores fue demostrada en el modelo experimental que se empleó (aunque haya evidencias en otros cangrejos, cf. Barker et al. 1986, no es correcto asumir la generalización). Por otro lado, cualquier conclusión mecanística requeriría el empleo de un arsenal farmacológico más extenso, como por ejemplo la co-inyección de agonistas o el empleo de drogas químicamente similares pero que no actúen sobre los blancos propuestos (cf. Baratti et al. 1979).

IV.

Resultados

Capítulo IV

Estímulos amnésicos naturalistas y expresión de la memoria

El motor de cualquier investigación en Biología es el interés del científico en conocer el valor funcional⁴⁷ del proceso que se estudia, una pregunta por lo general confundida con el concepto erróneo de “causa última”. En el capítulo anterior se mostró que una droga que afecta el sistema colinérgico muscarínico puede modular de manera negativa la expresión de una memoria que se está almacenando, de manera que esta no se exprese en el largo plazo, aún cuando permanece reactivable y su expresión se puede recuperar. Resultados similares se mostraron antes para el caso de la amnesia inducida por saralasin, un antagonista de receptores de angiotensina (Frenkel et al. 2010a). Sin embargo, al deberse estos efectos a lesiones farmacológicas, no queda claro hasta dónde la determinación de la expresión a largo plazo de la memoria (y su capacidad de modificarse durante la reconsolidación) puede considerarse un fenómeno biológico con valor funcional por mérito propio, o hasta donde el resultado de estas lesiones es un artefacto que, aunque puede revelar mecanismos del almacenamiento de la memoria, no refleja un proceso que se pueda dar en el ambiente natural del animal y estar sujeto a selección natural. Al fin y al cabo, ningún cangrejo ingiere saralasin o escopolamina fuera del laboratorio, ni mucho menos es inyectado con ellas. La modulación del almacenamiento de la memoria por sistemas extrínsecos se ha propuesto como una manera de seleccionar para ser almacenadas las experiencias significativas y dejar de lado, condenadas al olvido, a aquellas experiencias que posiblemente no sean relevantes en el largo plazo (McGaugh 1966, Cahill y McGaugh 1996). Pero ¿cuál sería el valor adaptativo de almacenar experiencias que no se van a expresar? el rescate de la expresión de memorias en condiciones de amnesia es un fenómeno hartamente conocido, aunque hasta ahora había sido pobremente vinculado con la modulación del almacenamiento por sistemas extrínsecos. Un caso paradigmático es la recuperación de las memorias asociativas interferidas por ensombrecimiento: Cuando dos estímulos salientes son asociados en simultáneo con un estímulo reforzador, y se evalúa la respuesta a uno solo de ellos, los animales no demuestran haber asociado ese estímulo con el refuerzo. Sin embargo, si luego del entrenamiento se extingue el estímulo ensombrecedor, en una sesión de evaluación subsiguiente los animales muestran haber aprendido la asociación entre el estímulo que se evalúa y el refuerzo (Kaufman y Bolles 1981, Matzel et al. 1985). Este experimento llevó a proponer la existencia de un mecanismo de “toma de decisiones” que media la expresión de la memoria durante la fase de recuperación. Este mecanismo actuaría durante la recuperación, comparando la información almacenada con la información generada durante dicha recuperación (perceptos, estado interno del animal, etc.) y determinaría que la memoria se exprese comportamentalmente o no. En caso de que no se exprese, la memoria sería inaccesible a los sistemas que determinan el comportamiento (sistemas motores, conciencia, etc.) pero se mantendría activa en el sistema

⁴⁷ Ver nota 1 del Capítulo I para una definición de “función” en Ciencias Biológicas.

de memoria y estará sujeta a modificaciones (Urcelay y Miller 2008). Aunque en la vida cotidiana lamentamos no poder acceder a varios de nuestros recuerdos cuando los consideramos necesarios, el caso opuesto, es decir poder recordarlo todo en todo momento, implicaría más problemas que ventajas como le ocurría a Solomon Shereshevsky, el famoso mnemonista ruso: al tratar de entender una simple historia, se perdía en detalles que evocaban otros detalles, que a su vez evocaban otros detalles hasta que su mente se volvía un “caos virtual”⁴⁸ (Luria 1968). Un posible valor adaptativo de las deficiencias en la recuperación podría ser la capacidad de organizar la información almacenada en el momento de la recuperación: reducir el acceso a cierta información almacenada, permitiría acceder a otras informaciones (memorias) más relevantes en el contexto inmediato de recuperación (Miller et al. 1986, Urcelay y Miller 2008). Pero, ¿cuáles serían las reglas, entonces, qué determinan el resultado de este proceso de toma de decisiones, seleccionando las memorias que se mantienen latentes y las que se expresan? Hasta ahora la atención se ha puesto sobre todo en la fase de recuperación de la memoria, proponiéndose que la entrada de información que produce la recuperación favorece a ciertas memorias en una especie de competencia por el espacio representacional. En esta visión, la información presentada durante la adquisición es crítica, puesto que determinaría la capacidad de cada memoria de beneficiarse o no en función de las claves que producen la recuperación. Por ejemplo, según la Hipótesis de Especificidad de Codificación⁴⁹ (Tulving y Thomson 1973, Spear 1973), una memoria se almacena como un conjunto de atributos independientes; la habilidad de un recordatorio de producir recuperación de la memoria, depende de la cantidad de atributos similares que implique dicho recordatorio. Así, la memoria que tenga mayor similitud (mayor correlación de atributos) con el recordatorio ganará en la competencia por el espacio representacional. Si bien este tipo de modelos reconoce la importancia de la información durante el almacenamiento de la memoria en el acto de recuperación, presentan un escenario en el que la capacidad de una memoria de tomar el control del comportamiento queda determinada ya sea por la correlación de claves entre la adquisición y la recuperación, así como por la abundancia (o ausencia) de otras memorias con atributos similares. En este escenario una memoria resultante, por ejemplo, de una experiencia en que la vida de un animal estuvo en juego, competirá contra otras memorias formadas en el mismo lugar donde ocurrió dicha experiencia, arriesgándose a “perder” la competencia por ser recuperada contra memorias de hechos triviales. En este sentido, este sistema de organización de la información no se nos presenta como un sistema eficiente. Los modelos de modulación extrínseca del almacenamiento, por el contrario, resuelven este problema al favorecer la persistencia de memorias de eventos relevantes, mientras se descartan las memorias de hechos triviales. Sin embargo, no resuelven los problemas experimentales que llevaron a plantear por los modelos de toma de decisión durante la recuperación, ni tampoco resuelven un problema mucho más fundamental: una vez terminada la experiencia, o bien en una ventana temporal inmediata que la prosigue, se toma de manera irrevocable la decisión de almacenar o

⁴⁸ T. del A.

⁴⁹ Encoding Specificity Hypothesis (T. del A.)

perder una experiencia. En el primer caso, una “equivocación” podría ser resuelta olvidando la experiencia almacenada. Pero en el caso de que la experiencia no se haya almacenado el animal se encontrará “naïf” ante un nuevo evento relacionado. Podría pensarse que simplemente somos ineficientes registradores de información y, no pudiendo resolver todos estos problemas, se ha seleccionado un mecanismo que permite resolver sólo alguno de ellos⁵⁰. Sin embargo, la evidencia muestra que, por un lado, sistemas extrínsecos que responden a las exigencias inmediatas del ambiente (estrés) afectan el comportamiento de las memorias a través de sus acciones durante el almacenamiento, mientras que por otro lado mecanismos de toma de decisiones determinan el resultado de la competencia entre memorias durante la recuperación, y esta toma de decisiones es a su vez influenciada no sólo por la información contenida en las memorias en juego sino también por la acción de sistemas extrínsecos como los que actúan durante la adquisición. Una posibilidad entonces, sería que se haya seleccionado una estrategia que complemente las ventajas de las dos estrategias planteadas. Si en lugar de no almacenar la información que no “parece” relevante en el momento del aprendizaje, se la almacena en una forma en que no es expresable, entonces queda abierta la posibilidad de reevaluar dicha información luego, en función de nuevas experiencias relacionadas, y eventualmente, si las nuevas experiencias indican que esa información era más relevante de lo que parecía en la primera instancia, cambiar su expresabilidad. Pero para ello es necesario que en cada situación recordatorio, aún cuando la memoria no se exprese, ésta sea accesible, de manera de poder reactivarla, evaluar su contenido y la relación entre la información almacenada y la información provista por la situación recordatorio. Esto ha sido planteado por algunos modelos como la Hipótesis del Comparador (Urcelay y Miller 2008), que propone que la toma de decisiones en la recuperación requeriría que las memorias en juego se activen y realicen predicciones. Este modelo se propuso para explicar la competencia entre estímulos en los casos de ensombrecimiento y bloqueo (Kaufman y Bolles 1981, Matzel et al. 1985, ver Apéndice). Los casos de ensombrecimiento y bloqueo son particularmente interesantes puesto que, aunque gran parte de los mecanismos de memoria se han estudiado usando condicionamientos con estímulos asociados muy salientes, en las situaciones naturales los estímulos con relación causal (como un ataque y el olor de un predador) se ven necesariamente inmersos en un montón de otros estímulos salientes que correlacionan también con la situación de aprendizaje.

Las observaciones previas en el modelo de memoria contexto-señal muestran que luego de un entrenamiento de baja intensidad (menor número de presentaciones del EVP en el contexto de entrenamiento), se construye una memoria dependiente de síntesis proteica (Frenkel et al. 2010) que no se expresa en el largo plazo pero que puede reactivarse y su expresión se puede modificar si los animales son privados de agua contingentemente con la

⁵⁰ Nótese que, si fuésemos registradores perfectos de información, seríamos capaces de almacenar toda la información disponible, así como de recuperar todas nuestras experiencias almacenadas en cada situación, organizarlas y extraer sólo la información relevante; todo eso en una escala de tiempo adecuada para las exigencias que impone el medio ambiente. Evidentemente no somos tan “perfectos” y, cualquiera sea la estrategia que se seleccionó, fue la más eficaz de las que ocurrieron y no la mejor posible.

reactivación (Frenkel et al. 2005a). La privación de agua es un estímulo naturalista⁵¹ que puede modular la expresión de la memoria tanto durante la consolidación de un entrenamiento de baja intensidad (Frenkel et al. 2002) como durante su reconsolidación. El hecho de poder observar que la modulación de la expresión de las memorias puede afectarse por estímulos naturalistas apoya la hipótesis que se propuso sobre el valor funcional de las deficiencias en la expresión de la memoria. Hasta ahora, en este modelo, sólo se han descrito estímulos naturalistas que mejoran la expresión de la memoria. Aunque se puede inducir una memoria que no se expresa reduciendo el número de ensayos del entrenamiento, esta situación implica una diferente exposición del animal a la asociación entre el contexto y el EVP, por lo que no podemos discriminar los efectos en la expresión de los componentes moduladores de la memoria contexto-señal (por ejemplo el estrés producido por el entrenamiento) de aquellos debidos a diferencias en la información almacenada (por ej. asociatividad entre el CS y el US, Rescorla y Wagner 1972). El objetivo de este capítulo será buscar un estímulo naturalista que disminuya la expresión de la memoria. Para ello se buscará un estímulo naturalista que induzca un efecto amnésico cuando es aplicado contingente a la consolidación de la memoria contexto-señal. En caso de encontrarlo, se evaluará la posibilidad de reactivar la memoria amnésica. Si el estímulo naturalista amnésico actúa sólo sobre la expresión de la memoria contexto-señal, pero no afecta su almacenamiento, su persistencia en el tiempo y el engrama persistente es accesible por un estímulo recordatorio, y si tal como proponemos la expresión de la memoria es un atributo que se reevalúa y modifica durante las fases de labilidad de la memoria (consolidación y reconsolidación), entonces la memoria interferida por este estímulo debería ser capaz de entrar en la fase de reconsolidación, debería hacerlo sólo cuando la predicción realizada por la memoria que no se expresa no se cumple, y la expresión de la memoria debería poder restablecerse.

Amuchamiento

Efecto de 2h de amuchamiento post-entrenamiento.

Observaciones previas del laboratorio muestran que mantener a los animales en el bioterio inmediatamente luego de un entrenamiento no permite una buena expresión de lo

⁵¹ No corresponde referirse a un estímulo producido en el laboratorio como “natural”, entendiéndose como tal a cualquier fenómeno que puede ocurrir en el medio ambiente donde la especie modelo de estudio fue y es sujeta a presiones selectivas. Llamaremos estímulos “naturalistas” a aquellos que el investigador percibe como similares o “equivalentes” a aquellos que ocurren en el ámbito del animal. El olor de un predador propio del ambiente del animal modelo, la presencia o ausencia de comida, son ejemplos de estímulos naturalistas. Una inyección de escopolamina no lo es, aún cuando actúa sobre sistemas que responden a estímulos naturales. El cangrejo *Neohelice granulata* es un animal de medio semiterrestre, al que se puede encontrar tanto bajo el agua como sobre la arena. Aquellos animales que se arriesgan a las zonas de arena seca se exponen a muerte por desecación. Debido a ello, consideramos la privación de agua un estímulo naturalista, aún cuando en las rías de San Clemente esta ocurre sobre la arena caliente y no en un recipiente plástico en un cajón oscuro.

aprendido al día siguiente. Puesto que en el bioterio los animales se mantienen en cubas de almacenamiento, con veinte animales por cuba, esta densidad de animales es un buen candidato a estímulo naturalista capaz de interferir la memoria contexto-señal. Un número menor de animales por condición de amuchamiento sería preferible pensando en la flexibilidad que esto otorga a diseños experimentales futuros que utilicen este estímulo, al permitir manipular menos animales en simultáneo. Sin embargo, experimentos preliminares (que no se muestran en esta tesis) no mostraron efectos amnésicos al exponer a los animales en números pequeños a espacios muy reducidos (5 o 10 animales en frascos de dimensiones similares a los usados para el almacenamiento individual de los animales entre sesiones experimentales). Esto podría indicar que el número total de animales es importante para este efecto.

En este experimento se expuso a los animales inmediatamente después de un entrenamiento a una condición de amuchamiento consistente en 20 animales por cuba de almacenamiento durante 2 horas. Puesto que se espera que el efecto se deba a la condición de amuchamiento y no a otros factores que puedan estar implicados en el traslado y mantenimiento de los animales en el bioterio, el estímulo se aplicó en la misma habitación donde se realizan los experimentos.

Diseño experimental.

El experimento consistió de dos tratamientos experimentales y duró tres días (Fig. IV.1, panel superior). El primer día, en la *Sesión de Entrenamiento*, un grupo de animales fue entrenado en el paradigma de memoria contexto-señal (grupo “entrenado”, *E-amuch*, 15 presentaciones de un estímulo visual de peligro, EVP, separadas por intervalos constantes de 171 segundos), mientras que otro grupo de animales (grupo “control”, *C-amuch*) permaneció el mismo tiempo en el actómetro, pero fue estimulado con el EVP una sola vez, coincidente con el primer ensayo de entrenamiento del grupo E, para registrar los valores iniciales de respuesta. Inmediatamente luego del entrenamiento, los animales fueron colocados en cubas (20 animales/cuba) como las que se utiliza para mantener a los animales en el bioterio. De ahora en más llamaremos a este protocolo “de amuchamiento”. Los animales permanecieron en estas condiciones por 2 horas, luego de las cuales fueron colocados en recipientes individuales en cajoneras oscuras y permanecieron allí hasta la sesión de evaluación al día siguiente. El segundo día se realizó la *Primera Sesión de Evaluación*: los animales fueron colocados de nuevo en los actómetros, donde fueron estimulados una vez con el EVP y se registró la respuesta comportamental. Al terminar la evaluación, los animales fueron colocados de nuevo en los contenedores individuales en cajoneras oscuras. El tercer día se realizó la *Segunda Sesión de Evaluación*, idéntica a la del día anterior.

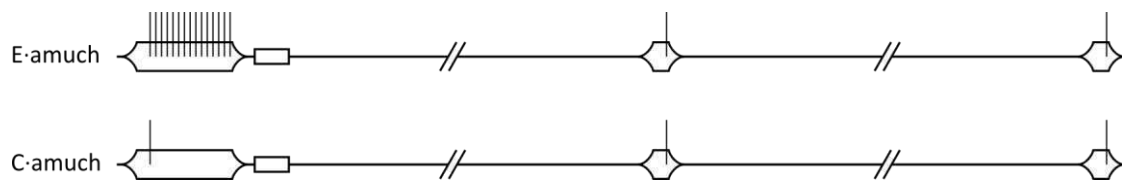


FIG IV.1 Efecto de 2h de amuchamiento post-entrenamiento: La exposición de los animales al protocolo de amuchamiento por dos horas no produce efecto amnésico. Esquema superior: diseño experimental. Los ensanchamientos en la línea de tiempo representan la exposición de los animales al actómetro. Las líneas verticales representan la presentación del EVP. Los rectángulos cortos representan la exposición de los animales a las cubas de almacenamiento (20 animales/cuba) por dos horas. Gráficos inferiores: respuesta de los animales en la Primera Sesión de Evaluación (izquierda) y en la Segunda Sesión de Evaluación (derecha). La notación de los grupos según el texto. * representa diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos C y E correspondientes.

Resultados.

Los datos fueron analizados independientemente en cada sesión. Para la Sesión de Entrenamiento una prueba t no reveló ninguna diferencia entre los grupos experimentales ($p=0,73$), mostrando que se partió de grupos homogéneos. Tanto en la Primera Sesión de Evaluación como en la Segunda Sesión de Evaluación, a 24 y 48 horas del entrenamiento, las respectivas prueba t mostraron diferencias significativas entre los dos tratamientos ($E\text{-amuch} < C\text{-amuch}$, $p < 0,05$ en las dos sesiones, Fig. IV.1, panel inferior).

Conclusiones.

En las dos sesiones de evaluación se detectaron diferencias significativas entre el grupo entrenado y el grupo control, lo que se interpreta como una buena expresión comportamental de la memoria del entrenamiento contexto-señal. La exposición a dos horas en un contexto de alta densidad de animales (20 animales/cuba) no fue por lo tanto suficiente para inducir un efecto amnésico.

Efecto de 4h de amuchamiento pre- y post-entrenamiento.

Puesto que en el experimento anterior dos horas de amuchamiento de los animales no fueron suficientes para producir un efecto amnésico observable, se decidió probar el efecto de un tiempo más prolongado. Las condiciones de almacenamiento de los animales en el bioterio son de 20 animales por cuba, y almacenando a los animales entre las sesiones de entrenamiento y evaluación en esas condiciones no se puede observar la memoria contexto-señal, por lo que se prefirió no aumentar aún más la densidad de animales, sino alargar el tiempo de exposición a la condición de 20 animales/cuba. A las cuatro, pero no a las ocho horas, la expresión de la memoria en el largo término luego de un entrenamiento débil puede ser facilitada por una experiencia comportamental (Smal et al. 2011). También a cuatro horas se observó que un ensayo recordatorio puede impedir el efecto amnésico de un inhibidor de síntesis proteica (Suárez et al. 2010). Esto sugiere que a cuatro horas todavía se estaría consolidando y elaborando la información. Por lo tanto, se decidió probar un tiempo de amuchamiento de 20 animales/cuba de cuatro horas.

Otro cambio entre este experimento y el anterior, es que en lugar del paradigma “clásico” de memoria contexto-señal, se utilizó el paradigma de “Condicionamiento Contextual Pavloviano” (CCP). En este paradigma, que se describe con más detalle a continuación en la sección de Diseño Experimental, un cambio en la iluminación del contexto anticipa la presentación del EVP, dando al animal una clave que le permite anticipar con mayor precisión el momento de aparición del estímulo condicionado. Este protocolo genera una memoria que ha mostrado muchas características similares a la resultante luego de un protocolo de

entrenamiento de memoria contexto-señal: luego de 15 ensayos se genera una memoria asociativa entre el EVP y el contexto de entrenamiento que se expresa a 24 y 48 horas, su consolidación puede ser bloqueada por inhibidores de síntesis proteica y sulfasalazina así como por agonistas de GABA. La presentación no reforzada del contexto de entrenamiento produce un segundo momento de susceptibilidad de la memoria a agentes interferentes (labilización), pero esto no ocurre luego de un ensayo reforzado similar a los empleados en el entrenamiento (Fustiñana 2013, Fustiñana et al. 2013, Carbó Tano 2013). Sin embargo, un ensayo reforzado en el que el refuerzo se presenta inmediatamente al principio de la fase de luz superior, en lugar de al final de la misma, sí puede desestabilizar la memoria⁵².

En caso de que se encuentre un efecto amnésico, se pretende probar si éste se debe a una interferencia del amuchamiento con el proceso de consolidación. En principio, dado que las condiciones de amuchamiento son similares a aquellas en que se mantiene a los animales en el bioterio, se podría presuponer que cualquier efecto observado se podría comparar directamente con el tratamiento tradicional de los animales, es decir, sin amuchamiento. Sin embargo, puesto que los animales se entrenan de manera aislada, es posible que otros factores, como el paso de una situación de aislamiento a la de amuchamiento, sean responsables de cualquier efecto que se observe. Por lo tanto, se decidió acompañar al par experimental, de un par control en el cual los animales fueron amuchados por la misma cantidad de tiempo inmediatamente antes del entrenamiento. Todos los grupos, experimentales y controles, fueron mantenidos aislados en las cajoneras desde el día anterior al entrenamiento, para asegurar que tanto el grupo control como el grupo experimental sean expuestos al amuchamiento luego de un período similar de aislamiento. El aislamiento en cajoneras desde el día previo no debería afectar el aprendizaje de la memoria contexto-señal según las observaciones previas en el laboratorio (observaciones personales, no publicadas).

Diseño experimental. Condicionamiento Contextual Pavloviano.

El experimento duró cuatro días y consistió de cuatro tratamientos experimentales: *E-amuch-preE*, *C-amuch-preE*, *E-amuch-postE* y *C-amuch-postE* (Fig. IV.2 panel superior). Durante todo el primer día, todos los animales permanecieron en la habitación de entrenamiento, aislados en recipientes individuales en cajoneras oscuras. La *Sesión de Entrenamiento* se realizó el segundo día. Los animales de los grupos preE fueron colocados en cubas similares a las que se utilizan en el bioterio, 20 animales por cuba, durante cuatro horas y luego fueron entrenados siguiendo el protocolo de CCP. Los animales de los grupos postE fueron colocados directamente en los actómetros, donde se los entrenó siguiendo el protocolo de CCP y luego se los colocó en las cubas de almacenamiento por cuatro horas, también 20 animales por cuba. El protocolo de CCP consistió en la presentación del EVP 15 veces, con intervalo de 171 segundos entre ensayos, igual que en el protocolo "clásico". La diferencia entre ambos protocolos es que en el protocolo de CCP, el actómetro es iluminado por dos

⁵² Agustina López 2014, tesis de grado (director ME Pedreira), datos no publicados.

lámparas colocadas debajo de los actómetros; 18 segundos antes de la presentación del EVP, se apaga la luz inferior y simultáneamente se enciende la luz superior. El EVP se presenta con la luz superior, al igual que en el protocolo de memoria contexto-señal, e inmediatamente después se apaga la luz superior y se enciende la luz inferior. Los animales permanecen diez minutos en el actómetro antes de la primera presentación del EVP; durante este tiempo de habituación, al igual que durante la manipulación para colocar y extraer a los animales de los actómetros, se mantiene la iluminación inferior, de manera que el animal sólo puede observar la luz superior durante la presentación de cada EVP y unos pocos segundos antes. Al igual que en el resto de los experimentos, por cada grupo “Entrenado” (*E*) que recibe 15 presentaciones del EVP, un grupo “Control” (*C*) permaneció simultáneamente en los actómetros y fue estimulado con el EVP una sola vez coincidente con el primer ensayo del grupo *E* para establecer el nivel basal de respuesta. La respuesta de todos los animales a una presentación del EVP fue evaluada 24 y 48 horas después del entrenamiento. En las *Sesiones de Evaluación*, los animales fueron colocados en los actómetros iluminados desde abajo, donde permanecieron por 10 minutos antes de una presentación del EVP. Dicha presentación se realiza con iluminación superior y es antecedida por 18 segundos de iluminación superior, al igual que los ensayos durante el entrenamiento.

Resultados.

Los datos fueron analizados por separado para cada una de las tres sesiones. En la Sesión de Entrenamiento una prueba de ANOVA no mostró efecto de los diferentes tratamientos ($F(3,122) = 1,44$; $p = 0,24$) en el primer ensayo, lo que indicaría que se parte de grupos homogéneos y que la exposición de los animales a la situación de amuchamiento no afectó la respuesta inicial de los animales con respecto a aquellos que fueron entrenados inmediatamente luego de ser extraídos de las cajoneras. En la primera Sesión de Evaluación (Fig. IV.2 panel inferior izquierdo), 24 horas después del entrenamiento, una prueba de ANOVA ($F(3,122) = 2,97$; $p < 0,05$) seguida de contrastes ortogonales entre los grupos entrenados y controles, mostró diferencias significativas entre los grupos *E-amuch-preE* y *C-amuch-preE* ($p < 0,05$), pero no en la comparación entre los grupos *E-amuch-postE* y *C-amuch-postE* ($p > 0,1$). La prueba de Tuckey a posteriori sólo mostró diferencias entre los grupos *E-amuch-preE* y *C-amuch-postE*; en particular, no se detectaron diferencias entre los grupos *C-amuch-preE* y *C-amuch-postE*.

En la segunda Sesión de Evaluación (Fig. IV.2 panel inferior derecho) a las 48 horas luego del entrenamiento, contrastes ortogonales luego de una prueba de ANOVA ($F(3,122) = 3,52$; $p < 0,05$) mostraron de nuevo diferencias sólo entre los grupos *E-amuch-preE* y *C-amuch-preE* ($p < 0,01$), pero no entre los grupos *E-amuch-postE* y *C-amuch-postE* ($p > 0,9$). Una prueba de Tuckey mostró diferencias entre el grupo *E-amuch-preE* y cada uno de los dos grupos *C*, pero no entre los grupos Controles.

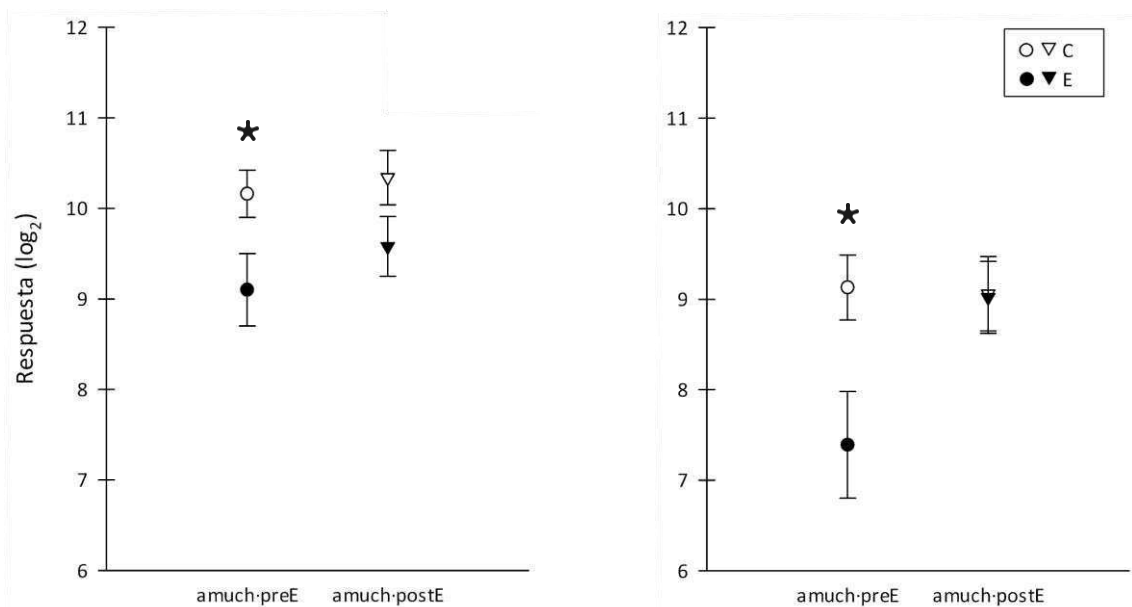
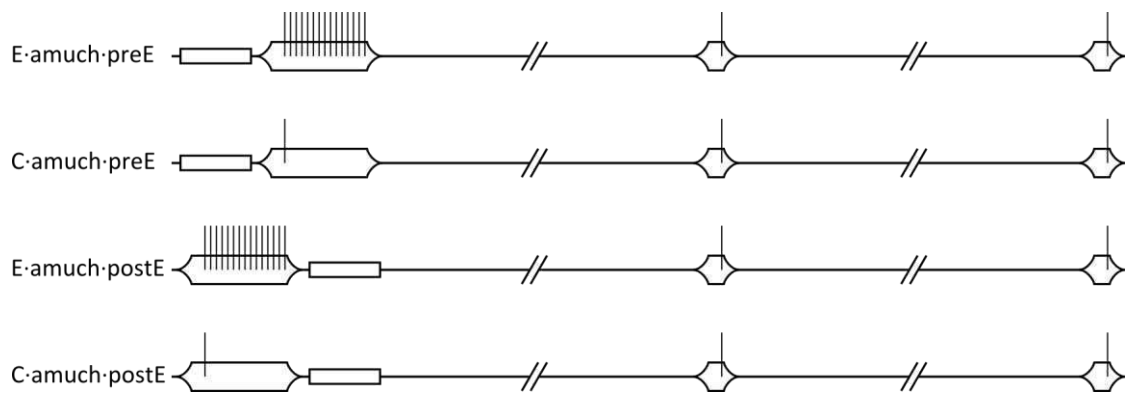


FIG IV.2 Efecto de 4h de amuchamiento pre- y post-entrenamiento: La exposición de los animales al protocolo de amuchamiento por cuatro horas después del entrenamiento, pero no antes, produce un efecto amnésico a 24 y 48 horas. Esquema superior: diseño experimental (idem la figura anterior). Los rectángulos largos representan la exposición de los animales a las cubas de almacenamiento (20 animales/cuba) por cuatro horas. Gráficos inferiores: respuesta de los animales en la Primera Sesión de Evaluación (izquierda) y en la Segunda Sesión de Evaluación (derecha). La notación de los grupos según el texto. * representa diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos C y E correspondientes.

Conclusiones.

En ambas *Sesiones de Evaluación* se encontraron diferencias en las respuestas de escape de los grupos Control y Entrenado expuestos al amuchamiento inmediatamente antes del entrenamiento, pero no entre los grupos Control y Entrenado que fueron expuestos a la condición de amuchamiento inmediatamente después del entrenamiento. En la evaluación a 24hs la media del grupo *E-amuch-postE* es bastante inferior a la de su grupo Control (9,58 y 10,34 respectivamente), sin embargo no llega a alcanzar significancia ni siquiera con un criterio del 10%. Los grupos controles no mostraron diferencias en ninguna de las dos sesiones y se partió de grupos con respuesta homogénea, lo que permite atribuir las diferencias Control-Entrenado a un efecto mnésico.

En función de estos resultados se puede concluir entonces que cuatro horas de amuchamiento (20 animales/cuba) luego del entrenamiento CCP fue suficiente para inducir un efecto amnésico tanto a 24 como a 48 horas. Este efecto no se revirtió luego de la primera evaluación, pese a que ésta incluyó un nuevo ensayo de entrenamiento. La amnesia no se observó cuando los animales fueron expuestos a la situación de amuchamiento antes del entrenamiento, lo que permite atribuir el efecto amnésico a una interferencia con el proceso de consolidación y no un efecto inespecífico sobre la respuesta de los animales causado por la transición de una situación de aislamiento a una de amuchamiento o por cualquier otro factor estresante que pueda surgir de la manipulación de los animales en el protocolo de amuchamiento.

Efecto del tipo de recordatorio sobre la amnesia inducida por amuchamiento.

En el siguiente experimento se probó el efecto de exponer a los animales tratados con amuchamiento (4hs, 20 animales/cuba) inmediatamente después del entrenamiento a recordatorios con y sin refuerzo. Los recordatorios, 24 horas después del entrenamiento, fueron seguidos de privación de agua, un estímulo que se ha probado que puede facilitar la reconsolidación de la memoria en animales que no la expresan luego de entrenamientos débiles o tratamientos farmacológicos amnésicos (Frenkel et al. 2005a, 2010a). La hipótesis bajo evaluación en este experimento es que un recordatorio no reforzado induciría la labilidad de la memoria, permitiendo la reevaluación de la información adquirida, lo que produciría la expresión de la memoria en una evaluación 24 horas después de un recordatorio. En este experimento no se mantuvo a los animales aislados en la habitación de entrenamiento un día antes del entrenamiento como en el experimento anterior, puesto que todos los animales serían expuestos al protocolo de amuchamiento en las mismas condiciones y luego de ser aislados en el entrenamiento. Dado que la respuesta de uno de los pares Control-Entrenado fue evaluada tanto a 24 como 48 horas luego del entrenamiento, es posible evaluar si esta diferencia con el experimento anterior tiene algún efecto.

Diseño experimental.

El experimento duró tres días y consistió de cuatro tratamientos experimentales: *E-amuch-R+*, *C-amuch-R+*, *E-amuch-R-*, *C-amuch-R-* (Fig. IV.3 panel superior). El primer día se realizó la *Sesión de Entrenamiento*: dos grupos de animales fueron entrenados (grupos *E*) siguiendo el protocolo de entrenamiento de CCP, mientras que otros dos grupos (grupos *C*) permanecieron el mismo tiempo en los actómetros y fueron estimulados una sola vez coincidente con el primer ensayo de los grupo *E* para establecer el nivel basal de respuesta. Esta sesión fue similar a la del experimento anterior, con la excepción de que todos los animales fueron amuchados inmediatamente después del entrenamiento. El protocolo de amuchamiento fue el que previamente mostró inducir un efecto amnésico: 4hs en cubas similares a las de almacenamiento, 20 animales por cuba. El segundo día, en la *Sesión de Reactivación*, todos los animales fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento por 10 minutos. Un par de grupos E-C recibió una presentación del EVP al final de esta reexposición (grupos "con refuerzo", *R+*). El otro par E-C fue expuesto también durante 10 minutos al contexto de entrenamiento; pasado este tiempo, se cambió la iluminación del contexto durante 27 segundos (18 segundos correspondientes al tiempo de anticipación del EVP, más los 9 que corresponderían a una presentación del EVP, para que la exposición a los distintos tipos de luz sea similar en todos los grupos), pero no se presentó ningún refuerzo (grupos "sin refuerzo", *R-*). Inmediatamente después de la evaluación, todos los animales fueron colocados en las cajoneras, donde fueron privados de agua por dos horas. En la *Sesión de Evaluación*, los animales son colocados en los actómetros, donde permanecen por 10 minutos antes de una presentación del EVP.

Resultados.

Los datos fueron analizados por separado para cada una de las tres sesiones. En la Sesión de Entrenamiento una prueba de ANOVA no mostró efecto de los diferentes tratamientos ($F(3,132) < 1$) en el primer ensayo, lo que indica que se partió de grupos homogéneos. En la Sesión de Reactivación (Fig. IV.3 panel inferior izquierdo) una prueba de *t* entre los grupos *E-amuch-R+* y *C-amuch-R+* no mostró diferencias significativas ($p > 0,35$). En la Sesión de Evaluación (Fig. IV.3 panel inferior derecho) una prueba de ANOVA ($F(3,132) = 4,08$; $p < 0,01$) seguida de contrastes ortogonales entre cada par de grupos Control y Entrenado mostró un efecto del tipo de entrenamiento en los grupos sin refuerzo en la reactivación ($E-amuch-R- < C-amuch-R- ; p < 0,005$), pero no en los grupos *E-amuch-R+* y *C-amuch-R+* ($p > 0,15$). Una prueba de Tuckey mostró diferencias entre el grupo *E-amuch-R-* y los grupos Control, pero no mostró diferencias entre los dos grupos Control.

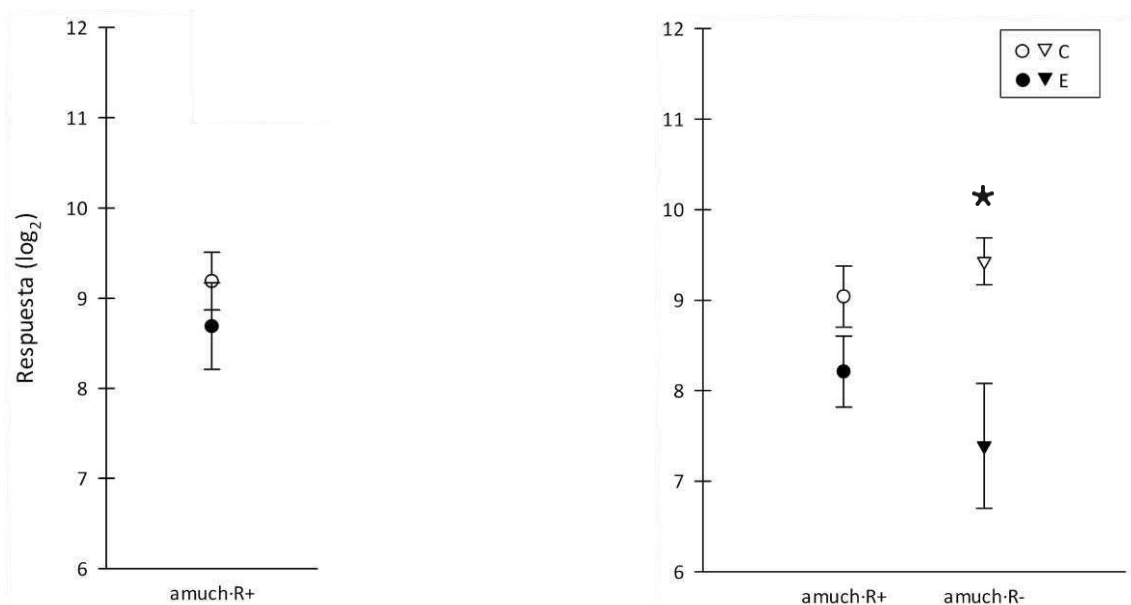
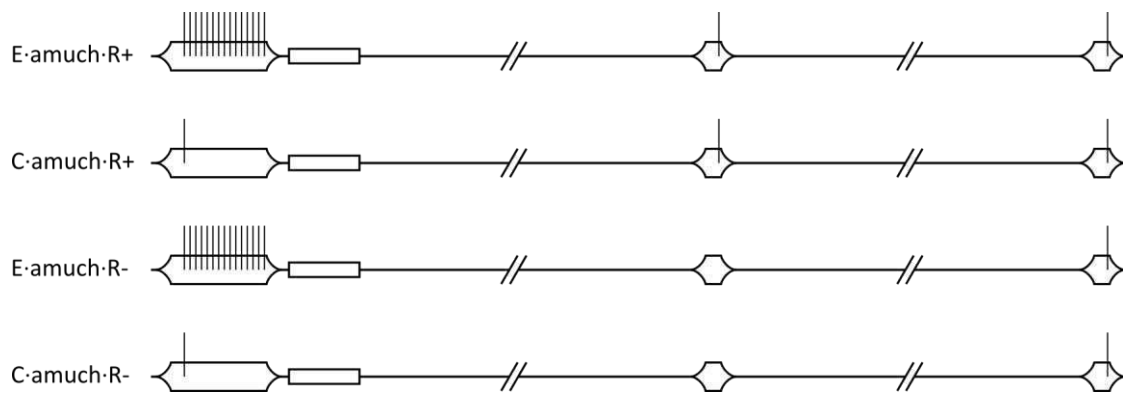


FIG IV.3 Efecto del tipo de recordatorio sobre la amnesia inducida por amuchamiento: La exposición de los animales al protocolo de amuchamiento por cuatro horas después del entrenamiento produce amnesia que es revertida luego de la presentación de un recordatorio sin refuerzo. Esquema superior: diseño experimental (ídem las figuras anteriores). Gráficos inferiores: respuesta de los animales en la Primera Sesión de Evaluación (izquierda) y en la Segunda Sesión de Evaluación (derecha). La notación de los grupos según el texto. * representa diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos C y E correspondientes.

Conclusiones.

Se partió de grupos homogéneos y no se observaron diferencias entre los controles al final del experimento. El par de grupos E-C que fue evaluado tanto a 24hs como a 48hs, no mostró diferencias en ninguna de las dos evaluaciones, lo que indicaría que el amuchamiento fue un efectivo agente amnésico. Es particularmente importante esta réplica del resultado del experimento anterior puesto que esta vez los animales tuvieron un tratamiento ligeramente diferente al no ser aislados en cajoneras durante un día antes del entrenamiento. Los animales que fueron reexpuestos al contexto de entrenamiento pero no recibieron una presentación del EVP al final de dicha exposición mostraron una memoria intacta el último día. Esta presentación no reforzada del contexto de entrenamiento, se sabe que puede servir como recordatorio y labilizar la memoria del entrenamiento CCP (Fustiñana et al. 2013). Hasta ahora, sin embargo, sólo se había observado la labilización de la memoria del CCP sólo cuando esta se podía expresar en la sesión de reactivación. Estos resultados muestran que la memoria que no se pudo expresar 24hs después de un entrenamiento seguido de amuchamiento, sin embargo fue reactivada y labilizada por un recordatorio, sólo cuando éste no incluyó el estímulo incondicionado asociado.

Desarrollo temporal del cambio en la expresión luego de un recordatorio.

En varios estudios de amnesia inducida luego de un recordatorio se ha observado que la misma tarda un tiempo en expresarse; es decir, el efecto amnésico no se observa inmediatamente después de la presentación combinada de un recordatorio y un agente amnésico (Debiec et al. 2002, Duvarci y Nader 2004, Merlo et al. 2005). Esto ha llevado a proponer que aquellos efectos sobre la memoria causados por una modificación de la misma durante la fase de reconsolidación no se expresarían en el corto plazo, puesto que la memoria a evaluar mantendría aún las propiedades de la memoria reactivada previamente. Recién al término de la reconsolidación, o en estados muy avanzados de la misma, sería posible observar las modificaciones sobre la memoria (Nader 2003, Tronson y Taylor 2007). La falta de efectos a corto plazo de tratamientos que sí producen efectos a largo plazo y sólo si son contingentes con un recordatorio, por lo tanto, ha sido propuesta como un control de que estos efectos son causados por una intervención sobre la fase de reconsolidación (Tronson y Taylor 2007, Frenkel et al. 2005a). Este control permitiría descartar otros efectos como por ejemplo una modulación del proceso de recuperación de la memoria causado por los tratamientos que se proponen afectarían la reconsolidación.

En el siguiente experimento se evaluó la expresión de la memoria en el corto plazo luego del procedimiento de reactivación que en los experimentos anteriores mostró poder revertir el efecto amnésico causado por el amuchamiento de los animales inmediatamente después del entrenamiento. El protocolo de recordatorio utilizado incluye la exposición de los

animales a un evento estresante, la privación de agua, que ha mostrado efectos facilitadores del proceso de reconsolidación en trabajos previos. Este estímulo estresante ha mostrado también efectos facilitadores sobre la recuperación de la memoria (Frenkel et al. 2005a, 2010a). Por lo tanto, no tendría sentido evaluar a los animales inmediatamente después de este tratamiento. En experimentos previos se ha visto, sin embargo, que los efectos facilitadores sobre la recuperación no se observan unas horas después de terminada la privación de agua (Frenkel et al. 2005a, 2010a). En el experimento siguiente, se evaluó la expresión de la memoria cuatro horas luego de terminada la privación de agua, es decir seis horas luego del recordatorio.

Diseño experimental.

El experimento se desarrolló de manera similar al anterior, duró tres días y consistió de cuatro tratamientos experimentales que pasaron por un recordatorio no reforzado seguido de dos horas de privación de agua el segundo día (*Sesión de Reactivación*) y fueron evaluados el tercer día (*Sesión de Evaluación*). La diferencia con el experimento anterior radica en que un par de grupos E-C tuvo una sesión de evaluación adicional el segundo día, seis horas después de la sesión de recordatorio, en la que se evaluó la memoria a corto plazo después de la reactivación (*Sesión de Evaluación a Corto Plazo*, grupos *E-amuch-R-MCT*, *C-amuch-R-MCT*, los otros grupos se denominan igual que en el experimento anterior, Fig. IV.4 panel superior).

Resultados.

Los datos fueron analizados por separado para cada una de las sesiones. Puesto que el parámetro a observar es la respuesta al EVP, no se tienen datos de la Sesión de Reactivación, pero sí de la Sesión de Evaluación a Corto Plazo. En la Sesión de Entrenamiento una prueba de ANOVA no mostró efecto de los diferentes tratamientos ($F(3,120) < 1$), lo que indicaría que se parte de grupos homogéneos. En la Sesión de Evaluación a Corto Plazo (Fig. IV.4 panel inferior izquierdo), una prueba de t entre los grupos *E-amuch-R-MCT* y *C-amuch-R-MCT* no mostró diferencias significativas ($p > 0,11$). En la Sesión de Evaluación (Fig. IV.4 panel inferior derecho) una prueba de ANOVA ($F(3,120) = 6,10$; $p < 0,001$) seguida de contrastes ortogonales entre cada par de grupos C y E mostró diferencias tanto entre los grupos *E-amuch-R-* y *C-amuch-R-* ($p < 0,05$) como entre los grupos *E-amuch-R-MCT* y *C-amuch-R-MCT* ($p < 0,05$). Una prueba de Tuckey no mostró diferencias entre los dos grupos C; sin embargo, una prueba de t realizada sólo entre estos grupos sí muestra diferencias significativas, lo que podría indicar que la falta de significancia en la prueba de Tuckey se deba a la baja potencia de esta prueba.

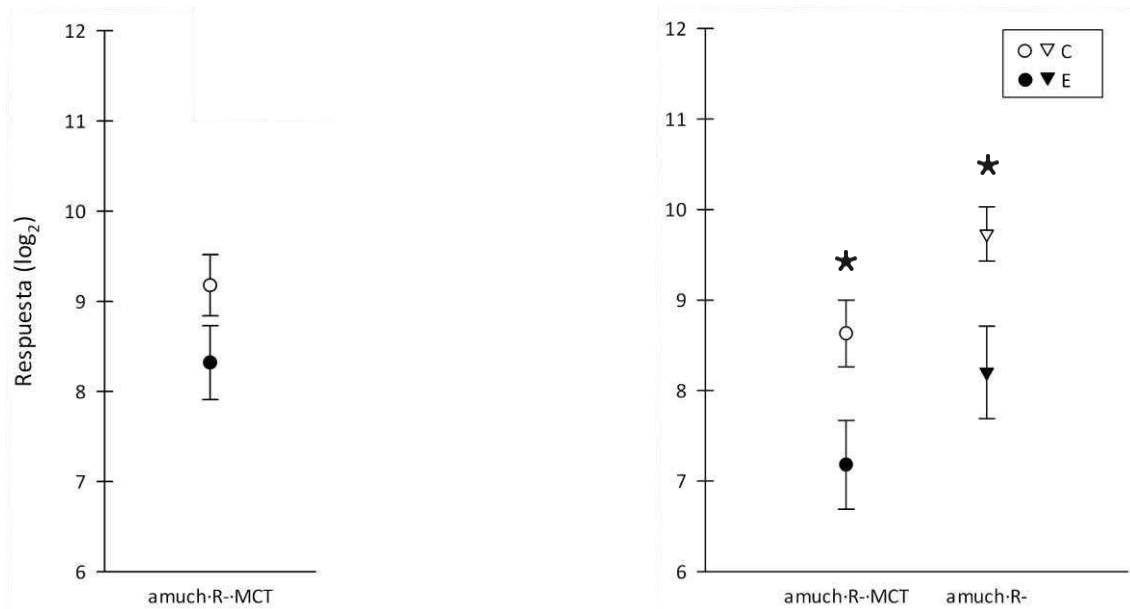
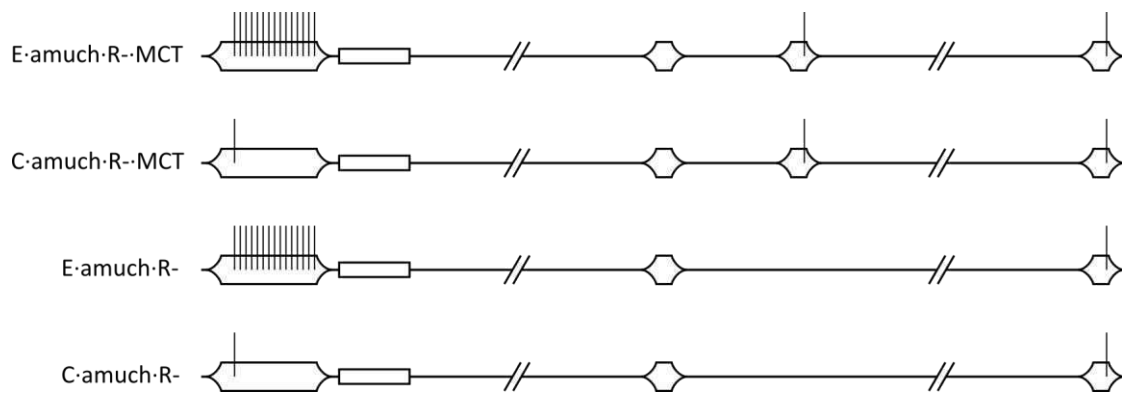


FIG IV.4 Desarrollo temporal del cambio en la expresión luego de un recordatorio: La exposición de los animales al protocolo de amuchamiento por cuatro horas después del entrenamiento produce amnesia que se observa en el corto plazo luego de un recordatorio sin refuerzo, pero se revierte en el largo plazo. Esquema superior: diseño experimental (idem las figuras anteriores). Gráficos inferiores: respuesta de los animales en la Sesión de Evaluación a Corto Plazo (izquierda) y en la Sesión de Evaluación (derecha). La notación de los grupos según el texto. * representa diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos correspondientes.

Conclusiones.

Se partió de grupos homogéneos. La prueba de Tuckey no mostró diferencias entre los controles en la última Sesión de Evaluación. Sin embargo, hay una diferencia importante entre las medias de los dos grupos (media de *C-amuch-R-MCT* = 8,63; media de *C-amuch-R* = 9,73) que podría no estar siendo detectada con una prueba poco potente como Tuckey (que en este caso tampoco llegó a detectar la significancia de los efectos del entrenamiento). Esta situación podría ser problemática si se hubiese descrito un efecto amnésico ya que esta conclusión podría ser producto de un “efecto piso”. Sin embargo, puesto que en ambos pares de grupos se encontraron diferencias entre los grupos E y C, puede concluirse sin problema que ambos grupos muestran retención de lo aprendido en la Sesión de Evaluación. Este resultado replica el encontrado en el experimento anterior y lo extiende a un grupo que tuvo una sesión de evaluación reforzada el segundo día, aparte de la sesión de reactivación no reforzada.

El segundo día, en la Sesión de Evaluación a Corto Plazo seis horas después del recordatorio, no se observó expresión de la memoria, pese a que el recordatorio fue suficiente para que la memoria se exprese 24 horas más tarde según muestra el par de grupos que no fue evaluado en el corto plazo⁵³. Este resultado es consistente con que los efectos facilitadores en la expresión de la memoria que se observan en el largo plazo son causados por la modulación de un proceso iniciado por el recordatorio, que requiere de un tiempo para desarrollarse y mientras no haya terminado, o bien alcanzado un punto crítico de su evolución, no es posible observar el efecto de dicha modulación.

La necesidad de un proceso de “consolidación” de lo aprendido en la sesión recordatorio, junto con la falta de efecto cuando el recordatorio capaz de reactivar la memoria no induce labilización de la memoria reactivada, favorece la hipótesis de la necesidad del proceso de reconsolidación para la inducción de cambios en la expresión de la memoria, y rechaza otras alternativas como efectos dependientes de la clave recordatoria pero independientes del hecho de recordar (estrés por la manipulación, nuevo aprendizaje, cambios en la atención, etc.) o de la reactivación de la traza de memoria sin necesariamente labilizarla (Gisquet-Verrier y Riccio 2012).

Discusión del Capítulo IV.

Basados en una observación informal del laboratorio, diseñamos un protocolo que impide la expresión de la memoria en el largo plazo (24 o 48 horas) luego del entrenamiento.

⁵³ Nótese que en ausencia de este control, la reversión del efecto amnésico observada al día siguiente podría atribuirse a un reentrenamiento producido durante la Sesión de Evaluación a Corto Plazo, así como a otros posibles efectos propios de la interacción entre reentrenamiento y las características de la Sesión de Recordatorio, o la presentación del estímulo incondicionado, que no necesariamente impliquen la modulación de la reconsolidación (véase por ej. Quartermain et al. 1970, 1972, Gold et al. 1973).

Este protocolo, que denominamos “amuchamiento”, es efectivo sólo si se aplica luego del entrenamiento, pero no si se lo aplica antes, lo que indicaría que actúa a través de efectos en la consolidación de la memoria, y no afectando la adquisición o la recuperación de la memoria (McGaugh 1966). El protocolo amnésico efectivo implicó el amuchamiento de los animales por cuatro horas, mientras que sólo dos horas de amuchamiento no fueron efectivas. Esto puede deberse o bien a que dos horas son insuficientes para generar un cambio en alguna propiedad fisiológica causante del efecto amnésico (por ejemplo, que los niveles de una hormona de estrés alcancen un cierto nivel), o bien a que es necesario que la percepción del estado de amuchamiento ocurra en un momento crítico, entre las dos y las cuatro horas. En base a los experimentos realizados, no se puede discriminar entre estas dos posibilidades: la aplicación de un protocolo de amuchamiento de dos horas, pero diferido dos horas de la terminación del entrenamiento sí permitiría hacerlo.

¿Cuáles son los atributos del protocolo de amuchamiento necesarios para inducir amnesia? El protocolo de amuchamiento podría estar ejerciendo sus efectos a través de uno o varios de sus componentes, e incluso a través de la interacción de más de uno. Uno de los posibles atributos de este protocolo que podría estar ejerciendo un efecto amnésico, podría ser el amuchamiento propiamente dicho, es decir el aumento en la densidad de animales. En un trabajo extensamente controlado, el grupo de Ken Lukowiak mostró que una hora de exposición a un ambiente de alta densidad de coespecíficos induce efectos amnésicos en dos modelos de aprendizaje operante en el caracol de estanque *Lymnaea stagnalis*, mientras que la exposición al agua donde hubo animales amuchados o la exposición a una alta densidad de conchas de estos animales no producía efecto amnésico (De Caigny y Lukowiak 2008). Sin embargo, en este trabajo, el amuchamiento también fue efectivo si era aplicado inmediatamente (pero no una hora) antes del aprendizaje. Otra posibilidad es que no sea el amuchamiento por sí mismo sino alguna consecuencia de éste lo que produce el efecto. Por ejemplo, al mantenerse varios animales juntos, todos ellos machos, podría aumentar el número de encuentros agonistas. En el modelo de memoria contexto-señal se ha observado que la lucha entre animales puede afectar un aprendizaje realizado 48 horas más tarde (Kaczer et al. 2007), en función del estatus (dominante o subordinado) resultante de la misma. Aunque los enfrentamientos entre cangrejos mostraron efectos sólo cuando ocurrían previos al entrenamiento, pero no después, los tiempos utilizados fueron de 48 horas y no tan cortos como los empleados en los experimentos de este capítulo. Sin embargo, es poco probable que el estatus resultante de los combates hay tenido algún efecto: puesto que todos los animales amuchados fueron también evaluados, los efectos de dominancia o subordinancia que puedan darse, deberían estar repartidos homogéneamente en todos los animales. Por otro lado, en condiciones de no amuchamiento (o en las condiciones del experimento 2 de este capítulo) deberían haber surgido también relaciones agonistas a raíz de los combates posibles previos al entrenamiento. Aún cuando el establecimiento de relaciones agonistas no parece ser una causa probable del efecto amnésico, el simple hecho de que se den combates entre los animales, y el estrés inmediato que ello produce, podría ser causal del efecto amnésico. En

este caso, sería razonable que se observen efectos sólo cuando estos encuentros ocurren cercanos al aprendizaje, e incluso el efecto podría ser mayor en animales amuchados post-entrenamiento que en los tratados pre-entrenamiento por algún efecto del entrenamiento sobre la agresividad de los animales⁵⁴. Incluso, otra posibilidad a tener en cuenta es que, aún cuando operativamente y en función del protocolo estándar de memoria contexto-señal, definimos el amuchamiento de manera positiva, es posible que sea el aislamiento de los animales en las cajoneras un componente crítico para facilitar la expresión de largo plazo de la memoria y que nuestro protocolo de amuchamiento esté actuando a través de impedir los efectos del aislamiento. La decisión de no controlar los distintos atributos del protocolo de amuchamiento se basa en que, como se dijo en la introducción de este capítulo, este estímulo es un estímulo “naturalista”; es decir que, aunque es un estímulo comportamental (en oposición, por ejemplo, a uno farmacológico o una lesión), sigue siendo un estímulo de laboratorio que puede compartir propiedades con estímulos naturales, pero no lo es. Supongamos por ejemplo que la densidad de animales (el amuchamiento propiamente dicho) fuese la causante del efecto amnésico. En condiciones naturales los animales se encuentran parte del tiempo aislados en sus cuevas, que representan un lugar seguro, y en este caso la presencia de otro animal es una invasión de territorio. Por otro lado es común observar a los animales amuchados en la arena, al aire libre, cuando buscan alimento; en estas condiciones la densidad de animales puede implicar un compromiso entre la competencia por comida y el efecto de dilución de presa. A su vez estas situaciones pueden verse afectadas por la densidad de parejas reproductivas así como por la época del año (por ejemplo si se está en una época reproductiva o no). Obviamente, ninguna de estas situaciones “naturales” se contempla adecuadamente en una cuba de plástico cerrada luego de un protocolo de entrenamiento. Sin embargo, los mecanismos que actúen durante la sesión de amuchamiento son los mecanismos de un sistema que se seleccionó en condiciones naturales y que han sido activados por un estímulo complejo que debe iniciarse a través de sistemas sensoriales y constituye así lo que se denomina una “experiencia comportamental” (cf. la definición de memoria en el capítulo I). Por lo tanto, se puede concluir este capítulo afirmando que la memoria contexto-señal puede ser modulada durante la fase de consolidación de manera negativa, es decir que se puede reducir su expresión comportamental en el largo plazo, a partir de presentar a los animales con experiencias comportamentales durante dicha fase. Este cambio en la expresión de largo plazo no afecta sin embargo la capacidad de la memoria amnésica de reactivarse: si los animales amnésicos son expuestos a una situación recordatorio, la memoria entra en reconsolidación solamente cuando el recordatorio no implica un refuerzo, lo que interpretamos como un indicador de que se realizó una predicción que se utilizó para evaluar el contenido de la memoria aún cuando esta no se pudo expresar (Gerson y Hendersen 1978, Pedreira et al. 2004, Morris et al. 2006). Además, esta reversión no se

⁵⁴ N. del A.: La impresión que me han dejado mis experimentos, aunque esta observación no fue sistematizada, es que los animales se muestran mucho más agresivos al ser retirados de los actómetros que inmediatamente antes de ser colocados en los mismos. Este fenómeno parece vinculado al entrenamiento y no al aislamiento por casi una hora en la condición de los actómetros puesto que es más notorio en los animales entrenados que en los controles no entrenados.

observa en un tiempo breve posterior a la reactivación, lo que indica que se requiere de un tiempo para procesar esta información, consistente con la idea de un período de reconsolidación.

V.

Resultados

Capítulo V

Control de la expresión durante la fase de recuperación

La memoria es un proceso reconstructivo. El concepto de fuerza de la memoria, que se construyó junto con el de consolidación (McGaugh 1966, McGaugh y Roozendaal 2002), refiere a la capacidad de persistir y expresarse de una memoria como un absoluto determinado al momento del entrenamiento. Sin embargo, es también reconocido que la expresión de una memoria puede modificarse, tanto positiva como negativamente, en el momento de la recuperación, por lo que también se habla de la fuerza de un recordatorio: la capacidad de un recordatorio de evocar una memoria. Muchos de los facilitadores de la consolidación (agentes que aumentan la fuerza de una memoria), son también facilitadores de la recuperación, en particular situaciones estresantes (Sara y Remacle 1977, Sara et al. 1980, Izquierdo et al. 2001, 2002, Frenkel et al. 2005b). En los experimentos de los capítulos previos, así como en otros trabajos de nuestro grupo de investigación (Frenkel et al. 2005a, 2010a, Cocoz et al. 2011), se ha mostrado que muchas deficiencias en la evocación de una memoria no se deben a deficiencias en la persistencia o el acceso sino a que la memoria que persiste y se reactiva no es capaz de tomar el control del comportamiento. Esta interpretación que proponemos, consecuentemente predice la existencia de un punto de control río abajo de la reactivación de la memoria (Urcelay y Miller 2008). En el marco de la teoría de modulación de la memoria por sistemas extrínsecos a la misma, proponemos además un valor funcional de este punto de control: permitir decidir qué memoria se expresará de aquellas que se reactiven y potencialmente se reevalúen. En este marco, y consistentemente con la evidencia de que muchas situaciones estresantes o que afectan el estado atencional del animal modulan la recuperación de la memoria (Izquierdo et al. 2003, Kuhlmann et al. 2005, Frenkel et al. 2005b), postulamos que este mecanismo de control estaría sujeto a modulación por las mismas situaciones relevantes para la vida del animal que determinan durante la recuperación, positiva o negativamente, el desempeño de una memoria. En otras palabras, este mecanismo de control sería el mecanismo por el cual se modula la evocación de la memoria, en oposición por ejemplo a la facilitación de vías de recuperación o a un aumento en la excitabilidad de trazas residuales. En el modelo de memoria contexto-señal se ha mostrado que el estrés por privación de agua, que puede modular positivamente la reconsolidación de memorias que no se expresan (Frenkel et al. 2005a, 2010a), puede también modular la evocación de memorias que no se expresan (Frenkel et al. 2005b, 2010a). La inhibición tanto del acceso como de la expresión de memorias tiene un claro valor adaptativo al impedir que recuerdos irrelevantes “invadan” el espacio representacional en cualquier momento y que todas las memorias reactivables por un mismo estímulo tomen el control del comportamiento al mismo tiempo (ver por ejemplo el caso clínico de AJ, reportado en Parker et al. 2006, y el caso de Solomon Shereshevsky, Luria 1968, al que me referí en la introducción al capítulo IV).

Un caso muy estudiado de inhibición de la toma de control del comportamiento por una memoria es el caso de la extinción (Myers y Davis, 2002). Sin embargo, es posible atribuir la

falta de toma de control del comportamiento por la memoria extinguida a una competencia entre la memoria extinguida una memoria de extinción, cuyo resultado sería el no acceso a la memoria extinguida. Esta visión se ve favorecida por los trabajos del grupo de Yadin Dudai que muestran que la memoria que domina el comportamiento del animal es la que se vuelve susceptible a la interferencia por agentes amnésicos (Eisenberg et al. 2003). En el caso del olvido, también podría argumentarse que con el paso del tiempo se dificulta el acceso a la información, ya sea por un debilitamiento de la traza mnésica o por el debilitamiento de las claves recordatorio (Bouton 1993). Sin embargo, la idea de que el olvido podría explicarse por una deficiencia de acceso se ve desafiada por los trabajos en condicionamiento pavloviano en humanos del grupo de Rovee-Collier en los que se muestra que la presentación de un recordatorio de una memoria ya olvidada facilita la expresión de esa memoria en una evaluación posterior (Rovee-Collier et al. 1980). Podría argumentarse que la presentación del recordatorio, que también es la clave con la que se va a evaluar la recuperación de la memoria, facilita la reactivación de cualquier representación relacionada con dicho recordatorio, no por una reelaboración de dichas representaciones sino por un aumento en la eficacia de los estímulos recordatorios (cf. con el argumento de las vías de recuperación en los capítulos anteriores). Sin embargo nuestro laboratorio reprodujo los resultados de Rovee-Collier et al. en otro paradigma de memoria asociativa en humanos, en el que se mostró la necesidad de la ruptura de las expectativas del sujeto para recuperar la memoria (Cocoz et al. 2011, 2013). Pero aún cuando en el caso del olvido tengamos un ejemplo de una decisión negativa en la toma del control el comportamiento de una memoria reactivable, esta decisión podría atribuirse al estado de la memoria almacenada en el momento del recordatorio, de manera similar a un entrenamiento débil o un tratamiento amnésico.

En este capítulo me preguntaré acerca de la posibilidad de reactivar una memoria resultante de un entrenamiento completo, evaluada en una edad en la que aún no ha podido ocurrir ningún tipo de degradación de la traza mnésica que impida la recuperación, sin que haya competencia con otras memorias cuya información sea explícitamente contradictoria como en el caso de la extinción; pero que no pueda expresarse por una manipulación directamente en la circunstancia de recuperación. Para ello, y enfocando el interés en manipulaciones de tipo naturalistas, se utilizará un cambio en la información contextual. Se ha estudiado extensamente la dependencia de la memoria contexto-señal de las características visuales del contexto de entrenamiento (Tomsic et al. 1998; ver Tomsic et al. 2009 para una revisión de los trabajos que vinculan esta memoria con circuitos identificados del procesamiento visual), al que se ha propuesto como estímulo condicionado en un modelo pavloviano de esta memoria. Por lo tanto, es muy posible que la deficiencia en la expresión de la memoria al cambiar las claves visuales del contexto sí se deba a una deficiencia en el acceso a la misma⁵⁵. Un mejor candidato a ser un estímulo naturalista modulador de la

⁵⁵ En modelos de memoria asociativa en roedores, se ha mostrado que cuando una memoria asociativa contexto-estímulo incondicionado es recordada en un contexto novedoso por la presentación del estímulo

expresión de la memoria es el cambio en la fase diaria de evaluación. La memoria contexto-señal tiene un fuerte componente circadiano: puede adquirirse y expresarse tanto durante la fase diurna como nocturna; pero requiere de una coincidencia de fases para su expresión. En otras palabras, si los animales son evaluados en tiempos posteriores al aprendizaje que no sean aproximadamente múltiplos de 24 horas, no se ve retención de la memoria (Pereyra et al. 1996). Cambios en el “contexto interno” de un animal han mostrado poder modificar la expresión de la memoria sin afectar su capacidad de reactivarse, pero hasta ahora las manipulaciones utilizadas se han centrado en afectar el estado interno al momento de la adquisición o consolidación de la memoria (por ej. Morgan y Riccio 1994). En este capítulo estudiaré la capacidad de reactivarse de la memoria contexto-señal adquirida durante el día cuando se presenta una clave recordatoria durante la noche, un tiempo en el que la memoria no debería poder expresarse. Para ello se utilizará una metodología similar a la empleada por Morgan y Riccio (1994): se tratará de interferir la memoria en el momento que no se puede expresar, y se evaluará si dicha interferencia ha tenido efecto o no en una evaluación subsiguiente en condiciones donde sí debería expresarse la memoria. A diferencia del trabajo del grupo de Riccio, en el que se empleó la extinción como interferente, aquí se utilizará un recordatorio de poca duración, que debería inducir reconsolidación de la memoria, seguido de una inyección de cicloheximida, un agente que impide la reconsolidación de la memoria contexto-señal (Pedreira et al. 2002, 2003). Este diseño aventaja al de Morgan y Riccio en cuanto nos permite controlar la especificidad del proceso de reconsolidación utilizando recordatorios que labilicen o no la memoria. De esta manera se puede probar si una potencial interferencia con la memoria está mediada por la realización y frustración de una predicción.

La cicloheximida impide la traducción de proteínas en el retículo de células eucariotas, pero no en mitocondrias, interfiriendo sobre todo con la iniciación, aunque podría afectar en menor medida la extensión (Obrig et al. 1971). Aunque es ampliamente utilizada en estudios de memoria con el objeto de estudiar la dependencia de la memoria en procesos de síntesis proteica, su uso ha sido muy discutido ya que puede inducir varios efectos colaterales, como apoptosis o cambios en la actividad de sistemas relacionados con la memoria como el adrenérgico (Gold 2008). Por otro lado, se debe tener especial cuidado al sacar conclusiones a nivel mecanístico utilizando agentes que afecten procesos moleculares que participan de prácticamente todas las funciones de la célula, como ser la síntesis proteica: incorrectamente se puede atribuir a la falta de síntesis de proteínas específicas de memoria, “memorinas”, un efecto secundario producido por la interferencia con procesos no específicos de la memoria pero necesarios para el correcto funcionamiento de la célula (ver argumento del *housekeeping*

incondicionado en aquel nuevo lugar, la memoria (que originalmente no se expresaba) gana la capacidad de expresarse en el nuevo contexto y sólo por un tiempo breve luego del recordatorio (Briggs y Riccio 2008). Usualmente esto es tomado como evidencia de que el fallo en la expresión de la memoria se debió a una deficiencia en el acceso a la información: se requeriría activar un cierto número crítico de “atributos” de la memoria para que toda ella se reactive; el estímulo incondicionado serviría como una clave recordatoria al igual que el contexto, habilitando así la expresión de la memoria reactivada aún cuando falten otros recordatorios. Sin embargo, este efecto no ocurre en el paradigma de memoria contexto-señal (Hermitte et al. 1999, Fustiñana et al. 2013).

celular en Dudai 1992 y Gold 2008). En este capítulo no nos proponemos estudiar los mecanismos celulares de la reconsolidación. Se utilizará cicloheximida por ser una droga barata y de reconocido efecto disruptor de la memoria, en particular de la memoria contexto-señal (Pedreira et al. 1995, 1996, Hermitte et al. 1999) que bien podría ser reemplazada por cualquier otro agente disruptor de la memoria, aún cuando su mecanismo de acción a nivel subcelular fuese desconocido. En función de esto, se controlará la necesidad de la elaboración de una predicción para inducir un efecto amnésico, pero no se realizarán controles referidos a los mecanismos de acción de la cicloheximida, como por ejemplo el clásico control consistente en inyectar el vehículo sin la droga.

Evaluación a contrafase

Evaluación 12 horas post-entrenamiento.

El cambio de fase diaria entre entrenamiento y evaluación impide la expresión comportamental de la memoria contexto-señal (Pereyra et al. 1996). La intención del siguiente experimento es estudiar la recuperación de un engrama formado en las mismas condiciones en que previamente hemos estudiado la consolidación. Por ello se realizará el entrenamiento en la fase diurna, tal como en los experimentos anteriores, y la presentación del recordatorio en la fase nocturna. El experimento se propone evaluar si una memoria que no se expresa durante la evaluación nocturna, puede sin embargo reactivarse. Para ello, se trabajará con dos condiciones que difieren en el tipo de recordatorio en la evaluación nocturna: un recordatorio reforzado y uno sin reforzar. En ambos casos se inyectará a los animales con cicloheximida luego del recordatorio y se los volverá a evaluar al otro día. Tal como se planteó en los experimentos de los capítulos anteriores este diseño, que incluye un par de grupos grupo a los que se les presenta el EVP, cuya observación nos permitirá verificar la falta de expresión de la memoria en la evaluación nocturna. En la última evaluación, en fase diurna, coincidente con la del entrenamiento, será posible observar un potencial efecto amnésico del tratamiento. Tal como se indicó al final de la introducción de este capítulo, el único aspecto del mecanismo de acción del agente amnésico que nos interesa evaluar es su dependencia de la no ocurrencia del estímulo incondicionado. Este aspecto es controlado comparando en la última evaluación al par de grupos recordados con un refuerzo (que cumpliría con las expectativas de la memoria contexto-señal) con el no reforzado (que no cumpliría con dichas expectativas).

Diseño experimental.

El experimento (Fig. V.1, panel superior) se diseñó en dos etapas de dos días cada una, con cuatro tratamientos experimentales, distribuyendo en cada etapa la mitad de los animales de cada tratamiento. De esta manera, al finalizar el experimento, quedarían

conformados cuatro tratamientos de dos días con el número total de animales. El primer día de cada etapa se realizó la *Sesión de Entrenamiento* tal como en los experimentos anteriores: todos los animales fueron expuestos a los actómetros, siendo la mitad de ellos expuestos a 15 presentaciones del EVP (grupos “entrenados”, *E*), y la otra mitad permaneció en los actómetros, recibiendo solamente dos presentaciones del EVP al inicio para establecer los niveles basales de respuesta (grupos “controles”, *C*). La segunda presentación del EVP fue utilizada para distribuir a los animales en grupos de respuesta homogénea (ver discusión de los experimentos con sulfasalazina en el capítulo III). El entrenamiento se realizó entre las 1030 y las 1330, de manera similar a la reportada por Pereyra et al. (1996).

Aproximadamente 12 horas después, entre las 2300 y las 2400, se realizó la *Primera Sesión de Evaluación*, en la que los animales fueron expuestos por 10 minutos al actómetro. La mitad de los animales controles y entrenados recibieron al final de esta exposición una presentación del EVP. De esta manera, quedaron conformados cuatro tratamientos según la manipulación en la *Sesión de Entrenamiento* y según si recibieron el refuerzo (*R+*) o no (*R-*): *C·R-*, *E·R-*, *C·R+* y *E·R+*. Una hora después de la *Primera Sesión de Evaluación*, todos los animales fueron inyectados con cicloheximida (50 µg/animal). La dosis fue elegida en base a pruebas realizadas en trabajos previos y es de las más altas de las que se ha reportado efecto amnésico en este modelo (ver por ejemplo Pérez-Cuesta 2010). Puesto que se han reportado efectos amnésicos del protocolo de inyección (controles de inyección de solución vehículo) cuando ésta se realiza inmediatamente antes o después de una reactivación, en todos los experimentos con drogas aplicadas cercanas a la reactivación en paradigma contexto-señal se evita inyectar en esos tiempos. Como se indicó antes, cualquier agente amnésico podría ser utilizado en este diseño (incluso una inyección de solución vehículo inmediatamente post-reactivación); pero se optó por diferir el tiempo de inyección de la droga para trabajar en condiciones en las que el laboratorio tiene mayor experiencia y evitar así interpretaciones erróneas a partir de posibles efectos colaterales no descritos; ha de tenerse en cuenta que no todo efecto amnésico debe necesariamente explicarse por una interferencia con la consolidación o reconsolidación.

El segundo día, entre las 1200 y las 1330, se realizó la *Segunda Sesión de Evaluación*, en la que todos los animales fueron expuestos al actómetro por 10 minutos y luego se les presentó el EVP para evaluar la expresión de la memoria.

Resultados.

Una observación preliminar de los resultados de los grupos *C·R+* y *E·R+* en la *Primera Sesión de Evaluación* de la primera etapa del experimento, mostró buena retención de la memoria aún cuando el número de animales (N=20) fuese bajo (y por lo tanto, baja la potencia de la prueba). Puesto que no es posible responder a la pregunta formulada si la expresión de la memoria no es interferida por el cambio de fase en que se evaluó a los animales, se optó por no proseguir con la segunda etapa del experimento. Se inyectaron los animales de los *C·R+* y

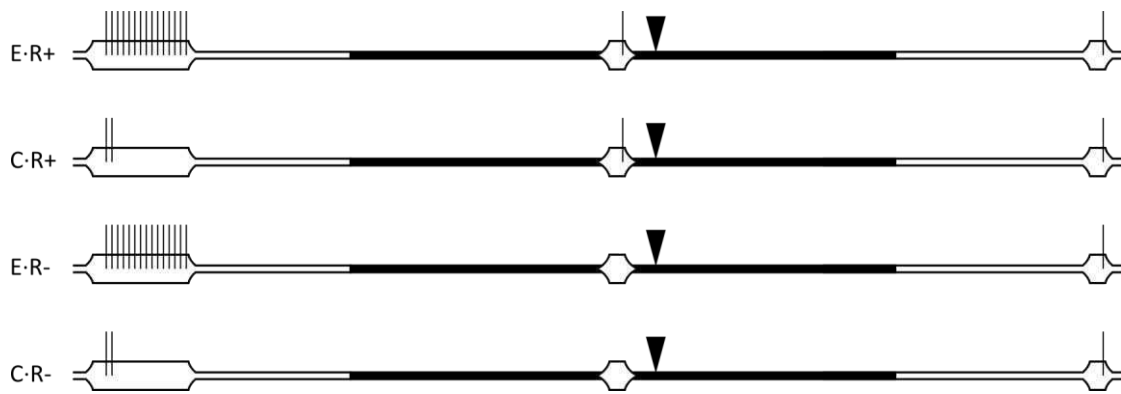


FIG V.1 Evaluación a 12 horas post-entrenamiento: Luego del entrenamiento, los animales expresan la memoria tanto a las 12 como a las 24 horas. Esquema superior: diseño experimental. Los ensanchamientos en la línea de tiempo representan la exposición de los animales al actómetro. Las líneas verticales representan la presentación del EVP. Los tonos de la línea de tiempo representan las distintas fases del día (claro: día, oscuro: noche). Las flechas verticales representan la inyección de cicloheximida. Gráficos inferiores: respuesta de los animales de los grupos R+ en la Primera Sesión de Evaluación (izquierda) y en la Segunda Sesión de Evaluación (derecha). La notación de los grupos según el texto. * representa diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos C y E correspondientes.

E·R+, tal como se había previsto, y se evaluó la respuesta sólo de esos grupos al día siguiente para verificar los niveles de respuesta de los animales en una sesión de evaluación en fase con el entrenamiento y tener así una segunda evidencia de la capacidad de este conjunto particular de animales de mostrar retención con un N tan bajo.

En la *Primera Sesión de Evaluación* (Fig. V.1, panel inferior izquierdo), una prueba t mostró diferencias significativas entre los grupos control y entrenado ($C·R+ > E·R+$; $p < 0,05$). El mismo resultado se repitió en la *Segunda Sesión de Evaluación* ($C·R+ > E·R+$; $p < 0,05$; Fig. V.1, panel inferior derecho).

Conclusiones.

No se pudo reproducir el efecto amnésico reportado por Pereyra et al. (1996) al evaluar a los animales 12 horas luego del entrenamiento, en una fase (nocturna) diferente a la del entrenamiento (diurna). La diferencia entre los grupos control y entrenado fue lo suficientemente importante como para poder ser observada con un número de animales menor al empleado regularmente, y se conservó al día siguiente, de manera consistente con lo esperado si el entrenamiento fue normal. Nótese que esta segunda evaluación no está revisando una hipótesis alternativa a esa interpretación, sino simplemente el desempeño normal de los animales en una situación cuyo resultado es predecible en función del protocolo realizado. No sabemos qué condiciones pueden haber diferido entre este experimento y el realizado previamente por Pereyra et al. pero, teniendo en cuenta la extraordinaria capacidad de los animales empleados en este experimento de mostrar retención de la memoria aún cuando el número de animales es la mitad del empleado tradicionalmente, resulta tentador atribuirle a la muestra particular con la que se trabajó una particular facilidad para evocar y expresar la memoria. Ha de tenerse en cuenta que, al trabajar con animales extraídos de su medio natural, muchos de los factores determinantes de las condiciones iniciales del experimento escapan al control del experimentador, pudiendo producirse grandes variaciones incluso asociadas a capturas particulares.

Evaluación 36 horas post-entrenamiento.

Si la falla en la expresión de la memoria reportada al cambiar la fase entre el entrenamiento y la evaluación se debe a un cambio en las claves contextuales internas del animal, el resultado de buena retención obtenido en el experimento anterior podría explicarse argumentando que las claves entre una fase y otra no cambiaron lo suficiente. Seguramente hay una multitud de elementos contextuales que el experimentador no está controlando explícitamente, y el peso de cada una de ellas en la situación recordatoria puede depender de una multitud de factores que también pueden no estar siendo controlados. Se ha propuesto que el paso del tiempo entre el aprendizaje y la recuperación es un factor que disminuye la

capacidad de las claves recordatorias de reactivar la memoria. Esto podría deberse a dos factores: por un lado el tiempo en sí podría ser una clave contextual, de manera que cuanto más se aleje el tiempo de recuperación del tiempo de adquisición, más diferente será el contexto (Bouton 1993); por otro lado, podría degradarse con el tiempo la información contenida en la traza de memoria ya sea porque como parte de la dinámica natural de una memoria asociativa, esta evoluciona integrándose a redes conceptuales, con pérdida de información contextual específica (Wiltgen y Silva 2007), o ya sea por la competencia con otras memorias. En el siguiente experimento, con la intención tanto de revisar los resultados publicados en Pereyra et al. (1996), como de evaluar la hipótesis original que nos habíamos propuesto en el experimento anterior, repetimos el mismo diseño, pero presentando esta vez las diferentes sesiones por períodos de 36 horas.

Diseño experimental.

El experimento se diseñó de manera similar al anterior, también en dos etapas. Difiere por un lado del anterior en que en este caso los grupos controles tuvieron un solo ensayo en el entrenamiento, que se utilizó para repartir los animales, controles y entrenados, en grupos homogéneos. Pero la diferencia más importante es en el tiempo en que se realizó cada sesión: la *Primera Sesión de Evaluación* se realizó 36 horas después del entrenamiento, entre las 2330 y las 0130. La *Segunda Sesión de Evaluación* se realizó a las 72 horas luego del entrenamiento, es decir 36 horas luego de la *Primera Sesión de Evaluación*, entre las 1400 y las 1500 (Fig. V.2, panel superior).

Resultados.

Los datos fueron analizados para cada una de las sesiones de evaluación de manera independiente. La mortalidad fue elevada (16 animales, es decir el 10% del N total). Esta situación, aunque no se dio en el experimento anterior, es esperable en función de la droga utilizada, que es altamente apoptótica y ha mostrado este tipo de efectos en otros experimentos. La mayoría de los animales murió luego del tratamiento con la droga (uno sólo murió antes de la Primera Sesión de Evaluación) y las muertes fueron acompañadas de procesos de autotomía, síntoma típico de la intoxicación por cicloheximida. Cuatro animales sufrieron autotomía sin llegar a morir. Todos los datos de animales muertos o que mostraron pérdida de extremidades fueron eliminados del experimento.

En la Primera Sesión de Evaluación, 36 horas después del entrenamiento, una prueba de t entre los grupos *C·R+* y *E·R+* no mostró diferencias significativas ($p > 0,49$; Fig. V.2, panel inferior izquierdo). En la Segunda Sesión de Evaluación, 36 horas después de la primera, contrastes ortogonales entre los grupos controles y entrenados sujetos a los distintos tipos de recordatorio en la sesión anterior mostraron buena retención de la memoria para el par reexpuesto a un recordatorio sin refuerzo (*C·R-* > *E·R-*; $p < 0,05$) y un efecto no significativo al

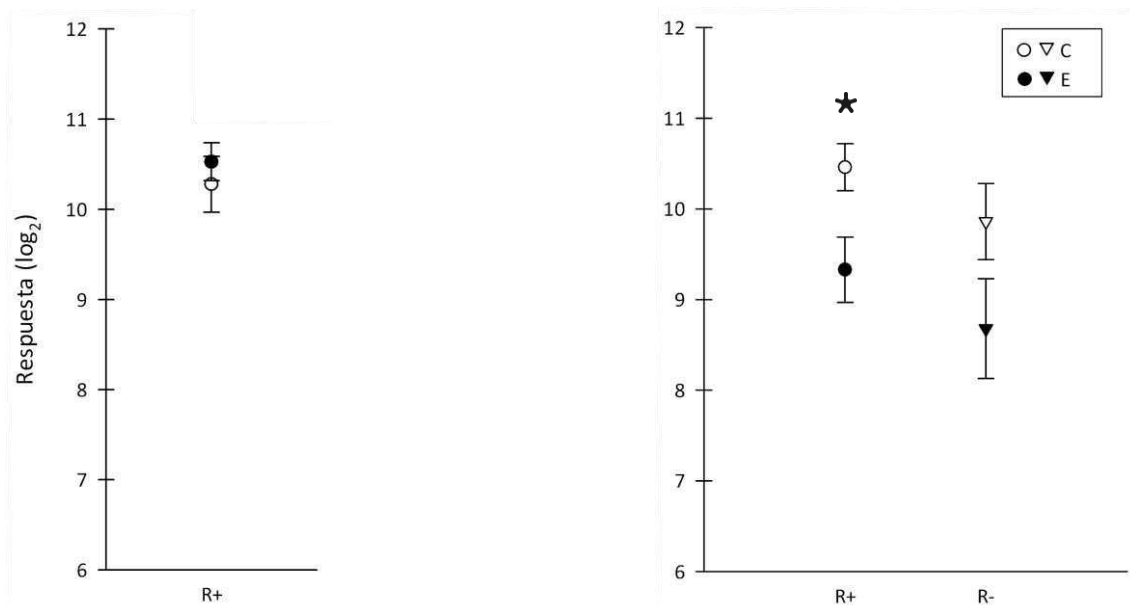
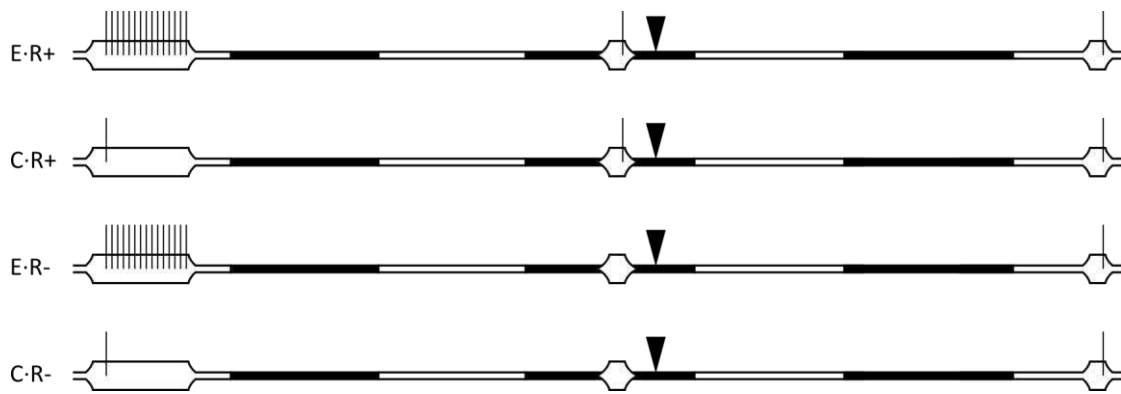


FIG V.2 Evaluación a 36 horas post-entrenamiento: Luego del entrenamiento, los animales no expresan la memoria a las 36 horas, en contrafase con el entrenamiento, pero sí a las 72 horas. La inyección de cicloheximida no afecta la expresión de la memoria, aún cuando es administrada luego de un recordatorio sin refuerzo. Esquema superior: diseño experimental (ídem la figura anterior). Gráficos inferiores: respuesta de los animales en la Primera Sesión de Evaluación (izquierda) y en la Segunda Sesión de Evaluación (derecha). La notación de los grupos según el texto. * representa diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos C y E correspondientes.

5%, pero sí con un α del 10% entre los grupos expuestos a un recordatorio reforzado ($C \cdot R+$ > $E \cdot R+$; $p = 0,06$). La prueba de Tuckey luego de ANOVA ($F(3,103) = 3,22$; $p < 0,05$) sólo detectó diferencias entre los grupos $E \cdot R-$ y $C \cdot R+$; en particular no se detectó ninguna diferencia entre los controles (Fig. V.2, panel inferior derecho).

Conclusiones.

En este experimento se reprodujo la observación publicada previamente por Pereyra et al. (1996), en la que un cambio en la fase circadiana entre entrenamiento y evaluación produce un efecto amnésico. Contrario a lo predicho por nuestra hipótesis, no encontramos ninguna evidencia de que la memoria que no se expresó en la evaluación nocturna se haya reactivado: la inyección de cicloheximida, en una dosis lo suficientemente alta como para observar un alto índice de mortalidad, no tuvo efecto amnésico cuando fue administrada luego del recordatorio, aún cuando éste no fuera reforzado y cumpliera por lo tanto con las condiciones paramétricas para inducir la labilización de una memoria reactivada.

Discusión del Capítulo V.

En este capítulo se evaluó la posibilidad de inducir amnesia en una memoria cuando se presenta un recordatorio en condiciones en que la misma no se expresa. En un trabajo del grupo de Karim Nader se observó que el antagonismo receptores de glutamato de tipo AMPA produce una inhibición de la expresión de la memoria, pero sin embargo ésta es susceptible a disrupción por la inyección de un inhibidor de síntesis proteica (Ben Mamou et al. 2006). El mismo resultado fue reproducido muy recientemente por dos laboratorios (Rodríguez-Ortiz et al. 2012, Milton et al. 2013). En uno de estos trabajos, además, se observa una situación similar cuando se antagoniza el subtipo Glu-N2A de receptor NMDA, aunque la resolución de los experimentos no permitió sacar conclusiones estadísticamente relevantes (Milton et al. 2013). También el muscimol, un agonista de receptores de GABA, puede impedir la expresión de la memoria sin afectar la susceptibilidad de ésta a la inhibición de síntesis proteica (Balderas et al. 2013). En un trabajo de nuestro grupo, realizamos una aproximación similar pero con los resultados contrarios a los del grupo de Nader: mientras que la inhibición de los receptores de tipo AMPA no llegó a tener ningún efecto en la expresión de la memoria (se utilizó sin embargo una única dosis), la inhibición de los receptores de tipo NMDA impidió tanto la expresión de la memoria como su reconsolidación (Barreiro et al. 2013). En este trabajo no fue necesario utilizar un inhibidor de síntesis proteica; la misma droga que impidió la expresión, impidió además la reconsolidación. Estos resultados apoyan la idea de que la expresión, la desestabilización y la reestabilización de la traza de memoria son determinadas por mecanismos en paralelo (Milton et al. 2013, Barreiro et al. 2013). Sin embargo, queda aún por determinar si este circuito en paralelo está bajo el control de la experiencia concurrente, o si

una vez iniciado se activarán las vías que correspondan según el estado de la memoria, determinado durante la consolidación o como consecuencia del olvido. Los experimentos presentados en este capítulo no permitieron observar que dicha regulación estuviese ocurriendo cuando la memoria no se expresaba durante un cambio en la fase circadiana entre el entrenamiento y la evaluación. Sin embargo, la memoria se encontraba almacenada en ese momento, como surge de la evaluación 36 horas más tarde, en fase coincidente con la del entrenamiento. Por lo tanto podemos decir que en este caso la memoria que no se expresó tampoco se desestabilizó. Esto apoya la interpretación que se hace en muchos casos de “dependencia de estado”, que sugiere que la traza de memoria no puede ser reactivada por una deficiencia en el acceso a la misma. Sin embargo resulta extraño que la exposición visual a la arena experimental no haya sido suficiente para reactivar la traza de memoria si se tiene en cuenta que los animales no tuvieron otra exposición al actómetro que la del entrenamiento y que la memoria contexto-señal tiene componentes fuertemente visuales (Tomsic et al. 2009). Una explicación sencilla para este tipo de deficiencia en el acceso la provee una variante del modelo de especificidad de codificación que propone que no es el número de claves coincidentes entre el entrenamiento y la evaluación lo que determina el acceso a la memoria, sino su coherencia (Rovee-Collier et al. 1985, Gisquet-Verrier 1992). Si el Estímulo Visual de Peligro emula a un predador, que es asociado con el contexto en donde aparece, el momento del día debería ser una clave contextual relevante, puesto que un mismo lugar peligroso en el momento de actividad del predador podría ser un nicho valioso cuando el predador se encuentra inactivo o explotando otros nichos. En este sentido, es probable que la deficiencia haya sido causada no sólo por la ausencia de la fase circadiana adecuada, sino por el reemplazo de ésta por una fase que no se corresponde a la del entrenamiento. Esta interpretación se ve fortalecida por el hecho de que el efecto amnésico del cambio de fase se observó a 36 pero no a 12 horas: si el tiempo absoluto que transcurre entre el entrenamiento y la evaluación es un componente importante de las claves contextuales (Bouton 1993) entonces aún cuando en los dos tiempos en que se evaluó la memoria la fase sea contraria a la del entrenamiento, a 36 horas las diferencias de contexto deberían ser mayores. En un paradigma de memoria explícita en rata, se ha propuesto que el paso del tiempo disminuye la expresión de la memoria por una disminución del componente de familiaridad pero no del de recolección (Fortin et al. 2004, Eichenbaum y Fortin 2009). En otras palabras, sería más difícil para los animales reconocer las claves necesarias para identificar la información relevante y acceder a ésta, aún cuando esté almacenada. Sin embargo, esta interpretación del grupo de Eichenbaum que apoya la interpretación de la falta de reactivación de la memoria almacenada y amnésica durante la contrafase, al mismo tiempo que explica por qué la amnesia a contrafase no se vio a sólo 12 horas del entrenamiento, no se condice con la explicación del fenómeno de olvido que nuestro grupo ha propuesto para ciertos resultados en un paradigma de memoria explícita en humanos (Cocoz et al. 2011, 2013).

Interesantemente, un artículo de Holloway y Wansley (1973) en la revista *Science* muestra deficiencias en la expresión de la memoria durante varios días a 6 horas luego del

entrenamiento y en los múltiplos de 12 horas siguientes a las 6 pero, contrariamente a lo publicado por nuestro laboratorio, buena retención en los múltiplos de 12 horas luego del entrenamiento. La interpretación más adecuada a los resultados que proponen los investigadores es que el entrenamiento inicia un proceso periódico que persiste durante varios días. Evidencias de mecanismos necesarios para el mantenimiento de la memoria que se inician en tiempos mayores a los de los clásicos mecanismos de “consolidación celular” han sido mostradas recientemente por otro laboratorio de la Universidad de Buenos Aires (Bekinschtein et al. 2007). Puesto que las ventanas temporales en que ocurren los distintos fenómenos de memoria no son fijas sino que parecen depender –aún en las mismas especies y paradigmas experimentales– de diversos parámetros experimentales aún no del todo identificados⁵⁶, parece razonable pensar que la falta de retención informada previamente por Pereyra et al. (1996) no se reprodujo en nuestros experimentos debido a cambios en los parámetros de los mismos, teniendo en cuenta que en los casi veinte años que separan ambos proyectos se debieron acumular muchos pequeños cambios tanto en los equipos empleados como en la población de cangrejos con la que se trabaja.

⁵⁶ Cf. la literatura respecto del “*efecto Kamin*”, como se denomina formalmente a la falta de retención en ventanas acotadas de tiempo. En particular, el grupo de James McGaugh reportó datos contradictorios con los de Holloway y Wansley, utilizando el mismo paradigma experimental (Power et al. 2006). Es interesante la discusión planteada por Nader et al. (2005) con respecto a las consecuencias de esta susceptibilidad de los mecanismos de consolidación a condiciones paramétricas sobre la argumentación en torno a la teoría de consolidación.

VI.

Discusión

Capítulo VI

Discusión

A causa de las condiciones en las que se adquiere determinada información, de un trauma o solamente del paso del tiempo, la información adquirida puede no expresarse en el largo plazo. Entender los mecanismos que producen este fenómeno es uno de los objetivos fundamentales de las ciencias del comportamiento. La memoria es uno de los determinantes de nuestra personalidad, y en ese sentido la “regulación” de nuestros recuerdos, la determinación no sólo de lo que recordamos sino de lo que olvidamos, es lo que nos determina como personas. Deficiencias en la expresión de una memoria pueden ocurrir en casos patológicos asociados a enfermedades, accidentes o vejez, e incluso la expresión aumentada de una memoria puede incurrir en situaciones patológicas, como en el caso de las fobias o el estrés post-traumático. Comprender los mecanismos, en todos los niveles de organización, que dan forma a la memoria durante sus fases lábiles no sólo nos permitirá una mayor comprensión de nosotros mismos, sino que nos permitirá desarrollar las herramientas para combatir una serie de situaciones patológicas, incluyendo aquellas asociadas a la vejez. Si se desea mejorar la situación de un paciente con una deficiencia en su memoria, tanto la estrategia terapéutica a seguir como las posibilidades de mejora a la que el paciente puede aspirar, no serán las mismas si se trata de una situación en donde la información se ha perdido o de una en la que la información se conserva latente, almacenada pero sin poder expresarse. De la misma manera, la lesión de una memoria durante una fase lábil puede ser una estrategia para interferir la expresión patológica de un comportamiento (Brunet et al. 2008, Schwabe et al. 2014). Sin embargo, el seguimiento de un paciente no deberá ser el mismo si dicha memoria ha sido irreversiblemente destruida o si tan sólo se ha ocluido su expresión.

La posición escogida en la mayoría de los estudios, sobre todo aquellos que utilizan la inducción de amnesias experimentales en modelos animales, es la de asumir una deficiencia en la persistencia de la memoria como la explicación más parsimoniosa para la falta de expresión comportamental de la misma. Esta posición tiene la ventaja de ofrecer un marco epistemológico sencillo para estudiar procesos mecanísticos, es decir que se definen en un nivel de organización inferior al de la memoria: cuando la no ocurrencia del comportamiento asociado a una memoria es la prueba de la no existencia de dicha memoria, entonces es posible determinar aquellos procesos –en los niveles, por ejemplo, celular o subcelular– que son necesarios o suficientes para la formación y persistencia de la memoria. Esta posición, aunque tiene la ventaja de permitir interpretar sencillos experimentos de manera contundente, tiene la desventaja de ser falsa *a priori* (Dudai 1992, Cahill et al. 2001). El concepto de deficiencia de almacenamiento se construyó junto con los conceptos de consolidación y de sistemas moduladores extrínsecos: la formación de una memoria implicaría un proceso de fijación o estabilización, que sucedería en un tiempo acotado, pasado el cual la memoria sería insensible a tratamientos disruptores (Chevalier 1965, McGaugh 1966, Cherkin 1972, McGaugh 2000). Durante el período de fijación, los mecanismos de formación de la memoria podrían ser

afectados por las acciones excitatorias o inhibitorias de sistemas que no participan de la formación del engrama, pero que responden a las necesidades del individuo, determinadas por su contexto ecológico y por su historia evolutiva (McGaugh 1966, 1983, 2000, Cahill y McGaugh 1996).

Como alternativa a las deficiencias en el almacenamiento, se ha propuesto que los agentes amnésicos podrían actuar luego del aprendizaje interfiriendo la consolidación de vías de recuperación. Esta visión plantea la adquisición como la formación de un “archivo” de información específica acerca de la experiencia. Son necesarios dos procesos: uno de codificación de la información que se archiva, que se supone ocurriría en una escala temporal muy breve, casi simultánea a la percepción de la experiencia que produce el aprendizaje (Lewis et al. 1968, Miller y Matzel 2006), y un segundo proceso en el que se marca la información archivada de manera que sea fácilmente accesible y recuperable por un estímulo relacionado con dicha experiencia (Lewis 1969). En el caso de un entrenamiento débil, la experiencia proveería de la información suficiente para desarrollar la respuesta comportamental propia de lo aprendido (por ejemplo congelarse cuando se predice un ataque de un posible predador), pero sería necesario un entrenamiento extenso o la acción de sistemas moduladores para aumentar la probabilidad de ocurrencia de esa respuesta (Miller y Springer 1974). De manera similar, muchos agentes amnésicos podrían actuar sobre la formación de esta vía de recuperación, de manera de hacer la información “archivada” inaccesible para su recuperación.

Los experimentos iniciales que mostraron un caso de modulación positiva de la reconsolidación en *Neohelice* fueron interpretados como una mejora en la fuerza de la memoria almacenada (Frenkel et al. 2005a). Sin embargo, el término “fuerza” se significaba bajo el paradigma dominante en ese entonces de deficiencias en el almacenamiento de la información (por ej. Summers et al. 2000). Según este paradigma, la reconsolidación permitiría mejorar una traza residual resultante del entrenamiento débil. Que la no ocurrencia del refuerzo durante la reactivación de la memoria fuese condición necesaria para observar el efecto facilitador era considerado tan sólo un control más de la reconsolidación, a título de descartar efectos del estrés en la evaluación última de los animales. Sin embargo, en el marco teórico que propone un error de predicción como iniciador de la reconsolidación, la necesidad de un recordatorio no reforzado para producir la facilitación de la memoria reactivada conduce a un escenario que no puede ser explicado por ninguno de los paradigmas dominantes: la información adquirida debe persistir intacta y ser accesible durante el recordatorio para poder realizar la predicción que no se cumple.

Un modelo para explicar los cambios en la expresabilidad de la memoria: la “etiqueta de expresión”.

Se han propuesto varios modelos para explicar la naturaleza de las amnesias experimentales en función de las distintas evidencias encontradas, bajo la premisa de que entender los efectos de las manipulaciones disruptivas sobre la memoria nos llevará a entender la misma memoria. Esencialmente, como se indicó más arriba, podemos clasificar a todos estos modelos en dos categorías: los que explican la amnesia como una deficiencia en el almacenamiento y, o, en la persistencia de la memoria y los que la explican como una deficiencia en su recuperación. Los modelos de almacenamiento/persistencia explican la amnesia como un problema de disponibilidad de la información: puesto que la información no fue correctamente adquirida o consolidada, en el momento de la evaluación no existe la información propia de la experiencia comportamental que se pretende evaluar. Los modelos de recuperación, en su mayoría, explican la amnesia como un problema de accesibilidad: la información está almacenada pero no se puede acceder a ella durante la evaluación. Estos dos tipos de modelos asumen que si la memoria está disponible y además es accesible, debería expresarse ante la presencia de un estímulo recordatorio. Al final de la Tesis se presenta un Apéndice con una descripción de los modelos más clásicos de deficiencias en el almacenamiento y en la recuperación, incluyendo un modelo de recuperación que propone un control de la expresión de la información accedida; así como los argumentos puntuales por los que descartamos cada modelo como explicación suficiente para nuestros resultados. Brevemente, los modelos de deficiencias en el almacenamiento fallan en explicar los resultados obtenidos en esta Tesis en cuanto que estos muestran que, en el momento en que los animales se encuentran amnésicos, existe una representación de la asociación entre el Estímulo Visual de Peligro y el actómetro suficientemente intacta como para elaborar la predicción de la ocurrencia del estímulo incondicionado. Los modelos de deficiencias en la recuperación fallan en cuanto que nuestros resultados muestran que el acceso a la información adquirida ocurre, puesto que se predice la ocurrencia del estímulo incondicionado y se reelabora la información almacenada. Además, la expresión del comportamiento depende en estos casos de la información almacenada y no de la interacción de ésta con el recordatorio, siendo que por ejemplo la cantidad de claves presentes en el recordatorio no afecta la expresión de la memoria e incluso afecta la reelaboración de la información de manera inversa a la que se esperaría según un modelo de aditividad o de coherencia de claves (ver Apéndice).

En función de la reinterpretación de resultados previos de nuestro grupo (Frenkel et al. 2005a, 2010a) y para explicar los presentados en esta Tesis y otros que fueron obtenidos en simultáneo con la elaboración de ésta por nuestro grupo (Coccoz et al. 2011, 2013, Barreiro et al. 2013), así como los que fueron publicados recientemente en roedores (Blake et al. 2012, 2013, Gazarini et al. 2013), proponemos un modelo, que desarrollaré a continuación, para dar cuenta de la naturaleza de las amnesias observadas y de su capacidad de revertirse. Por un lado, puesto que la información necesaria para el comportamiento del animal debe estar

disponible al momento de elaborar la predicción, proponemos que la deficiencia en la expresión comportamental de dicha información corresponde a una deficiencia en la recuperación de una memoria disponible y accesible.



De la naturaleza de las amnesias experimentales. Tres posibles causas de una deficiencia en el comportamiento luego de un tratamiento amnésico: En la columna de la izquierda, fallas en la adquisición o en la consolidación no permiten que se genere un engrama consolidado que persiste en el largo plazo y que puede ser reactivado por un recordatorio. En la columna del medio, los clásicos modelos de deficiencias de recuperación proponen que persiste un engrama consolidado pero el recordatorio no es capaz de reactivarlo. En ambos casos, tanto la expresión como la actualización de la información son imposibles puesto que el proceso se interrumpe antes de llegar a una traza activa. En el modelo de la derecha, la traza activa tiene la posibilidad de volverse lábil y actualizarse (dadas las condiciones adecuadas, como un error de predicción) pero no se puede expresar.

Si bien en esta Tesis no se ha verificado que la reversión del efecto amnésico necesite del estrés hídrico, en trabajos previos, en los que se mejoró la expresión de la memoria luego de un entrenamiento débil o de amnesia inducida por saralasin, se mostró que dicha mejora no ocurría si los animales no eran expuestos a la situación estresante de manera contingente con la reactivación de la memoria (Frenkel et al. 2005a, 2010a). En los experimentos realizados en el paradigma de memoria declarativa en humanos desarrollado en nuestro laboratorio se observó que una memoria que fallaba en expresarse a causa del paso del tiempo podía mejorarse si de manera contingente a la reactivación se presentaba a los sujetos un estímulo doloroso o se les administraba glucosa. En estos experimentos, en los que también se evaluó la necesidad del error de predicción, dicha mejora no ocurría si no se aplicaba el tratamiento correspondiente (Cocoz et al. 2011, 2013). El estímulo doloroso utilizado en esos experimentos facilita la consolidación de la memoria y se ha propuesto que lo hace a través de un aumento en el cortisol circulante (Cahill et al. 2003); mientras que la glucosa es un conocido modulador tanto de la consolidación como de la reconsolidación en roedores y su acción

estaría mediada por receptores fuera del sistema nervioso central (Rodríguez et al. 1999), por lo que se la considera un modulador extrínseco. En ratas, además de probarse la facilitación de la reconsolidación por glucosa, se ha probado la facilitación de una memoria de miedo por la actividad noradrenérgica (Gazarini et al. 2013), que orquestaría varias respuestas fisiológicas a situaciones estresantes, incluyendo la modulación endógena de memorias asociativas (McGaugh 2002, LeDoux 2007). En ratones se ha observado, al igual que en los resultados discutidos en el capítulo III, que la amnesia inducida por escopolamina puede ser revertida por la facilitación de la reconsolidación, en este caso utilizando colina como modulador (Blake et al. 2012). El sistema colinérgico muestra interacciones en su acción sobre la memoria con otros sistemas que se consideran de modulación extrínseca (ver discusión del capítulo III). Estas evidencias sugieren que la naturaleza de las amnesias experimentales que pueden ser revertidas con la metodología propuesta en esta Tesis, así como las propias reversiones de dichas amnesias, deberían ser explicadas en el marco de la teoría de modulación extrínseca de la memoria; aunque dicha teoría fue propuesta en bajo la idea de una consolidación definitiva (que ocurre sólo una vez) y apoyando las deficiencias de almacenamiento como explicación para este tipo de fenómenos. En función de lo dicho, proponemos una versión extendida de la teoría clásica de la modulación extrínseca de la consolidación que postula una acción de los sistemas moduladores, durante la consolidación, en los mecanismos de recuperación de la memoria, de forma tal que dicha teoría pueda abarcar ahora tanto deficiencias en la persistencia de la memoria como en su recuperación. En el modelo tradicional de modulación de la consolidación, los sistemas moduladores actúan sobre cambios plásticos en un sistema neuronal que codifica una información específica, como la asociación entre dos estímulos, de manera que determinan la reactividad de dicho sistema. Es decir, determinan la probabilidad de que la representación se reactive dada una entrada de información en el sistema que la codifica. Si la representación se reactiva, el comportamiento ocurrirá como consecuencia de dicha activación. En nuestro modelo, proponemos la existencia de un punto de control de la expresión de la memoria río abajo de la representación específica de elemento a recordar⁵⁷; un mecanismo de “toma de decisiones” que determina si la información activada puede afectar o no a circuitos río abajo de dicha representación que causan el comportamiento del animal. Proponemos además la existencia de una representación de la expresión misma de la memoria: un sistema accesorio al que codifica la información que potencialmente guiará el comportamiento, cuya función es determinar la probabilidad de expresión de la memoria. Este sistema accesorio, que denominamos “etiqueta de expresión” bien podría participar del mismo mecanismo de toma de decisiones que decide la salida de información del sistema de memoria, o podría ser un sistema en paralelo que module la acción de la compuerta de salida de la información. La etiqueta de expresión, al igual que la parte de la traza de memoria que codifica la información específica a recordar (por ejemplo la asociación actómetro-EVP), debe transcurrir por cambios plásticos, puesto que también codifica parte de la información adquirida

⁵⁷ “*item to be remembered*” (T. del A.). En la memoria contexto-señal, la asociación entre el actómetro y el Estímulo Visual de Peligro.

por la experiencia: la “relevancia” de la memoria, reflejada en su capacidad de ser expresada ante diferentes recordatorios. Por lo tanto, la etiqueta y el “núcleo” de la traza mnésica compartirán parte de los mecanismos necesarios para los cambios plásticos. Uno de estos mecanismos podría requerir de la síntesis de proteínas (Frenkel et al. 2010a), en particular la inducida por la activación del factor de transcripción κ B, que se activa como consecuencia de la privación de agua (Frenkel et al. 2002), pero su inhibición induce una amnesia irreversible (resultados del capítulo III). Sin embargo, puesto que la etiqueta de expresión codifica información cualitativamente diferente a la del núcleo de la traza mnésica, que es censada por otros sistemas (por ejemplo sistemas atencionales o involucrados en respuestas a estrés), postulamos también la existencia de mecanismos diferenciales en la determinación de la expresión de la memoria. Que la escopolamina inyectada de manera sistémica produzca una deficiencia en la expresión de la memoria, sin impedir la elaboración de la predicción específica de la asociación codificada (capítulo III), implicaría que la señalización colinérgica mediada por receptores muscarínicos podría afectar diferencialmente la expresión de la memoria contexto-señal sin afectar la formación de las representaciones internas del actómetro, del Estímulo Visual de Peligro ni de la asociación de ambos. Este mecanismo colinérgico podría estar conservado en memorias asociativas aversivas en mamíferos (Blake et al. 2012).

De los mecanismos que determinan la expresión de una memoria:

Uno de los objetivos que nos hemos propuesto en esta Tesis es el de echar luz sobre los mecanismos que determinan que una memoria se exprese o no en el largo término. Aunque la modulación de la consolidación de la memoria es un tópico largamente estudiado (McGaugh 1983, Cahill y McGaugh 1996, McGaugh y Roozendaal 2008), la mayoría de los trabajos culmina con la demostración de un efecto amnésico o facilitador y no se cuestiona la naturaleza de la traza amnésica o de la memoria aún no facilitada. Los estudios sobre la posibilidad de revertir efectos amnésicos o recuperar memorias “débiles” apuntaron siempre⁵⁸ a criticar la versión más ortodoxa de la consolidación poniendo el énfasis en la persistencia de una traza luego del tratamiento amnésico o del entrenamiento débil, pero pasaron por alto el posible valor funcional de la facilitación de la expresión, que se vio más como una metodología de laboratorio para revertir amnesias que como un proceso biológico de interés científico por derecho propio (por ej. Lewis 1969, Miller y Springer 1974, Miller y Matzel 2006). La modulación de la memoria mediada por un proceso que requiere de la reactivación de la memoria a facilitar, como la extinción o la reconsolidación, permite discernir entre los cambios en la “expresabilidad” de la memoria como propiedad intrínseca de la misma, de los cambios

⁵⁸ Varios estudios, sobre todos los de Ralph Miller, han puesto énfasis en la funcionalidad de las memorias almacenadas que no se expresan pero, viniendo de la escuela de la psicología experimental más tradicional, muy apartada de la neurobiología, los intentos de describir mecanísticamente este fenómeno refieren exclusivamente a los cómputos por los que se procesa la información, es decir no descienden del nivel de la representación interna (por ej. Urcelay y Miller 2008).

debidos a la interacción con otras representaciones internas sin que se modifique el engrama bajo estudio, como ser la sumación de memorias (Cherkin 1972, Gold et al. 1973, Gold y King 1974), cambios en la reactividad de circuitos producidos durante la ventana de acción de los moduladores o cambios atencionales, o efectos de cebación⁵⁹, que podrían deberse a la acción combinada de todos los anteriores. El único estudio del que tenemos noticia que usó la extinción como aproximación experimental estuvo orientado a poner en evidencia el fenómeno, es decir a mostrar que se puede modificar una memoria ocluida, pero no trató de explorar los mecanismos subyacentes (Morgan y Riccio 1994). En este estudio se utilizó como agente modulador el enfriamiento de los animales aplicado previamente al entrenamiento, lo que no permite discernir entre los efectos sobre la adquisición y sobre la consolidación.

Sin embargo, muchos de los estudios han mostrado la posibilidad de facilitar una memoria que no puede tomar el control del comportamiento, o lo hace con un desempeño claramente disminuido, por medio de la presentación de un recordatorio en condiciones que podrían interpretarse en función de un proceso de reconsolidación⁶⁰. La modulación positiva de la reconsolidación, es decir la facilitación de la memoria dependiente de un recordatorio, es conocida desde hace largo tiempo, siendo que se describió casi una década después que la amnesia dependiente de recordatorio (DeVietti y Kirkpatrick 1977). Durante la década del 90' el grupo de Padilla trabajó ampliamente este fenómeno induciendo modificaciones de la memoria reactivada con cocaína (Rodríguez et al. 1993) o azúcares (Rodríguez et al. 1999). En particular, con respecto a la modulación de la reconsolidación por azúcares, este grupo mostró que tanto la glucosa como la fructosa, inyectadas sistémicamente en ratas, pueden modular positivamente una memoria ya consolidada cuando es reactivada, que las curvas de facilitación en función del tiempo son similares para ambas sustancias y que un compuesto de los dos azúcares es menos efectivo que una dosis equivalente de un sólo tipo de azúcar (Rodríguez et al. 1999). Puesto que la glucosa, a diferencia de la fructosa, atraviesa directamente la barrera hematoencefálica, y que ambas sustancias producen el mismo aporte metabólico en términos de ATP, la interpretación más parsimoniosa de estos resultados es que la modulación de la memoria no se debe a la llegada directa de estos nutrientes a las células involucradas en la formación de la memoria, sino que dichas sustancias son detectadas por algún sensor extrínseco (véase la definición de sistema extrínseco en el capítulo I), periférico, que envía información a los sistemas de memoria. Ésta es posiblemente una de las evidencias más fuertes de la existencia de sistemas extrínsecos dedicados a la determinación de la expresión de la memoria. En *Neohelice*, en el modelo de memoria contexto-señal, se ha probado el efecto modulador de la reconsolidación por estrés hídrico (Frenkel et al. 2005a, Frenkel et al. 2010a), que estaría mediado por la acción del sistema angiotensinérgico (Frenkel et al. 2002, 2010a, 2010b; ver descripción de la privación de agua en el capítulo II). Se mostró en el capítulo III que

⁵⁹ “priming”, T. del A.

⁶⁰ Como se comentó en la Introducción y a lo largo de la Tesis, este trabajo se diferencia de los anteriores en el uso de controles específicos de la reconsolidación. Los trabajos que referiré a continuación utilizan protocolos que hoy día serían interpretados en función de un proceso de reconsolidación, pero cuyas conclusiones han sido muy discutidas al no descartar interpretaciones alternativas como la sumación de trazas (Gold et al. 1973).

la aplicación inmediatamente post-entrenamiento de un antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos causa amnesia, tal como se describió previamente (Berón de Astrada y Maldonado 1999), pero que ésta puede ser revertida si se permite a los animales explorar la arena experimental. Puesto que se rescató la memoria con un desempeño intacto de los animales luego de una sesión de reactivación que no implica un reentrenamiento completo, proponemos que la escopolamina interfirió con los mecanismos necesarios para la expresión de la memoria sin afectar la persistencia de la misma. Uno de los argumentos más fuertes esgrimidos en contra de esta interpretación ha sido el argumento de sumación, que plantea que el protocolo que induce un aparente rescate de la amnesia, induce un nuevo aprendizaje que “se suma” a la memoria residual resultante de una amnesia incompleta. Este argumento difícilmente puede explicar algunos casos que han llegado a las mismas conclusiones, como el de la amnesia inducida por puromicina, que puede ser revertida por inyecciones intracerebrales de solución salina (Flexner y Flexner 1967); pero que han quedado como “casos raros” en la historia de las amnesias experimentales, posiblemente por la falta de explicaciones mecánicas para estos fenómenos. El diseño experimental presentado en el capítulo tercero de esta Tesis apuntó a controlar específicamente esta hipótesis alternativa. La reversión del efecto amnésico en este caso se produce sólo ante la ausencia del estímulo incondicionado. La hipótesis de sumación predice exactamente el efecto contrario: tanto los animales que son presentados con el refuerzo, como los que no lo son, tienen el mismo acceso a claves que se podrían sumar a una traza residual como aquellas relacionadas con el contexto o con la situación experimental (ser manipulados por el experimentador, etc.); sin embargo, los animales tratados con un refuerzo tienen además acceso a claves adicionales como ser aquellas relacionadas con el Estímulo Visual de Peligro o incluso con la contingencia de este con el contexto de entrenamiento. Es decir que son presentados con un reentrenamiento, y aún así no se ve una mejora en el desempeño de los animales. La mejora ocurre solamente en ausencia del refuerzo, una condición que interpretamos en el marco planteado previamente por el Dr. Maldonado y que ha sido reproducida en otros modelos experimentales (Forcato et al. 2007, Sevenster et al. 2012), que plantea que la ausencia del refuerzo implica una frustración de la predicción que se genera cuando los animales son presentados con el recordatorio. Por lo tanto, no sólo concluimos que persiste una traza residual luego del tratamiento con escopolamina, sino que dicha traza residual es reactivada por un recordatorio, genera una predicción que es evaluada en función de la experiencia concurrente con la recuperación, y puede entrar en la fase de reconsolidación y ser reelaborada, eventualmente recuperando la posibilidad de tomar el control del comportamiento. Por lo tanto, podemos decir que esta droga afectó la capacidad de expresarse de la memoria sin afectar su adquisición ni su persistencia. La escopolamina es un antagonista competitivo de receptores muscarínicos. Tal como se indicó en el capítulo III, es prematuro aún sacar conclusiones mecánicas terminantes acerca del rol de los receptores muscarínicos en este proceso, a partir del empleo de una única droga y en ausencia de una descripción más profunda del sistema colinérgico en la especie empleada. Sin embargo, estos resultados preliminares parecen apuntar a estos receptores si

se toman en el contexto de experimentos realizados con la misma droga en ratones, donde el rol de estos receptores en la memoria ha sido mucho más estudiado⁶¹ (Blake et al. 2012). No podemos inferir aún a partir de nuestros resultados si los receptores muscarínicos juegan un rol directamente en la construcción de la expresión de la memoria como atributo de la misma, o si participan río arriba, a través de un rol en la modulación de dicho atributo. La segunda opción tal vez sea la más apropiada si se tiene en cuenta que esta droga tiene efectos atencionales (Dunne y Hartley 1986), sus efectos amnésicos pueden ser revertidos por tratamientos sobre los sistemas opiáceo (Rush 1986) o angiotensinérgico (Dennes y Barnes 1993)⁶² e interfiere con los efectos del estrés sobre memorias hipocampales, aún aplicada directamente en la amígdala (Decker y McGaugh 1989, Decker et al. 1990b, Power et al. 2000).

Uno de los sistemas de modulación extrínseca de la consolidación de la memoria más estudiados es el sistema de modulación por estrés mediado por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Brevemente, se considera que un aumento en la secreción de adrenalina por la glándula adrenal es detectado por el nervio vago y, esta información es enviada a través de una serie de núcleos, hasta culminar en la liberación de noradrenalina sobre receptores de tipo β en la amígdala, quien a su vez ejerce su influencia directamente sobre sistemas de memoria, posiblemente en hipocampo y regiones corticales (Cahill y McGaugh 1996, McGaugh y Roozendaal 2002). Al comienzo de la realización de esta Tesis la modulación de la memoria por la actividad β -adrenérgica en amígdala durante la consolidación no había sido estudiada en función de las herramientas que ofrece la reconsolidación. Aunque se describió la posibilidad de inducir amnesia bloqueando la actividad adrenérgica durante las etapas lábiles de la memoria (por ej. Kindt et al. 2009), la posibilidad de revertir dichas amnesias por medio de la reconsolidación, así como la posibilidad de utilizar la actividad noradrenérgica como facilitador de memorias que no se expresan, no habían sido exploradas. Puesto que este mecanismo vincula estímulos estresantes con sus efectos sobre la memoria (LeDoux 2007), era un excelente candidato para evaluar si dicha modulación se producía sobre la persistencia, como proponía la visión dominante, o sobre la expresión de la memoria, en el marco del valor funcional que se propuso para la modulación de esta propiedad. Con intención de verificar esta hipótesis encaramos algunos experimentos en el laboratorio del Dr. Molina en la Facultad de

⁶¹ Aunque en este estudio no se realizaron controles específicos de la reactivación de la memoria y sus resultados pueden, por lo tanto, ser explicados por sumación. Sin embargo, la aplicación estricta de la navaja de Okham nos obliga a asumir que la misma droga, que produjo el mismo fenómeno en los dos paradigmas, lo hizo actuando sobre los mismos mecanismos.

⁶² El razonamiento que sigo aquí es el mismo empleado por Roozendaal y McGaugh al estudiar la interacción entre noradrenalina y glucocorticoides: si los efectos de la droga X sobre un fenómeno determinado pueden ser revertidos por el tratamiento Y, entonces el proceso afectado por la droga X no puede estar actuando río abajo del proceso afectado por el tratamiento Y. O bien X actúa río arriba, o bien son procesos en paralelo que convergen en algún punto río abajo de ambos, y X no es “necesario” para el fenómeno bajo estudio. Este razonamiento, estrictamente hablando, es válido sólo si la droga X actúa por un mecanismo no competitivo (de lo contrario, el tratamiento Y, aún actuando río arriba, podría sobrecompensar a la droga X). Este no es el caso de la escopolamina, pero parece razonable pensar que el antagonismo del sistema opiáceo no compensa a la escopolamina produciendo una liberación excesiva de acetilcolina, si se tiene en cuenta que los experimentos de Rush citados utilizaron una dosis muy alta de escopolamina, y además el efecto de reversión de la amnesia presenta una curva dosis-reversión con forma de U invertida.

Ciencias Químicas de la Universidad de Córdoba que mostraron de manera preliminar resultados compatibles con nuestra hipótesis: la amnesia inducida por propranolol, un antagonista de receptores β -adrenérgicos, en amígdala, parecía ser revertida por la inyección de clenbuterol, un agonista de dichos receptores, luego de un recordatorio⁶³. Debido a problemas de fuerza mayor, no relacionados con la hipótesis en estudio, esta línea de investigación fue interrumpida; pero afortunadamente⁶⁴ otro laboratorio puso a prueba la hipótesis: Gazarini et al. (2013) utilizaron yohimbina, un antagonista de receptores α 2-adrenérgicos, para aumentar la actividad noradrenérgica (estos receptores median una acción inhibitoria sobre estructuras como el locus coeruleus, que regula la actividad noradrenérgica sobre otras estructuras). La aplicación de esta droga durante la consolidación de un entrenamiento débil de miedo condicionado en ratas produce un efecto facilitador. Sorprendentemente, también se observa facilitación cuando la droga se aplica luego de un recordatorio.

Si los sistemas moduladores extrínsecos actúan sobre la formación de una marca de expresabilidad de la memoria, pero no afectan la información contenida en ella, hemos de suponer mecanismos que afecten diferencialmente la formación de esta “etiqueta de expresión” de la formación del engrama. Sin embargo, la disección de algunos de estos procesos podría ser inaccesible a una aproximación farmacológica sistémica, puesto que muchos componentes de los mecanismos de señalización intra e intercelulares podrían ser similares entre la formación del engrama y la determinación de la expresabilidad del mismo. Por ejemplo, la actividad de del factor de transcripción NF- κ B depende del número de ensayos en el entrenamiento (Freudenthal y Romano 2000) y es afectada por el estrés hídrico (Frenkel et al. 2002), ambos factores que participan en la determinación de la expresión de la memoria. NF- κ B estaría involucrado en mecanismos de plasticidad neuronal, participando tanto de la inducción de síntesis de proteínas necesarias para los cambios plásticos, como de la señalización sinapsis-núcleo-sinapsis necesaria para la especificidad del proceso (Salles et al. 2014). Por lo tanto, no sería desatinado pensar que este factor de transcripción, así como los procesos a nivel molecular que regulan su comportamiento y las señales intercelulares que lo activan pueden ser compartidos por los procesos de formación del engrama y los que determinan su expresión en el largo plazo. En este tipo de situaciones, la metodología propuesta en esta Tesis siempre dará como resultado una amnesia irreversible ya que la observación de cualquier efecto sobre la expresión de la memoria dependerá, obviamente, de la persistencia de una memoria cuya expresión se pueda evaluar. En una primera aproximación, intentamos evaluar la posibilidad de revertir la amnesia inducida por MK-801, un bloqueante de receptores de glutamatérgicos de tipo NMDA. Los experimentos (no publicados) mostraron una baja reproducibilidad del efecto amnésico previamente reportado en el modelo de memoria contexto-señal (Troncoso y Maldonado 2002), y que ha sido reproducido

⁶³ Datos no publicados, las tendencias se observaron sobre un experimento exploratorio con un número muy reducido de animales como para obtener resultados estadísticamente concluyentes.

⁶⁴ Sobre todo porque ya habíamos decidido no continuar con los experimentos.

en multitud de modelos experimentales en otros laboratorios y en otras especies (por ej. Mondadori y Weiskrantz 1993). Varios factores experimentales pueden afectar la capacidad de esta droga de inducir un efecto amnésico (Saucier y Cain 1995, Sanders y Fanselow 2003, Cercato et al. 2014, Baez et al. 2013), por lo que serán necesarios futuros experimentos ya sea para dilucidar las condiciones en que la droga sea efectivamente amnésica como para estudiar la posibilidad de revertir la amnesia inducida por antagonistas de receptores de glutamato de tipo NMDA. Pero puesto que las condiciones que pueden afectar la capacidad amnésica de drogas que bloquean estos receptores están asociadas a experiencias comportamentales, sería interesante evaluar la hipótesis de que los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA, que participarían de la activación de NF- κ B (Meffert et al. 2003), estén mediando la determinación de la expresabilidad de la memoria en función de dichas experiencias. Por ejemplo, la exploración de campo abierto en rata previa al entrenamiento en una tarea de evitación inhibitoria, protege tanto del efecto amnésico de MK-801 (Cercato et al. 2014) como de escopolamina (Colettis et al. 2014). Sin embargo, se ha de tener en cuenta que, en el caso de los mecanismos que afectan diferencialmente la persistencia y la expresión de la memoria, la metodología propuesta permite sólo poner en evidencia a aquellos que actúen sobre la expresión sin afectar la persistencia, como sería el caso para muchos, sino todos, los sistemas moduladores extrínsecos. La metodología propuesta no permite, sin embargo, diferenciar aquellos mecanismos que sólo participan de la formación de un engrama persistente de aquellos que participan tanto de la formación del engrama como de la determinación de su capacidad de expresarse en el largo plazo. Si la activación de los receptores NMDA determina la entrada al núcleo de NF- κ B, y a su vez la activación de NF- κ B es necesaria para la persistencia de la memoria, entonces la disección farmacológica de un posible rol de los receptores de tipo NMDA –al igual que de NF- κ B– en la expresión de la memoria, de un rol en la persistencia será particularmente difícil.

Las sesiones de reactivación de la memoria amnésica en los experimentos de los capítulos III y IV incluyen un tratamiento de dos horas de privación de agua. Este protocolo ha mostrado tener efectos facilitadores de la reconsolidación en los casos en que la memoria no se expresa ya sea por una inyección de saralasinina o ya sea por un entrenamiento de menor intensidad. Debe notarse que este protocolo se realizó en todos los experimentos, por lo que no podemos afirmar si fue necesario o si su omisión no hubiera modificado el resultado. En otras palabras, queda abierta la pregunta sobre si las amnesias inducidas por escopolamina o el protocolo de amuchamiento se revierten sólo por la ocurrencia de la reconsolidación o si la reactivación de la memoria y la falla en la predicción solamente inducen la labilidad del engrama, mientras que otros agentes (la privación de agua) son causales del aumento en la expresabilidad de la memoria. Los sistemas moduladores extrínsecos de la memoria son necesariamente “ciegos” a la información que se almacena –por definición de “sistema extrínseco”–. Puesto que la sesión de reactivación sin privación de agua no puede facilitar la memoria luego de un entrenamiento de baja intensidad o de la intervención con saralasinina, se

debería concluir, en este marco, que la reactivación de la memoria por sí misma no activa significativamente los sistemas moduladores, aún cuando produce la predicción de un estímulo aversivo. Por lo tanto, si la determinación de la expresión de la memoria está mediada por sistemas extrínsecos, y además las amnesias inducidas en los casos en los que se pudo rescatar la memoria se deben a una interferencia con la expresión de la memoria, sin afectar otros contenidos de la misma; entonces estas amnesias no deberían revertirse sólo por la inducción de la reconsolidación de la memoria, debería ser necesaria la acción de un sistema modulador extrínseco. Sin embargo, algunos autores objetan el marco elegido en esta Tesis, el de la modulación endógena de la memoria por sistemas extrínsecos⁶⁵. Lo que estos autores proponen es que el desempeño de los animales en la evaluación no es una medida de una “fuerza” de la memoria almacenada sino el resultado de la representación que se construye al momento de recuperar la memoria, denominada información ecfórica (Tulving 1983). En este sentido, muchos agentes amnésicos actuarían modificando la manera en la que la información adquirida durante la recuperación interactúa con los estímulos reactivadores, produciendo por lo tanto una disminución de los parámetros que el investigador determinó operativamente como medidas de memoria. Bajo esta hipótesis, la falta de desempeño del animal no representa la ausencia de la memoria sino la incapacidad del investigador de elegir el parámetro adecuado para observarla en esa situación en particular. Aunque esta hipótesis ha mostrado ser útil en algunos casos en los que se “han encontrado” dichos parámetros (Tulving 1983), tiene el defecto de que no permite, al menos no mientras se carezca modelos de la información adquirida más refinados que el clásico condicionamiento pavloviano, predecir cuáles serán esos parámetros. En otras palabras, siempre que se falle en encontrarlos, la responsabilidad será atribuible a la falta de imaginación del investigador y la hipótesis no se puede rechazar, lo que tal vez sea el mayor vicio de los modelos de deficiencias en la recuperación.

Si acaso, por ejemplo, el amuchamiento fuese incorporado a lo aprendido, no como una disminución en la expresión de la memoria, sino a nivel cognitivo como un atributo más de lo aprendido⁶⁶, entonces es posible un escenario en el que características de la sesión de reactivación como la falta de amuchamiento o la misma sesión *per se* tengan un significado propio que no tendrían, por ejemplo, luego de un entrenamiento de baja intensidad. Los experimentos realizados hasta ahora son consistentes con la idea de que la expresión de la memoria se puede determinar durante las fases de labilidad de la memoria, y que esta determinación puede ser causada, bidireccionalmente, por estímulos naturalistas. Falta determinar aún si la acción de estos estímulos naturalistas se ejerce, como propone la hipótesis de la etiqueta de expresión, a través de la modulación extrínseca de una propiedad (la expresión) de toda memoria asociativa o si, contrario al modelo propuesto, se está incorporando información específica acerca de estos estímulos. Hay varios reportes en la

⁶⁵ Varios han sido citados a lo largo de esta Tesis, véase por ejemplo Lewis 1979 para una excelente crítica a los conceptos de “fuerza” y de la disociación entre memorias de corto y largo plazo.

⁶⁶ Por ejemplo si se formase una representación Contexto-EVP-Amuchamiento, en lugar de una representación Contexto-EVP que no se expresa; o si se formasen memorias propias del amuchamiento relacionado a la habitación de entrenamiento o a la situación experimental, de manera de modificar la “actitud” del animal durante la manipulación de la evaluación.

literatura de memorias que se rescatan con procesos dependientes de recordatorio y que no parecen requerir de la acción de sistemas extrínsecos (Rovee-Collier et al. 1980, Nadel et al. 2007, Inda et al. 2011, Forcato et al. 2011, 2013, Fustiñana 2013, Kroes et al. 2014). En particular, los resultados publicados por Fustiñana (2013, capítulo VI) fueron obtenidos en el paradigma de memoria contexto-señal de *Neohelice*. Una objeción a la interpretación de Fustiñana podría ser que en su trabajo se utilizan varias reexposiciones al contexto de entrenamiento, lo que podría inducir estrés debido a la aversividad de la tarea, activando así sistemas moduladores; sin embargo, resultados similares a los de Fustiñana fueron encontrados en una tarea de memoria sin valor emocional significativo en humanos, donde se controló también la necesidad del error de predicción (Forcato et al. 2011, 2013). En experimentos con ratas se mostró que la facilitación de una memoria luego del olvido puede ocurrir sólo por la presentación de un recordatorio, pero dicha facilitación se observa sólo en el corto plazo a menos que se hagan tratamientos adicionales (en este caso, estimulación eléctrica de la formación reticular mesencefálica, Dekeyne et al. 1987). Debido a que el estímulo recordatorio puede tener otros efectos además de la reactivación de la memoria, los casos en los que no se ha demostrado la necesidad de otros factores más allá del recordatorio para facilitar la expresión de largo plazo de la memoria deben considerarse como casos negativos, sobre todo si las condiciones de labilización implican un error de predicción, que de por sí se debe considerar una situación que podría influenciar en la actividad de los sistemas moduladores de la memoria.

Falta también determinar cuáles son las condiciones que determinan la expresión de una memoria en condiciones naturales, es decir en el medio ambiente del animal. Esta última pregunta no es accesible en el laboratorio, sólo se podrá responder a partir de observaciones de campo o de enfoques mixtos, que impliquen intervenciones experimentales en el campo.

Los resultados obtenidos en el capítulo IV muestran que, mientras que dos horas de amuchamiento de los animales no fueron efectivas para inducir un efecto amnésico, sí lo fueron cuatro. Hay dos posibles interpretaciones de este resultado: o bien el efecto del amuchamiento es aditivo, de manera que dos horas no son suficientes y cuatro generan un mayor efecto; o bien dos horas son suficientes, pero el amuchamiento debe ocurrir dentro de una ventana temporal que se inicia un tiempo después del entrenamiento. Sin embargo, una conclusión clara sí puede ser extraída de este resultado: la expresión de largo término de la memoria contexto-señal debe definirse en algún momento posterior a las dos primeras horas de adquirida dicha memoria. Si la capacidad de la memoria de expresarse en el largo plazo se determinase antes de las dos horas, en cualquiera de los dos escenarios posibles presentados, la ocurrencia del amuchamiento dos horas después del entrenamiento o los efectos acumulados de las cuatro horas de exposición a dicha condición ocurrirían luego de que se tome la decisión de si la memoria será expresada o no en el largo plazo, y por consiguiente no se producirían ningún efecto sobre esa decisión. Un sólo ensayo de entrenamiento puede facilitar la expresión de largo plazo de la memoria contexto-señal sólo si se presenta dentro de

esta ventana de al menos cuatro horas, pero no si es presentado a las ocho horas post-entrenamiento (Smal et al. 2011).

Una consolidación “lenta” podría reflejar no una limitación mecánica (“nunca existió un mecanismo más rápido de fijación de memorias que pueda ser seleccionado”), sino un valor adaptativo asociado a dicha “lentitud”. Éste último es el escenario en que nos gustaría pensar que se seleccionó un proceso que permite a las experiencias no sólo formar nuevas memorias de sí mismas, sino modificar las memorias recientemente adquiridas.

Contextualización de los resultados y consideraciones finales:

Tal como advirtieron Ralph Miller y Alan Springer, “un típico paradigma de entrenamiento-evaluación puede ser más una medida de qué puede ser recordado que de qué fue inicialmente adquirido y consolidado”⁶⁷. En esta Tesis se mostraron una serie de experimentos en los que una memoria ocluida por distintos tratamientos amnésicos pudo ser recuperada por un procedimiento que requiere de la reactivación de la traza de memoria y de la reconstrucción de la representación codificada en dicha traza. Estos experimentos deben ser considerados en el contexto de otros, empleando el mismo paradigma experimental así como paradigmas de aprendizaje en roedores y humanos. En este contexto, se debe notar que entre las causas de amnesias reversibles se encuentran situaciones representativas de eventos de la vida de los individuos en situaciones naturales, como ser entrenamientos débiles (Frenkel et al. 2005a), circunstancias estresantes o de alto valor emocional cercanas al momento del aprendizaje (capítulo IV) u olvido (Rovee-Collier et al. 1980, Finn y Roediger III 2011, Cocoz et al. 2011, 2013). Del mismo modo, también situaciones “naturalistas” han mostrado ser efectivas para rescatar la expresión de las memorias amnésicas, como ser la privación de agua en crustáceos (Frenkel 2005, 2010a), situaciones estresantes o emocionalmente negativas (Finn y Roediger III 2011, Cocoz et al. 2011), o estímulos apetitivos (Cocoz et al. 2013).

Se propone entonces que sistemas moduladores, extrínsecos a los sistemas de memoria, actuarían determinando la capacidad de expresarse de las memorias almacenadas. Esto conllevaría el valor adaptativo de permitir la codificación no sólo de la información específica sobre las propiedades de estímulos discretos, contextos o relaciones entre estímulos, sino además la codificación de información acerca de la relevancia estimada de esas propiedades. Dicha relevancia sería determinada por sistemas de atención y de estrés, activados tanto por la experiencia que se codifica como por experiencias cercanas. También el paso del tiempo sería un determinante de la expresión de las memorias: cuanto más tiempo haya transcurrido entre el aprendizaje y el recordatorio, menor será la probabilidad de que se exprese la memoria. Ello podría producirse a través de cambios en la etiqueta de expresión a lo largo del tiempo, como también por la acción de los sistemas moduladores durante

⁶⁷ Miller y Springer 1974 (T. del A.)

reactivaciones de la memoria que no se producen necesariamente por la exposición directa a un recordatorio, por ejemplo durante el sueño (Rasch y Born 2007, Ribeiro 2012).

Debe tenerse cuidado de no confundir expresabilidad con expresión. He propuesto que la capacidad de expresarse de una memoria, su expresabilidad, se determina durante las fases lábiles por las que transcurre. Sin embargo, la expresión efectiva de la memoria se determina en el momento de la recuperación. En un típico paradigma de entrenamiento-evaluación, manteniendo constantes las condiciones de evaluación, la expresabilidad se reflejará en la probabilidad o intensidad de la respuesta propia de dicha memoria en las condiciones de evaluación. Sin embargo, memorias de baja expresabilidad podrían expresarse comportamentalmente si se facilita su expresión durante la evaluación, por ejemplo activando sistemas moduladores como los que pueden actuar durante los períodos lábiles (Sara y Remacle 1977, Sara et al. 1980, Izquierdo et al. 2001, 2002, Frenkel et al. 2005b). Si, tal como propuse, la expresión comportamental de la memoria resulta de una decisión tomada por el sistema de memoria, independientemente de si la información reactivada se labiliza y reconsolidada, entonces deberían ocurrir situaciones en las que se pueda modular negativamente la expresión de una memoria de alta expresabilidad sin afectar su reactivación, la elaboración de una predicción, labilización y reconsolidación. En el capítulo V se trató de generar esta situación evaluando a los animales a contrafase del entrenamiento, una circunstancia en la que se sabía que la memoria no debía expresarse. Sin embargo los resultados, contrario a lo predicho, muestran que la memoria que no se expresó pese a que persistía intacta en el momento de su reactivación –se expresó comportamentalmente 36 horas después– tampoco entró en la fase de reconsolidación. La existencia de un mecanismo de expresión del comportamiento independiente de los mecanismos de labilización se ve apoyada sin embargo en experimentos farmacológicos en rata y en cangrejo: el antagonismo de receptores de glutamato, o el agonismo de receptores de GABA, en el momento de la evaluación, impide la expresión del comportamiento pero no la susceptibilidad de la memoria a la disrupción (Ben Mamou et al. 2006, Rodríguez-Ortiz et al. 2012, Balderas et al. 2013, Barreiro et al. 2013, Milton et al. 2013). Por lo tanto continúa abierta la pregunta acerca de cuáles son las situaciones en la naturaleza de los animales, si las hay, en las que se modula la actividad de este mecanismo, controlando la expresión de memorias activadas y susceptibles a reelaboración.

VII.

Apéndice

Apéndice

Modelos propuestos para explicar las amnesias experimentales y la posibilidad de rescatar la expresión de la memoria:

A continuación se resume una serie de modelos que se han propuesto para explicar diversos fenómenos observados en la experimentación con tratamientos amnésicos. La lista no pretende ser del todo extensiva y se centrará en la capacidad de estos modelos de explicar los resultados obtenidos en esta Tesis. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que dichos modelos han sido elaborados para explicar otros fenómenos, no debe entenderse la argumentación de este apartado como un intento de refutar la existencia de los mecanismos propuestos, sino de mostrar que dichos mecanismos no son suficientes para explicar la evidencia con que contamos y que es necesario postular otros procesos en lugar de, o como complemento de, los ya propuestos.

Consolidación-Reconsolidación:

La hipótesis de la Consolidación (Müller y Pilzecker 1900) propone que la información recientemente adquirida debe transcurrir por una etapa de estabilización hasta formar una traza estable o fija. Esta teoría, en su versión neurobiológica, se desarrolló de la mano del concepto de sistemas moduladores extrínsecos que permiten decidir el destino de la información adquirida, determinando su almacenamiento (McGaugh 1966, Cahill y McGaugh 1996, McGaugh 2000). Una versión extendida de este modelo, la hipótesis de la Reconsolidación (Nader 2003), propone la existencia de mecanismos de desestabilización específicos de la información reactivada. De esta manera, si se adquiere nueva información relacionada con un evento anterior, la nueva información se almacenará “en lugar” de la vieja. Esta versión extendida tiene la ventaja de poder explicar fácilmente la amnesia inducida dependiente de un recordatorio (Przybylski y Sara 1997, 1999). Sin embargo, ambas teorías encuentran grandes dificultades en poder explicar la reversión de los efectos amnésicos (Chevalier 1965, Lewis 1969, 1979, Lattal y Abel 2004, Duvarci y Nader 2004). La explicación más exitosa que ofrece esta teoría para explicar la reversión de los efectos amnésicos –exitosa sobre todo por la dificultad para encontrar evidencia positiva que la rechace– es el argumento de sumación. Aunque es común encontrar en la literatura términos como “disrupción” o “bloqueo” de la consolidación, estos conceptos sólo tienen sentido cuando se refieren a la consolidación de la información adquirida, en el nivel de la representación interna al que referían originalmente Müller y Pilzecker. Los mecanismos en niveles inferiores (remodelación de circuitos, procesos bioquímicos intracelulares, etc.) no pueden disrumpirse o bloquearse: a los sumo pueden ser empujados por una vía alternativa, patológica en el caso de lesiones. En función de ello, la

hipótesis de sumación (Cherkin 1972, Gold et al. 1973, Gold y King 1974) propone que la traza residual resultante de una consolidación insuficiente o interferida puede interactuar, a modo de una adición sinérgica, con nuevos aprendizajes inducidos por la situación de recordatorio o por los tratamientos empleados para producir la reversión del efecto amnésico.

Otra alternativa es atribuir la amnesia a la consolidación de una memoria de extinción, tal vez facilitada por la acción de los supuestos agentes amnésicos, y la recuperación de la amnesia a la terminación del efecto inhibitor de la memoria de extinción.

Ambos modelos encuentran grandes dificultades en explicar los resultados presentados en esta Tesis. La reversión del efecto amnésico observada en los distintos experimentos presentados ocurre sólo cuando se presenta a los animales con un recordatorio no reforzado. Por el contrario, un recordatorio con refuerzo, que presenta más elementos propios de la memoria ocluida, incluyendo la asociación entre el Estímulo Visual de Peligro y el actómetro, no produce reversión de la amnesia. Si hubiese un efecto de sumación, sería de esperar que este efecto fuese aún mayor en el caso de que se reentrene explícitamente a los animales. Del mismo modo, tanto un reentrenamiento como la presentación no contingente del estímulo incondicionado suelen producir reversión de la extinción, fenómenos que han sido demostrados en particular en la extinción de la memoria contexto-señal (Hepp et al. 2009).

Consolidación persistente:

El modelo de consolidación persistente (Dudai y Eisenberg 2004, Alberini 2007) propone que la estabilización y elaboración de la memoria puede tomar un tiempo prolongado, incluso en el orden de la vida del individuo, durante el cual la memoria va pasando por distintas etapas en las que la información almacenada se reelabora a medida que se fija en distintos sustratos y se relaciona con otras memorias. Cada una de estas etapas es un proceso aislado de fijación y reelaboración que ocurriría, a modo de un rito de pasaje, cada vez que la memoria se reactiva. Desde este modelo, podría proponerse que la capacidad de una memoria de tomar el control del comportamiento sería modulable mientras esta consolidación toma lugar si se induce la reactivación de la memoria. La disociación entre expresión comportamental y actividad de la memoria es fundamental en este modelo, que propone que muchos de los “pasajes” de la información ocurrirían precisamente durante el sueño, cuando la memoria reactivada no puede tomar el control del comportamiento. Sin embargo, la predicción de la hipótesis de consolidación persistente es que la información debería reelaborarse siempre que se reactive, independientemente de que se exprese como un cambio en el comportamiento. Este modelo predice un único caso en el que un error de predicción sería condición necesaria para observar un cambio en la memoria reactivada: cuando la consolidación llega a un punto asintótico de estabilidad, en que cualquier cambio inducido por una reactivación que no cumple con las expectativas sería despreciable (Dudai y Eisenberg 2004). Que la memoria contexto-señal complete su consolidación (persistente) en menos de un día no parece un escenario

probable en vista de que típicamente a este proceso se le atribuye una dinámica de meses, si no toda una vida (por ej. Squire y Spanis 1984, Inda et al. 2011). Podría argumentarse que, siendo que los animales son extraídos de su ambiente natural, donde posiblemente hayan tenido varias interacciones con predadores aéreos antes de llegar al laboratorio, la consolidación podría tomar un tiempo mucho más breve que en paradigmas que usan animales criados en bioterio (Tse et al. 2007). Sin embargo consolidaciones largas, incluso de varios años, se han observado también en animales extraídos de su ambiente natural y para memorias adquiridas a partir de experiencias relevantes en dicho ambiente (por ej. Squire et al. 1975).

Hipótesis de especificidad de codificación:

La hipótesis de especificidad de codificación (Tulving y Thomson 1973, Spear 1973) propone que la memoria se guarda como una constelación de atributos independientes que se relacionan entre sí y con el ítem a recordar. Cuando alguno de estos atributos se activa, tiene una probabilidad de activar alguno de los atributos relacionados, de manera que cuantos más ítems se activen, o cuanto más fuerte sea la relación con el resto (es decir, cuanto mayor sea la probabilidad de activar otro ítem), más probable es que se active la totalidad de los elementos relacionados, entre los que se encuentra el ítem a recordar. En este modelo, la amnesia no se produce por falta de la información sobre el ítem a recordar, sino por problemas en el acceso a esta información: cuando el ítem a recordar tiene vínculos débiles con pocos ítems relacionados, hay una baja probabilidad de que se active a partir de la exposición al recordatorio (que reproduce parcialmente los ítems asociados). La reversión de un efecto amnésico o la facilitación de la memoria resultante de un entrenamiento débil son posibles en este modelo porque la activación de los ítems relacionados permite reelaborarlos –asociarlos a otros ítems o modificar la eficiencia de sus asociaciones a otros ítems– y así facilitar la recuperación del ítem a ser recordado (por ej. Gardiner et al. 1973, Sara et al. 1975). Una versión de este modelo, planteada por Bouton (1993), considera el tiempo como un ítem más. Este modelo puede explicar el olvido puesto que el tiempo de la evaluación necesariamente será diferente al de la adquisición y esta diferencia será mayor cuanto más antigua sea la memoria. Podría argumentarse que si el tiempo del entrenamiento fue reactivado por estar relacionado con otros elementos, sería posible reelaborarlo, de manera de establecerlo en el tiempo de la reactivación, y así “fortalecer” una segunda evaluación próxima.

Sin embargo, los modelos de especificidad de codificación, tanto si incluyen el tiempo como si no, implican siempre que la falta de desempeño del animal en la evaluación se debe a una deficiencia en el acceso a la información almacenada; y la recuperación de dicho desempeño, a la facilitación de dicho acceso. En los experimentos realizados en esta Tesis, y en otros trabajos relacionados (Frenkel et al. 2010a, Cocoz et al. 2011, 2013), se ha controlado específicamente que es necesaria la reactivación de la información contenida en la

memoria, y por lo tanto el acceso a la misma, para que la expresión comportamental se facilite ante un posterior recordatorio. En particular, en los experimentos utilizando el modelo de memoria contexto-señal, el tratamiento que no frustra las expectativas consiste en la presentación de un mayor número de elementos propios de la situación de aprendizaje, lo que debería producir una mayor reactivación de la memoria según el modelo de especificidad de codificación.

Este modelo sí puede, sin embargo, explicar que no se haya podido reactivar la memoria luego de un recordatorio nocturno, aún cuando esta persistía y se pudo expresar en la siguiente evaluación durante el día. En este caso, puesto que la información estaba bien almacenada pero no se reflejó ni en el desempeño de los animales ni en su capacidad de labilizarse, parece razonable pensar que no hubo acceso a dicha información, aún cuando estuviese disponible. Como alternativa al modelo de especificidad de codificación, pero no necesariamente excluyente con el mismo, se ha propuesto que el acceso a la información no depende tanto del número de ítems reactivados (aditividad de claves) sino de la coherencia entre los mismos: aún cuando el recordatorio involucre un gran número de elementos presentes en el entrenamiento, si la relación entre estos elementos se pierde, dicho recordatorio puede ser menos efectivo que uno que presente un menor número de claves pero relacionadas de la misma manera que se las percibió durante el aprendizaje (Rovee-Collier et al. 1985, Gisquet-Verrier 1992). En este sentido, un cambio de fase circadiana entre el entrenamiento y la evaluación puede tener un efecto disruptor sobre el acceso a la memoria no sólo por la disminución del número de claves entre entrenamiento y evaluación, sino además porque estas claves son reemplazadas por otras que no estuvieron presentes al momento de la adquisición. Apoyando esta interpretación, el acceso a la memoria fue exitoso cuando el tiempo entre el aprendizaje y el recordatorio fue breve, lo que podría explicarse en este marco si se considera el tiempo como una clave, tal como propone Bouton (1993). Este resultado se contradice con el publicado previamente (Pereyra et al. 1996), pero ello no es sorprendente si se tiene en cuenta no sólo los cambios que han ocurrido desde aquella publicación en los equipos y las instalaciones de entrenamiento, sino también los que pudieron ocurrir en la población de *Neohelice* con la que se trabaja en incluso las variaciones propias de cada captura de animales (Pereyra et al. 1999, Sztarker y Tomsic 2008). Bajo un modelo de aditividad de claves, es de esperar que, en un caso límite, factores no controlados (por ejemplo posibles claves recordatorias, así como la capacidad de cada una de activar ítems relacionados) reduzcan la reproducibilidad del resultado; por lo tanto, esta divergencia en los resultados también apoya esta interpretación.

Hipótesis del comparador:

La Hipótesis del Comparador (Miller y Matzel 1988, Denniston et al. 2001) propone la existencia de un mecanismo, que le da el nombre a modelo, que compara la cantidad de

estímulos aprendidos presentes en el recordatorio, con la cantidad de estímulos asociados a los aprendidos pero que no están presentes en la situación recordatorio. Este modelo, creado para explicar la extinción del efecto de ensombrecimiento en el condicionamiento pavloviano (Kaufman y Bolles 1981, Matzel et al. 1985) propone que todos los estímulos condicionados presentes durante el aprendizaje se asocian tanto al estímulo incondicionado como entre sí. Dada una serie de estímulos similares a algunos presentes en el aprendizaje, estos reactivarán una representación interna del estímulo incondicionado por dos vías en paralelo: directamente a través de la asociación entre los estímulos presentes en el recordatorio y el estímulo incondicionado; e indirectamente a través de la asociación entre los estímulos presentes y otros ausentes, que a su vez fueron asociados al estímulo incondicionado. Si la cantidad de asociaciones directas supera la cantidad de asociaciones indirectas, entonces el comportamiento asociado a la predicción de estímulo incondicionado se expresará. En caso de que la cantidad de asociaciones directas sea igual o menor a las indirectas, no se expresará la respuesta condicionada, pero se podrá reevaluar la información contenida en las distintas asociaciones reactivadas, por ejemplo extinguiéndolas.

Este modelo propone la existencia de un mecanismo de control de la expresión comportamental de una traza mnésica reactivada. Puede explicar que la información se reelabore aún cuando no haya una expresión comportamental de la misma, e incluso puede explicar que dicha reelaboración dependa de las predicciones producidas por las claves tanto presentes como ausentes en el recordatorio. Sin embargo, en este modelo la expresión de una memoria se produce en función de la cantidad de claves presentes en la evaluación que correlacionaron con el estímulo incondicionado en el entrenamiento; situación que no ajusta bien a nuestra evidencia. En los experimentos presentados en esta Tesis, el protocolo que produce un aumento en la expresión de la memoria implica la presentación de las mismas claves que se utilizarán luego para evidenciar dicha expresión. De hecho, el protocolo de reactivación que efectivamente produce un aumento en la expresión de la memoria se parece más a un protocolo de extinción que aquel que no produce el aumento en la expresión de la memoria. Por otro lado, en el modelo del comparador la reelaboración de la memoria ocurre como consecuencia de su reactivación. Que la predicción producida por el recordatorio se cumpla o no afectará diferencialmente como se reelabora la información, pero no influirá en la decisión de labilizar la memoria reactivada, lo cual ocurrirá siempre. Sin embargo, en nuestros experimentos la facilitación de la memoria reactivada depende críticamente de que se no ocurra el estímulo incondicionado. Por otro lado, aunque no nos propusimos verificarlo en esta Tesis, experimentos previos en el laboratorio han mostrado que la mejora en la expresión requiere necesariamente de la privación de agua (Frenkel et al. 2005a, 2010a). Si la privación de agua actuase como una clave adicional que se asocia a los estímulos recordatorios, debería tener un efecto amnésico puesto que no se la vuelve a presentar en la evaluación final. Si actúa como agente estresante, modificando la fuerza asociativa de los estímulos presentes⁶⁸,

⁶⁸ El modelo original sólo propone que el número de claves es importante para producir la expresión del comportamiento. Aquí estoy proponiendo una versión extendida *ad hoc* para poder explicar los casos

este efecto debería ser similar, sino mayor, en el caso del recordatorio reforzado, ya que se presenta incluso una mayor cantidad de claves que luego se presentarán en la evaluación final.

observados en los que claves adicionales, no presentes en la evaluación, pueden facilitar la expresión comportamental de la memoria.

VIII.

Bibliografía

Bibliografía

- Albensi BC y Mattson M (2000) *Evidence for the involvement of TNF and NF- κ B in hippocampal synaptic plasticity*. Synapse 35: 151-159.
- Alberini CM (2005) *Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes?* Trends in Neurosciences 28(1): 51-56.
- Alberini CM (2007) *Reconsolidation: the samsara of memory consolidation*. Debates in Neuroscience 1: 17-24.
- Amaral OB, Luft T, Cammarota M, Izquierdo I y Roesler R (2007) *Temporary inactivation of the dorsal hippocampus induces a transient impairment in retrieval of aversive memory*. Behavioural Brain Research 180: 113-118.
- Anagnostaras SG, Maren S y Fanselow MS (1999) *Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: Within-Subjects Examination*. The Journal of Neuroscience 19(3): 1106-1114.
- Anokhin KV, Tiunova AA y Rose SPR (2002) *Reminder effects – reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks*. European Journal of Neuroscience 15: 1759-1765.
- Baez MV, Oberholzer MV, Cercato MC, Snitcofsky M, Aguirre AI y Jerusalinsky DA (2013) *NMDA receptor subunits in the adult rat hippocampus undergo similar changes after 5 minutes in an open field and after LTP induction*. PLoS One 8(2): e55244.
- Bahar A, Dorfman N y Dudai Y (2004) *Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation*. European Journal of Neuroscience 19: 1115-1118.
- Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Bermudez-Rattoni F (2013) *Retrieval and reconsolidation of object recognition memory are independent processes in the perirhinal cortex*. Neuroscience 253: 398-405.
- Baratti CM Huygens P, Miño J, Merlo A y Gardella J (1979) *Memory facilitation with posttrial injection of oxotremorine and physostigmine in mice*. Psychopharmacology 64: 85-88.
- Baratti CM, Boccia MM, Blake MG y Acosta GB (2008) *Reactivated memory of an inhibitory avoidance response in mice is sensitive to a nitric oxide synthase inhibitor*. Neurobiology of Learning and Memory 89: 426-440.
- Barker DL, Murray TF, Siebenaller JF y Mpitsos GJ (1986) *Characterization of muscarinic cholinergic receptors in the crab nervous system*. Journal of Neurochemistry 46(2): 583-588.
- Barondes SH y Cohen HD (1968) *Memory impairment after subcutaneous injection of acetoxycycloheximide*. Science 160: 556-557.
- Barreiro KA, Suárez LD, Lynch VM, Molina VA y Delorenzi A (2013) *Memory expression is independent of memory labilization/reconsolidation*. Neurobiology of Learning and Memory 106: 283-291.
- Basso A, Spinnler H, Vallar G y Zanolio ME (1982) *Left hemisphere damage and selective impairment of auditory verbal short-term memory. A case study*. Neuropsychologia 20(3): 263-274.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Müller Igaz L, Bevilacqua LRM, Izquierdo I y Medina JH (2007) *Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus*. Neuron 53: 261-277.
- Ben Mamou C, Gamache K y Nader K (2006) *NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories*. Nature Neuroscience 9(10): 1237-1239.
- Bennet EL, Diamond MC, Krech D y Rosenzweig MR (1964) *Chemical and anatomical plasticity of brain*. Science 146(3664): 610-619.
- Berón MP (2003) *Dieta de juveniles de gaviota cangrejera (Larus atlanticus) en estuarios de la Provincia de Buenos Aires*. Hornero 18(2): 113-117.
- Berón de Astrada M y Maldonado H (1999) *Two related forms of long-term habituation in the crab Chasmagnathus are differentially affected by scopolamine*. Pharmacology Biochemistry and Behavior 63(1): 109-118.
- Blais CA y Janak PH (2006) *Post-training and post-reactivation administration of amphetamine enhances morphine conditioned place preference*. Behavioural Brain Research 171: 329-337.
- Blais CA y Janak PH (2007) *Post-training, but not post-reactivation, administration of amphetamine and anisomycin modulates Pavlovian conditioned approach*. Neurobiology of Learning and Memory 87: 644-658.
- Blake MG, Boccia MM, Krawczyk MC y Baratti CM (2011) *Scopolamine prevents retrograde memory interference between two different learning tasks*. Physiology and Behavior 102: 332-337.

- Blake MG, Boccia MM, Krawczyk MC, Delorenzi A y Baratti CM (2012) *Choline reverses scopolamine-induced memory impairment by improving memory reconsolidation*. *Neurobiology of Learning and Memory* 98(2): 112-121.
- Blake MG, Boccia MM, Krawczyk MC y Baratti CM (2013) *Hippocampal $\alpha 7$ -nicotinic cholinergic receptors modulate memory reconsolidation: a potential strategy for recovery from amnesia*. *Neurobiology of Learning and Memory* 106: 193-203.
- Boccia MM, Kopf SR y Baratti CM (1998) *Effects of a single administration of oxytocin or vasopressin and their interactions with two selective receptors antagonists on memory storage in mice*. *Neurobiology of Learning and Memory* 69: 136-146.
- Boccia MM, Blake MG, Acosta GB y Baratti CM (2006) *Post-retrieval effects of icv infusions of hemicholinium in mice are dependent on the age of the original memory*. *Learning & Memory* 13: 376-381.
- Boccia M, Freudenthal R, Blake M, de la Fuente V, Acosta G, Baratti C y Romano A (2007) *Activation of hippocampal nuclear factor- κ B by retrieval is required for memory reconsolidation*. *The Journal of Neuroscience* 27(49):13436-45.
- Boller K y Rovee-Collier C (1994) *Contextual updating of infants' reactivated memories*. *Developmental Psychobiology* 27(4): 241-256.
- Bond-Buckup G, Ferreira Fontoura N, Possa Marroni N y Kucharski LC (1991) "O caranguejo: manual para o ensino prático em zoologia". Editora da Universidade, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Bouton ME (1993) *Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of pavlovian learning*. *Psychological Bulletin* 114(1): 80-99.
- Breda JB, Carlini EA y Sader NFA (1969) *Effects of chronic administration of (+)-amphetamine on maze performance of the rat*. *British Journal of Pharmacology* 37(1): 79-86.
- Breen RA y McGaugh JL (1961) *Facilitation of maze learning with posttrial injections of picrotoxin*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 54(5): 498-501.
- Briggs JF, Fitz KI y Riccio DC (2007) *Transfer of memory retrieval cues in rats*. *Psychonomic Bulletin & Review* 14(3): 495-499.
- Briggs JF y Riccio DC (2008) *Transfer of old 'reactivated' memory retrieval cues in rats*. *Learning and Motivation* 39: 13-23.
- Bromberg E, Santos EA y Bianchini A (1995) *Osmotic and ionic regulation in Chasmagnathus granulata Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) during hyposmotic stress*. *Nauplius* 3: 83-99.
- Brunet A, Orr SP, Tremblay J, Robertson K, Nader K y Pitman RK (2008) *Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder*. *Journal of Psychiatric Research* 42(6): 503-506.
- Burnovicz A y Hermitte G (2010) *Conditioning of an autonomic response in Crustacea*. *Physiology & Behavior* 101(1): 168-175.
- Bustos SG, Maldonado H y Molina VA (2009) *Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age*. *Neuropsychopharmacology* 34(2): 446-457.
- Caffaro PA (2011) *La escopolamina, durante la consolidación, previene la expresión de la memoria sin afectar su almacenamiento en Neohelice granulata*. Tesis de grado (dir. A Delorenzi) Fac. Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Caffaro PA, Suárez LD, Blake MG y Delorenzi A (2012) *Dissociation between memory reactivation and its behavioral expression: Scopolamine interferes with memory expression without disrupting long-term storage*. *Neurobiology of Learning and Memory* 98: 235-245.
- Cahill L y McGaugh JL (1996) *Modulation of memory storage*. *Current Opinion in Neurobiology* 6: 237-242.
- Cahill L, McGaugh JL y Weinberger NM (2001) *The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember*. *Trends in Neurosciences* 24(10): 578-581.
- Cahill L, Gorski L y Le K (2003) *Enhanced human memory consolidation with post-learning stress: interaction with the degree of arousal at encoding*. *Learning & Memory* 10: 270-274.
- Cammarota M, Bevilaqua LRM, Medina JH e Izquierdo I (2004) *Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory*. *Learning & Memory* 11: 572-578.
- Car H y Wisniewska RJ (2006) *Effects of baclofen and L-AP4 in passive avoidance test in rats after hypoxia-induced amnesia*. *Pharmacological Reports* 58: 91-100.
- Carbó Tano M (2013) *Rol del sistema GABAérgico sobre las distintas fases de la memoria de extinción en el cangrejo Neohelice granulata*. Tesis doctoral (dir. ME Pedreira) Fac. Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. www.digital.bl.fcen.uba.ar.

- Cercato MC, Coletti N, Snitcowsky M, Aguirre AI, Kornisiuk EE, Baez MV y Jerusalinsky DA (2014) *Hippocampal NMDA receptors and the previous experience effect on memory*. Journal of Physiology, Paris (en prensa).
- Cherkin A (1972) *Retrograde amnesia in the chick: resistance to the reminder effect*. Physiology and Behavior 8: 949-955.
- Chevalier JA (1965) *Permanence of amnesia after a single posttrial electroconvulsive seizure*. Journal of Comparative and Physiological Psychology 59(1): 125-127.
- Child FM, Epstein HT, Kuzirian AM y Alkon DL (2003) *Memory reconsolidation in Hermissenda*. The Biological Bulletin 205(5): 218-219.
- Clark KB, Krahl SE, Smith DC y Jensen RA (1995) *Post-training unilateral vagal stimulation enhances retention performance in the rat*. Neurobiology of Learning and Memory 63: 213-216.
- Cocoz V, Maldonado H y Delorenzi A (2011) *The enhancement of reconsolidation with a naturalistic mild stressor improves the expression of a declarative memory in humans*. Neuroscience 185: 61-72.
- Cocoz V, Sandoval AV, Stehberg J y Delorenzi A (2013) *The temporal dynamics of enhancing a human declarative memory during reconsolidation*. Neuroscience 246: 397-408.
- Cole BJ, Jones GH y Turner JD (1994) *5-HT_{1A} receptor agonists improve the performance of normal and scopolamine-impaired rats in an operant delayed matching to position task*. Psychopharmacology 116: 135-142.
- Coletti NC, Snitcowsky M, Kornisiuk EE, Gonzalez EN, Quillfeldt JA y Jerusalinsky DA (2014) *Amnesia of inhibitory avoidance by scopolamine is overcome by previous open-field exposure*. Learning & Memory 21(11): 634-645.
- Collatz J, Müller C y Steidle JLM (2006) *Protein synthesis-dependent long-term memory induced by one single associative training trial in the parasitic wasp *Lariophagus distinguendus**. Learning & Memory 13: 263-266.
- Coons EE y Miller NE (1960) *Conflict versus consolidation of memory traces to explain "retrograde amnesia" produced by ECS*. Journal of Comparative and Physiological Psychology 53(6): 524-531.
- Coyle JT, Price DL y DeLong MR (1983) *Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation*. Science 219(4589): 1184-1190.
- Davis RE y Klinger PD (1969) *Environmental control of amnesic effects of various agents in goldfish*. Physiology and Behavior 4: 269-271.
- Davis JL, Pico RM y Cherkin A (1982) *Arginine vasopressin enhances memory retroactively in chicks*. Behavioral and Neural Biology 35: 242-250.
- Dawson RG y McGaugh JL (1969) *Electroconvulsive shock effects on a reactivated memory trace: further examination*. Science 166(3904): 525-527.
- De Caigny P y Lukowiak K (2008) *Crowding, an environmental stressor, blocks long-term memory formation in *Lymnaea**. The Journal of Experimental Biology 211: 2678-2688.
- Debiec J, LeDoux JE y Nader K (2002) *Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus*. Neuron 36: 527-538.
- Decker MW y McGaugh JL (1989) *Effects of concurrent manipulations of cholinergic and noradrenergic function on learning and retention in mice*. Brain Research 477: 29-37.
- Decker MW, Tran T y McGaugh JL (1990a) *A comparison of the effects of scopolamine and diazepam on acquisition and retention of inhibitory avoidance in mice*. Psychopharmacology 100: 515-521.
- Decker MW, Gill TM y McGaugh JL (1990b) *Concurrent muscarinic and β -adrenergic blockade in rats impairs place-learning in a water maze and retention of inhibitory avoidance*. Brain Research 513: 81-85.
- Decker MW y McGaugh JL (1991) *The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory*. Synapse 7: 151-168.
- Dekeyne A, Deweer B y Sara SJ (1987) *Background stimuli as a reminder after spontaneous forgetting: potentiation by stimulation of the mesencephalic reticular formation*. Psychobiology 15(2): 161-166.
- 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**. Neuroscience Letters 196(3): 193-196.
- Delorenzi A, Pedreira ME, Romano A, Garcia SI, Pirola CJ, Nahmod VE y Maldonado H (1996) *Angiotensin II enhances long-term memory in the crab *Chasmagnathus**. Brain Research Bulletin 41(4): 211-220.
- Delorenzi A, Dimant B, Frenkel L, Nahmod VE, Nässel DR, Maldonado H (2000) *High environmental salinity induces memory enhancement and increases levels of brain angiotensin-like peptides in the crab *Chasmagnathus granulatus**. The Journal of Experimental Biology 203: 3369-3379.

- Dennes RP y Barnes JC (1993) *Attenuation of scopolamine-induced spatial memory deficits in the rat by cholinomimetic and non-cholinomimetic drugs using a novel task in the 12-arm radial maze*. *Psychopharmacology* 111(4): 435-441.
- Denniston JC, Savastano HI y Miller RR (2001) *The Extended Comparator Hypothesis: learning by contiguity, responding by relative strength*. En "Handbook of contemporary learning theories" (RR Mowrer y SB Klein eds.), Lawrence Erlbaum Assoc., New Jersey pp. 65-117.
- DeVietti TL y Kirkpatrick BR (1976) *The amnesia gradient: inadequate as evidence for a memory consolidation process*. *Science* 194(4263): 438-40.
- DeVietti TL, Conger GL y Kirkpatrick BR (1977) *Comparison of the enhancement gradients of retention obtained with stimulation of the mesencephalic reticular formation after training or memory reactivation*. *Physiology & Behavior* 19: 549-554.
- DeVietti TL y Kirkpatrick BR (1977) *Stimulation of specific regions of brain in rats modifies retention for newly acquired and old habits*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 91(3): 662-673.
- Deweere B y Sara SJ (1985) *Alleviation of forgetting by pretest contextual cueing in rats*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 444: 507-509.
- Dudai Y (1992) *Why 'learning' and 'memory' should be redefined (or, An agenda for focused reductionism)*. *Concepts in Neuroscience* 3(1): 99-121.
- Dudai Y (2002) "Memory from A to Z. Keywords, concepts and beyond". Oxford University Press, New York.
- Dudai Y y Eisenberg M (2004) *Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis*. *Neuron* 44: 93-100.
- Duncan CP (1949) *The retroactive effect of electroshock on learning*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 42(1): 32-44.
- Dunne MP y Hartley LR (1986) *Scopolamine and the control of attention in humans*. *Psychopharmacology* 89: 94-97.
- Duvarci S y Nader K (2004) *Characterization of fear memory reconsolidation*. *The Journal of Neuroscience* 24(42): 9269-9275.
- Duvarci S, ben Mamou C y Nader K (2006) *Extinction is not a sufficient condition to prevent fear memories from undergoing reconsolidation in the basolateral amygdala*. *European Journal of Neuroscience* 24: 249-260.
- Eichenbaum H y Fortin NJ (2009) *The neurobiology of memory based predictions*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 364: 1183-1191.
- Eisenberg M, Kobilo T, Berman DE y Dudai Y (2003) *Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance*. *Science* 301: 1102-1104.
- Eisenberg M y Dudai Y (2004) *Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in medaka: old fears don't die*. *European Journal of Neuroscience* 20: 3397-3403.
- Epstein HT, Kuzirian AM, Child FM, Alkon DL (2004) *Two different biological configurations for long-term memory*. *Neurobiology of Learning and Memory* 81: 12-18.
- Fathala M del V, Iribarren L, Kunert MC y Maldonado H (2010a) *A field model of learning: 1. Short-term memory in the crab Chasmagnathus granulatus*. *Journal of Comparative Physiology A* 196(1): 61-75.
- Fathala M del V, Kunert MC y Maldonado H (2010b) *A field model of learning: 2. Long-term memory in the crab Chasmagnathus granulatus*. *Journal of Comparative Physiology A* 196(1): 77-84.
- Federman N, Fustiñana MS y Romano AG (2009) *Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories*. *Learning & Memory* 16: 600-606.
- Feld M, Dimant B, Delorenzi A, Coso O y Romano A (2005) *Phosphorylation of extra-nuclear ERK/MAPK is required for long-term memory consolidation in the crab Chasmagnathus*. *Behavioral Brain Research* 158(2): 251-261.
- Finn B y Roediger III HL (2011) *Enhancing retention through reconsolidation: negative emotional arousal following retrieval enhances later recall*. *Psychological Science* 22(6): 781-786.
- Flexner JB y Flexner LB (1967) *Restoration of expression of memory lost after treatment with puromycin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57(6): 1651-1654.
- Forcato C, Burgos VL, Argibay PF, Molina VA, Pedreira ME y Maldonado H (2007) *Reconsolidation of declarative memory in humans*. *Learning & Memory* 14: 295-303.
- Forcato C, Rodríguez MLC, Pedreira ME y Maldonado H (2010) *Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information*. *Neurobiology of Learning and Memory* 93(1): 77-84.

- Forcato C, Rodríguez MLC y Pedreira ME (2011) Repeated labilization-reconsolidation processes strengthen declarative memory in humans. *PLoS One* 6(8): e23305.
- Forcato C, Fernandez RS y Pedreira ME (2013) *The role and dynamics of strengthening in the reconsolidation process in a human declarative memory: what decides the fate of recent and older memories?* *PLoS One* 8(4): e61688.
- Fortin NJ, Wright SP y Eichenbaum H (2004) *Recollection-like memory retrieval in rats is dependent on the hippocampus.* *Nature* 431(7005): 188-191.
- Frankland PW, Ding HK, Takahashi E, Suzuki A, Kida S y Silva AJ (2006) *Stability of recent and remote contextual fear memory.* *Learning & Memory* 13(4): 451-457.
- Frenkel L, Freudenthal R, Romano AG, Nahmod VE, Maldonado H y Delorenzi A (2002) *Angiotensin II and the transcription factor Rel/NF- κ B link environmental water shortage with memory improvement.* *Neuroscience* 115(4): 1079-1087.
- Frenkel L, Maldonado H y Delorenzi A (2005a) *Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II.* *European Journal of Neuroscience* 22: 1757-1766.
- Frenkel L, Maldonado H y Delorenzi A (2005b) *Retrieval improvement is induced by water shortage through angiotensin II.* *Neurobiology of Learning and Memory* 83: 173-177.
- Frenkel L, Suárez LD, Maldonado H y Delorenzi A (2010a) *Angiotensin modulates long-term memory expression but not long-term memory storage in the crab Chasmagnathus.* *Neurobiology of Learning and Memory* 94(4): 509-520.
- Frenkel L, Dimant B, Portiansky EL, Imboden H, Maldonado H y Delorenzi A (2010b) *Neuroanatomical distribution of angiotensin-II-like neuropeptide within the central nervous system of the crab Chasmagnathus; physiological changes triggered by water deprivation.* *Cell and Tissue Research* 341(1): 181-95.
- Frenkel L, Dimant B, Suárez LD, Portiansky EL y Delorenzi A (2012) *Food odor, visual danger stimulus, and retrieval of an aversive memory trigger heat shock protein HSP70 expression in the olfactory lobe of the crab Chasmagnathus granulatus.* *Neuroscience* 201: 239-251.
- Freudenthal R, Locatelli F, Hermitte G, Maldonado H, Lafourcade C, Delorenzi A y Romano A (1998) *κ -B like DNA-binding activity is enhanced after spaced training that induces long-term memory in the crab Chasmagnathus.* 242(3): 143-146.
- Freudenthal R y Romano AG (2000) *Participation of Rel/NF- κ B transcription factors in long-term memory in the crab Chasmagnathus.* *Brain Research* 855: 274-281.
- Freudenthal R, Romano AG y Routtenberg A (2004) *Transcription factor NF- κ B activation after in vivo perforant path LTP in mouse hippocampus.* *Hippocampus* 14: 677-683.
- Freudenthal R, Boccia MM, Acosta GB, Blake MG, Merlo E, Baratti CM y Romano AG (2005) *NF- κ B transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice.* *European Journal of Neuroscience* 21: 2845-2852.
- Fustiñana MS (2013) *Análisis comparativo de mecanismos de plasticidad neuronal involucrados en la labilización y reconsolidación de la memoria.* Tesis doctoral (dir. AG Romano) Fac. Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. www.digital.bl.fcen.uba.ar.
- Fustiñana MS, Carbó Tano M, Romano AG, Pedreira ME (2013) *Contextual pavlovian conditioning in the crab Chasmagnathus.* *Animal Cognition* 16: 255-272.
- Gainutdinova TH, Tagirova RR, Ismailova AI, Muranova LN, Samarova EI, Gainutdinov KL y Balaban PM (2005) *Reconsolidation of a context long-term memory in the terrestrial snail requires protein synthesis.* *Learning & Memory* 12: 620-625.
- Gardiner JM, Craik FIM y Bleasdale FA (1973) *Retrieval difficulty and subsequent recall.* *Memory & Cognition* 1(3): 213-216.
- Gazarini L, Jark Stern CA, Carobrez AP, Bertoglio LJ (2013) *Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting α 1- and β -adrenergic receptors.* *Learning & Memory* 20: 210-219.
- Geller A y Jarvik ME (1968) *The time relations of ECS induced amnesia.* *Psychonomic Science* 12(5): 169-170.
- Gerson R y Hendersen RW (1978) *Conditions that potentiate the effects of electroconvulsive shock administered 24 hours after avoidance learning.* *Animal Learning and Behavior* 6(3): 346-351.
- Gibbs ME (1991) *Behavioral and pharmacological unravelling of memory formation.* *Neurochemical Research* 16(6): 715-726.
- Gisquet-Verrier P (1992) *Coherence of retrieval cues, rather than additivity, determines prior cuing effectiveness in the rat.* *Animal Learning & Behavior* 20(4): 382-392.

- Gisquet-Verrier P y Riccio DC (2012) *Memory reactivation effects independent of reconsolidation*. Learning & Memory 19: 401-409.
- Glick SD y Greenstein S (1972) *Differential effects of scopolamine and mecamlamine on passive avoidance behavior*. Life sciences 11(1): 169-179.
- Glick SD y Zimmerberg B (1972) *Amnesic effects of scopolamine*. Behavioral Biology 7: 245-254.
- Glickman SE (1961) *Perseverative neural processes and consolidation of the memory trace*. Psychological Bulletin 58(3): 218-233.
- Godoy AM y Maldonado H (1995) *Modulation of the escape response by [D-Ala²]Met-enkephalin in the crab Chasmagnathus*. Pharmacology Biochemistry and Behavior 50(3): 445-451.
- Gold PE (2008) *Protein synthesis inhibition and memory: formation vs amnesia*. Neurobiology of Learning and Memory 89(3): 201-211.
- Gold PE, Haycock JW, Macri J y McGaugh JL (1973) *Retrograde amnesia and the "reminder effect": an alternative interpretation*. Science 180(4091): 1199-1201.
- Gold PE y King RA (1974) *Retrograde Amnesia: storage failure versus retrieval failure*. Psychological Review 81(5): 465-469.
- Gold PE y Van Buskirk R (1976) *Enhancement and impairment of memory processes with post-trial injections of adrenocorticotrophic hormone*. Behavioral Biology 16: 387-400.
- Gordon WC y Spear NE (1973) *The effects of strychnine on recently acquired and reactivated passive avoidance memories*. Physiology and Behavior 10: 1071-1075.
- Gordon WC (1977) *Susceptibility of a reactivated memory to the effects of strychnine: a time-dependent phenomenon*. Physiology & Behavior 18: 95-99.
- Gordon WC, Smith GJ y Katz DS (1979) *Dual effects of response blocking following avoidance learning*. Behaviour Research and Therapy 17: 479-487.
- Gould SJ y Lewontin RC (1979) *The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme*. Proceedings of the Royal Society of London B 205: 581-598.
- Hebb DO (1949) "The Organization of Behavior: A neuropsychological theory", Lawrence Erlbaum Associates, New Jersey, 2002 (Wiley, New York por la primera ed.), Cap. IV, pp. 60-78: *The first stage of perception: growth of the assembly*.
- Hepp Y, Pérez-Cuesta LM, Maldonado H y Pedreira ME (2009) *Extinction memory in the crab Chasmagnathus: recovery protocols and effects of multi-trial extinction training*. Animal Cognition 13(3): 391-403.
- Hermitte G, Pedreira ME, Tomsic D y Maldonado H (1999) *Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long-term habituation after spaced, but not massed, training in the crab Chasmagnathus*. Neurobiology of Learning and Memory 71(1): 34-49.
- Hermitte G y Maldonado H (2006) *Cardiovascular component of the context signal memory in the crab Chasmagnathus*. Journal of Comparative Physiology A 192(1): 69-83.
- Hinderliter CF, Webster t y Riccio DC (1975) *Amnesia induced by hypothermia as a function of treatment-test interval and recooling in rats*. Animal Learning & Behavior 3(3): 257-263.
- Holloway FA y Wansley R (1973) *Multiphasic retention deficits at periodic intervals after passive-avoidance learning*. Science 180(4082): 208-210.
- Howard RL y Meyer DR (1971) *Motivational control of retrograde amnesia in rats: a replication and extension*. Journal of Comparative and Physiological Psychology 74(1): 37-40.
- Hudspeth WJ y Gerbrandt LK (1965) *Electroconvulsive shock: conflict, competition, consolidation, and neuroanatomical functions*. Psychological Bulletin 63(6): 377-383.
- Huguet C, Crepieux P y Laudet V (1997) *Rel/NF-κB transcription factors and IκB inhibitors: Evolution from a unique common ancestor*. Oncogene 15: 2965-2974.
- Hupbach A, Gomez R, Hardt O y Nadel L (2007) *Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information*. Learning & Memory 14: 47-53.
- Inda MC, Muravieva EV y Alberini CM (2011) *Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction*. The Journal of Neuroscience 31(5): 1635-1643.
- Izquierdo I y Chaves MLF (1988) *The effect of non-factual post-training negative comment on the recall of verbal information*. Journal of Psychiatric Research 22(3): 165-169.

- Izquierdo I (1989) *Different forms of post-training memory processing*. Behavioral and Neural Biology 51: 171-202.
- Izquierdo LA, Viola H, Barros DM, Alonso M, Vianna MR, Furman M, Levi de Stein M, Szapiro G, Rodrigues C, Choi H, Medina JH e Izquierdo I (2001) *Novelty enhances retrieval: molecular mechanisms involved in rat hippocampus*. The European Journal of Neuroscience 13(7): 1464-1467.
- Izquierdo LA, Barros DM, Medina JH e Izquierdo I (2002) *Stress hormones enhance retrieval of fear conditioning acquired either one day or many months before*. Behavioural Pharmacology 13(3): 203-213.
- Izquierdo LA, Barros DM, Medina JH e Izquierdo I (2003) *Exposure to novelty enhances retrieval of very remote memory in rats*. Neurobiology of Learning and Memory 79: 51-56.
- Jian M, Luo YX, Xue YX, Han Y, Shi HS, Liu JF, Yan W, Wu P, Meng SQ, Deng JH, Shen HW, Shi J, Lu L (2014) *eIF2 α dephosphorylation in basolateral amygdala mediates reconsolidation of drug memory*. The Journal of Neuroscience 34(30): 10010-10021.
- Judge ME y Quartermain D (1982) *Characteristics of retrograde amnesia following reactivation of memory in mice*. Physiology & Behavior 28: 585-590.
- Kaczer L, Pedetta S y Maldonado H (2007) *Aggressiveness and memory: subordinate crabs present higher memory ability than dominants after an agonistic experience*. Neurobiology of Learning and Memory 87: 140-148.
- Kaltschmidt B, Widera D y Kaltschmidt C (2005) *Signaling via NF- κ B in the nervous system*. Biochimica et Biophysica Acta 1745(3): 287-299.
- Kane NS, Robichon A, Dickinson JA, Greenspan RJ (1997) *Learning without performance in PKC-deficient Drosophila*. Neuron 18(2): 307-314.
- Kaufman MA y Bolles RC (1981) *A nonassociative aspect of overshadowing*. Bulletin of the Psychonomic Society 18(6): 318-320.
- Kindt M, Soeter M y Vervliet B (2009) *Beyond extinction: erasing human fear responses and preventing the return of fear*. Nature Neuroscience 12(3): 256-258.
- Klappenbach M, Maldonado H, Locatelli F y Kaczer L (2012) *Opposite actions of dopamine on aversive and appetitive memories in the crab*. Learning & Memory 19(2): 73-83.
- Kohlenberg R y Trabasso T (1968) *Recovery of a conditioned emotional response after one or two electroconvulsive shocks*. Journal of Comparative and Physiological Psychology 65(2): 270-273.
- Kroes MCW, Tendolkar I, van Wingen GA, van Waarde JA, Strange BA y Fernández G. (2014) *An electroconvulsive therapy procedure impairs reconsolidation of episodic memories in humans*. Nature Neuroscience 17(2): 204-206.
- Kuhlmann S, Piel M y Wolf OT (2005) *Impaired memory retrieval after psychosocial stress in healthy young men*. The Journal of Neuroscience 25(11): 2977-2982.
- Lattal KM y Abel T (2004) *Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(13): 4667-4672.
- Lashley KS (1917) *The Effects of strychnine and caffeine upon the rate of learning*. Psychobiology 1: 141-170.
- LeDoux J (2007) *The amygdala*. Current Biology 17(20):R868-R874.
- Lee JLC (2008) *Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning*. Nature Neuroscience 11(11): 1264-1266.
- Lee SH, Choi JH, Lee N, Lee HR, Kim JI, Yu NK, Choi SL, Lee SH, Kim H y Kaang BK. (2008) *Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory*. Science 319(5867): 1253-1256.
- Leonard DJ y Zavala A (1964) *Electroconvulsive shock, retroactive amnesia, and the single-shock method*. Science; 146: 1073-1074.
- Levy DA, Hopkins RO y Squire LR (2004) *Impaired odor recognition memory in patients with hippocampal lesions*. Learning & Memory 11: 794-796.
- Lewis DJ, Misanin JR y Miller RR (1968) *Recovery of memory following amnesia*. Nature 220: 704-705.
- Lewis DJ (1969) *Sources of experimental amnesia*. Psychological Review 76(5): 461-472.
- Lewis DJ (1979) *Psychobiology of active and inactive memory*. Psychological Bulletin 86(5): 1054-1083.
- Lisman JE (2007) *In search of molecular persistence*. En "Science of memory: concepts" (HL Roediger III, Y Dudai y SM Fitzpatrick eds.). Oxford University Press, New York, pp. 203-206.

- Locatelli F, Maldonado H y Romano A (2002) *Two critical periods for cAMP-dependent protein kinase activity during long-term memory consolidation in the crab Chasmagnathus*. *Neurobiology of Learning and Memory* 77(2): 234-249.
- Loftus EF y Palmer JC (1974) *Reconstruction of automobile destruction: an example of the interaction between language and memory*. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior* 13: 585-589.
- Lomber SG, Payne BR y Cornwell P (1996) *Learning and recall of form discrimination during reversible cooling deactivation of ventral-posterior suprasylvian cortex in the cat*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 1654-1658.
- Lukowiak K, Frasn M, Smyth K, Wong C y Hittell K (2007) *Reconsolidation and memory infidelity in Lymnaea*. *Neurobiology of Learning and Memory* 87: 547-560.
- Luria AR (1968) "The mind of a mnemonist. A little book about a vast memory" (Trad. de L. Solotaroff). Basic Books Inc., New York/London
- Luttges MW y McGaugh JL (1967) *Permanence of retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock*. *Science* 156(3773): 408-410.
- Mactutus CF, Riccio DC y Ferek JM (1979) *Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics*. *Science* 204(4399): 1319-1320.
- Maddox SA y Schafe GE (2011) *Epigenetic alterations in the lateral amygdala are required for reconsolidation of a Pavlovian fear memory*. *Learning & Memory* 18: 579-593.
- Madsen MC y McGaugh JL (1961) *The effect of ECS on one-trial avoidance learning*. *Journal of Comparative and Psychological Physiology* 54(5): 522-523.
- Maldonado H (1968) *Effect of electroconvulsive shock on memory in Octopus vulgaris Lamarck*. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 59: 25-37.
- Maldonado H, Romano A y Tomsic D (1997) *Long-term habituation (LTH) in the crab Chasmagnathus: a model for behavioral and mechanistic studies of memory*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30(7): 813-826.
- Maldonado H (2002) *Crustaceans as model to investigate memory illustrated by extensive behavioral and physiological studies in Chasmagnathus*. En "The Crustacean Nervous System" (K Wiese ed.) Springer. Berlin.
- Margulies C, Tully T y Dubnau J (2005) *Deconstructing memory in Drosophila*. *Current Biology* 15: R700-R713.
- Martin SJ, de Hoz L y Morris RGM (2005) *Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding*. *Neuropsychologia* 43: 609-624.
- Mattson MP y Camandola S (2001) *NF- κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders*. *The Journal of Clinical Investigation* 107(3): 247-254.
- Mattson MP y Meffert MK (2006) *Roles for NF- κ B in nerve cell survival, plasticity, and disease*. *Cell Death and Differentiation* 13: 852-860.
- Matzel LD, Schachtman TR y Miller RR (1985) *Recovery of an overshadowed association achieved by extinction of the overshadowing stimulus*. *Learning and Motivation* 16: 398-412.
- McGaugh JL (1966) *Time-dependent processes in memory storage*. *Science*, 153(3742): 1351-1358.
- McGaugh JL (1983) *Hormonal influences on memory*. *Annual Review of Psychology* 34: 297-323.
- McGaugh JL Cahill L y Roozendaal B (1996) *Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(24): 13508-13514.
- McGaugh JL (2000) *Memory—a Century of Consolidation*. *Science* 287(5451): 248-251.
- McGaugh JL (2002) *Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective*. *Trends in Neuroscience* 25(9): 456-461.
- McGaugh JL y Roozendaal B (2002) *Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain*. *Current Opinion in Neurobiology* 12: 205-210.
- McGaugh JL y Roozendaal B (2008) *Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications*. *Psychopharmacology* 202(1-3): 3-14.
- McKenzie S y Eichenbaum H (2011) *Consolidation and reconsolidation: two lives of memories?* *Neuron* 71: 224-233.
- Meberg PJ, Kinney WR, Valcourt EG y Routtenberg A (1996) *Gene expression of the transcription factor NF- κ B in hippocampus: regulation by synaptic activity*. *Molecular Brain Research* 38: 179-190.
- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS y Baltimore D (2003) *NF- κ B functions in synaptic signaling and behavior*. *Nature Neuroscience* 6(10): 1072-1078.

- Mendez Casariego A, Alberti J, Luppi T, Daleo P, Iribarne O (2011) *Habitat shifts and spatial distribution of the intertidal crab Neohelice (Chasmagnathus) granulata Dana*. *Journal of Sea Research* 66(2): 87-94.
- Menzel R y Greggers U (1992) *Temporal dynamics and foraging behaviour in honeybees*. En "Biology and Evolution of Social Insects" (J Billen ed.). Leuven University Press, Leuven (Bélgica), pp. 303-318.
- Merlo E, Freudenthal R y Romano A (2002) *The I κ B kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab Chasmagnathus*. *Neuroscience* 112(1): 161-172.
- Merlo E, Freudenthal R, Maldonado H y Romano A (2005) *Activation of the transcription factor NF- κ B by retrieval is required for long-term memory reconsolidation*. *Learning & Memory* 12: 23-29.
- Merlo E y Romano A (2007) *Long-term memory consolidation depends on proteasome activity in the crab Chasmagnathus*. *Neuroscience* 147: 46-52.
- Merlo E y Romano A (2008) *Memory extinction entails the inhibition of the transcription factor NF- κ B*. *PLoS One* 3(11): e3687.
- Mery F y Kawecki TJ (2005) *A cost of long-term memory in Drosophila*. *Science* 308(5725): 1148.
- Milekic MH y Alberini CM (2002) *Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation*. *Neuron* 36: 521-525.
- Milekic MH, Pollonini G y Alberini CM (2007) *Temporal requirement of C/EBP β in the amygdala following reactivation but not acquisition of inhibitory avoidance*. *Learning & Memory* 14: 504-511.
- Miller RR, Misanin JR y Lewis DJ (1969) *Amnesia as a function of events during the learning-ECS interval*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 67(2): 145-148.
- Miller RR y Springer AD (1974) *Implications of recovery from experimental amnesia*. *Psychological Review* 81(5): 470-473.
- Miller RR, KasproW WJ y Schachtman TR (1986) *Retrieval variability: sources and consequences*. *American Journal of Psychology* 99(2): 145-218.
- Miller RR y Matzel LD (1988) *The comparator hypothesis: a response rule for the expression of associations*. En "The Psychology of Learning and Motivation" (GH Bower ed.). Academic Press, London, Vol. 22, pp. 51-92.
- Miller RR y Matzel LD (2006) *Retrieval failure versus memory loss in experimental amnesia: definitions and processes*. *Learning & Memory* 13: 491-497.
- Milton AL, Merlo E, Ratano P, Gregory BL, Dumbreck JK y Everitt BJ (2013) *Double dissociation of the requirement for GluN2B- and GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory*. *The Journal of Neuroscience* 33(3): 1109-1115.
- Misanin JR, Miller RR y Lewis DJ (1968) *Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace*. *Science* 160(3827): 554-555.
- Mondadori C y Weiskrantz L (1993) *NMDA receptor blockers facilitate and impair learning via different mechanisms*. *Behavioral and Neural Biology* 60: 205-210.
- Morgan RE y Riccio DC (1994) *Extinction of an amnesic memory in rats: evidence for the malleability of "inaccessible" information*. *Learning and Motivation* 25: 431-446.
- Morris RGM, Inglis J, Aigne JA, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y y Kelly PAT (2006) *Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval*. *Neuron* 50: 479-489.
- Mowrer RR y Gordon WC (1983) *Effects of cuing in an "irrelevant" context*. *Animal Learning & Behavior* 11(4): 401-406.
- Müller GE y Pilzecker (1900) *Experimentelle Beiträge zur Lehre von Gedächtnis*; según McDougall W (1901) *Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis*. Von G. E. Müller and A. Pilzecker. *Mind* 10: 388-394; y según Lechner HA, Squire LR y Byrne JH (1999) *100 Years of Consolidation—Remembering Müller and Pilzecker*. *Learning & Memory* 6: 77-87.
- Myers KM y Davis M (2002) *Behavioral and neural analysis of extinction*. *Neuron* 36: 567-584.
- Nadel L, Campbell J y Ryan L (2007) *Autobiographical memory retrieval and hippocampal activation as a function of repetition and the passage of time*. *Neural Plasticity* 2007: 90472.
- Nader K, Schafe GE y Le Doux JE (2000) *Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval*. *Nature* 406: 722-726.
- Nader K (2003) *Memory traces unbound*. *Trends in Neuroscience* 26(2): 65-72.

- Nader K, Hardt O y Wang Szu-Han (2005) *Response to Alberini: right answer, wrong question*. Trends in Neuroscience 28(7): 346-347.
- Obrig TG, Culp WJ, McKeehan WL y Hardesty B (1971) *The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes*. The Journal of Biological Chemistry 246: 174-181.
- Ouyang M y Thomas SA (2005) *A requirement for memory retrieval during and after long-term extinction learning*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(26): 9347-9352.
- Parker ES, Cahill L y McGaugh JL (2006) *A case of unusual autobiographical remembering*. Neurocase 12: 35-49.
- Pedreira ME, Dimant B, Tomic D, Quesada-Allue LA y Maldonado H (1995) *Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab Chasmagnathus*. Pharmacology Biochemistry and Behavior 52(2): 385-395.
- Pedreira ME, Dimant B y Maldonado H (1996) *Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab Chasmagnathus*. Pharmacology Biochemistry and Behavior 54(3): 611-617.
- Pedreira ME, Romano AG, Tomic D, Lozada M y Maldonado H (1998) *Massed and spaced training build up different components of long-term habituation in the crab Chasmagnathus*. Animal Learning & Behavior 26(1): 34-45.
- Pedreira ME, Pérez-Cuesta LM y Maldonado H (2002) *Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab Chasmagnathus: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors*. Journal of Neuroscience 22(18): 8305-8311.
- Pedreira ME y Maldonado H (2003) *Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration*. Neuron 38: 863-869.
- Pedreira ME, Pérez-Cuesta LM y Maldonado H (2004) *Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction*. Learning & Memory 11: 579-585.
- Pereyra P, de la Iglesia HO, y Maldonado H (1996) *Training-to-testing intervals different from 24 h impair habituation in the crab Chasmagnathus*. Physiology and Behavior 59(1): 19-25.
- Pereyra P, Saraco M y Maldonado H (1999) *Decreased response or alternative defensive strategies in escape: two different types of long-term memory in the crab Chasmagnathus*. Journal of Comparative Physiology A 184: 301-310.
- Pereyra P, González Portino E y Maldonado H (2000) *Long-lasting and context-specific freezing preference is acquired after spaced repeated presentations of a danger stimulus in the crab Chasmagnathus*. Neurobiology of Learning and Memory 74(2): 119-134.
- Pérez-Cuesta LM, Hepp Y, Pedreira ME y Maldonado H (2007) *Memory is not extinguished along with CS presentation but within a few seconds after CS-onset*. Learning & Memory 14: 101-108.
- Pérez-Cuesta LM y Maldonado H (2009) *Memory reconsolidation and extinction in the crab: mutual exclusión or coexistence?*. Learning & Memory 16: 714-721.
- Pérez-Cuesta LM (2010) *Dinámica e interrelación entre reconsolidación y extinción de la memoria en el cangrejo Chasmagnathus*. Tesis doctoral (dir. H Maldonado) Fac. Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. www.digital.bl.fcen.uba.ar
- Power AE, Roozendaal B y McGaugh JL (2000) *Glucocorticoid enhancement of memory consolidation in the rat is blocked by muscarinic receptor antagonism in the basolateral amygdala*. European Journal of Neuroscience 12: 3481-3487.
- Power AE, Berlau DJ, McGaugh JL y Steward O (2006) *Anisomycin infused into the hippocampus fails to block "reconsolidation" but impairs extinction: The role of re-exposure duration*. Learning & Memory 13: 27-34.
- Przybylski J y Sara SJ (1997) *Reconsolidation of memory after its reactivation*. Behavioural Brain Research 84: 241-246.
- Przybylski J y Sara SJ (1999) *Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of β adrenergic receptors*. The Journal of Neuroscience, 19(15): 6623-6628.
- Quartermain D, Paolino RM y Miller NE (1965) *A brief temporal gradient of retrograde amnesia independent of situational change*. Science, 149(3688): 1116-1118.
- Quartermain D, McEwen BS y Azmitia EC (1970) *Amnesia produced by electroconvulsive shock or cycloheximide: conditions for recovery*. Science 169(3946): 683-686.
- Quartermain D, McEwen BS y Azmitia EC (1972) *Recovery of memory following amnesia in the rat and mouse*. Journal of Comparative and Physiological Psychology 79(3): 360-370.

- Radyushkin KA y Anokhin KV (1999) *Recovery of memory in chicks after disruption during learning: the reversibility of amnesia induced by protein synthesis inhibitors*. Neuroscience and Behavioral Physiology 29(1): 31-36. Traducido de Rossüsskii Fiziologicheskii Zhurnal imeni I. M. Sechenova (1997) 83(11-12): 11-18.
- Ramón y Cajal S (1894) "Les nouvelles idées sur la structure du système nerveux chez l'homme et chez les vertébrés" (Trad. de L. Azoulay). C Reinwald & Cie, Paris.
- Rasch B y Born J (2007) *Maintaining memories by reactivation*. Current Opinion in Neurobiology 17(6): 698-703.
- Rescorla RA y Wagner AR (1972) *A theory of pavlovian conditioning: variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement*. En "Classical conditioning II: current research and theory" (AH Black y WF Prokasy eds.). Appleton-Century-Crofts, New York, pp. 64-99.
- Ribeiro S (2012) *Sleep and plasticity*. Pflügers Archiv: European Journal of Physiology 463(1): 111-120.
- Riccio DC, Millin PM y Bogart AR (2006) *Reconsolidation: a brief history, a retrieval view, and some recent issues*. Learning & Memory 13: 536-544.
- Rodríguez MLC, Campos J, Forcato C, Leiguarda R, Maldonado H, Molina VA y Pedreira ME (2013) *Enhancing a declarative memory in humans: the effect of clonazepam on reconsolidation*. Neuropharmacology 64: 432-442.
- Rodríguez WA, Rodríguez SB, Phillips MY y Martínez Jr. JL (1993) *Post-reactivation cocaine administration facilitates later acquisition of an avoidance response in rats*. Behavioural Brain Research 59: 125-129.
- Rodríguez WA, Horne CA y Padilla JL (1999) *Effects of glucose and fructose on recently reactivated and recently acquired memories*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 23(7): 1285-1317.
- Rodríguez-Ortiz CJ, De la Cruz V, Gutiérrez R y Bermudez-Rattoni F (2005) *Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained*. Learning & Memory 12: 533-537.
- Rodríguez-Ortiz CJ, Balderas I, García-DeLaTorre P, Bermudez-Rattoni F (2012) *Taste aversion memory reconsolidation is independent of its retrieval*. Neurobiology of Learning and Memory 98(3):215-219.
- Romano AG (1991) *Función de los opiáceos en el comportamiento defensivo del cangrejo Chasmagnathus granulatus*. Tesis doctoral (dir. H Maldonado) Fac. Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. www.digital.bl.fcen.uba.ar.
- Romano AG, Delorenzi A, Pedreira ME, Tomsic D y Maldonado H (1996a) *Acute administration of a permeant analog of cAMP and a phosphodiesterase inhibitor improve long-term habituation in the crab Chasmagnathus*. Behavioral Brain Research 75(1-2): 119-125.
- Romano AG, Locatelli F, Delorenzi A, Pedreira ME y Maldonado H (1996b) *Effects of activation and inhibition of cAMP-dependent protein kinase on long-term habituation in the crab Chasmagnathus*. Brain Research 735(1): 131-140.
- Romano AG, Freudenthal R, Merlo E y Routtenberg A (2006a) *Evolutionarily-conserved role of the NF- κ B transcription factor in neural plasticity and memory*. European Journal of Neuroscience 24: 1507-1516.
- Romano AG, Locatelli F, Freudenthal R, Merlo E, Feld M, Ariel P, Lemos D, Federman N y Fustiñana MS (2006b) *Lessons from a crab: molecular mechanisms in different memory phases of Chasmagnathus*. The Biological Bulletin 210(3): 280-288.
- Roozendaal B y McGaugh JL (1997) *Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats*. European Journal of Neuroscience 9: 76-83.
- Roozendaal B, Hui GK, Hui IR, Berlau DJ, McGaugh JL y Weinberger NM (2006a) *Basolateral amygdala noradrenergic activity mediates corticosterone-induced enhancement of auditory fear conditioning*. Neurobiology of Learning and Memory 86(3): 249-255.
- Roozendaal B, Okuda S, Van der Zee EA y McGaugh JL (2006b) *Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(17): 6741-6746.
- Rosenthal R y Rosnow RL (1985) "Contrast analysis: focused comparisons in the analysis of variance". Cambridge University Press, Cambridge.
- Rossato JI, Bevilacqua LRM, Medina JH, Izquierdo I y Cammarota M (2006) *Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory*. Learning & Memory 13: 431-440.
- Roulet P y Sara S (1998) *Consolidation of memory after its reactivation: involvement of β noradrenergic receptors in the late phase*. Neural Plasticity 6(3): 63-68.
- Rovee-Collier CK, Sullivan MW, Debora Lucas ME y Fagen JW (1980) *Reactivation of infant memory*. Science 208(4448): 1159-1161.

- Rovee-Collier CK, Patterson J y Hayne H (1985) *Specificity in the reactivation of infant memory*. *Developmental Psychobiology* 18(6): 559-574.
- Rush DK (1986) *Reversal of scopolamine-induced amnesia of passive avoidance by pre- and post-training naloxone*. *Psychopharmacology* 89: 296-300.
- Rush DK (1988) *Scopolamine amnesia of passive avoidance: a deficit of information acquisition*. *Behavioral and Neural Biology* 50: 255-274.
- Salinska E, Bourne RC y Rose SP (2004) *Reminder effects: the molecular cascade following a reminder in young chicks does not recapitulate that following training on a passive avoidance task*. *European Journal of Neuroscience* 19: 3042-3047.
- Salles A, Lagos M, Boccia M, Blake MG, Baratti CM, Corbi N, Passanati C, Romano A y Freudenthal R (2012) *Synaptic NF-kappa B localization dynamics in learning and memory*. Póster presentado en el XXVII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias.
- Salles A, Romano AG y Freudenthal R (2014) *Synaptic NF-kappa B pathway in neuronal plasticity and memory*. *Journal of Physiology, Paris*; en imprenta, doi: 10.1016/j.jphysparis.2014.05.002
- Sanders MJ y Fanselow MS (2003) *Pre-training prevents context fear conditioning deficits produced by hippocampal NMDA receptor blockade*. *Neurobiology of Learning and Memory* 80: 123-129.
- Sara SJ (1973) *Recovery from hypoxia and ECS-induced amnesia after a single exposure to training environment*. *Physiology and Behavior* 10: 85-89.
- Sara SJ, David-Remacle M y Lefevre D (1975) *Passive avoidance behavior in rats after electroconvulsive shock: facilitative effect of response retardation*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 89(5): 489-497.
- Sara SJ y Remacle JF (1977) *Strychnine-induced passive avoidance facilitation after electroconvulsive shock or undertraining: a retrieval effect*. *Behavioral Biology* 19: 465-475.
- Sara SJ, Deweer B y Hars B (1980) *Reticular stimulation facilitates retrieval of a 'forgotten' maze habit*. *Neuroscience Letters* 18: 211-217.
- Sara SJ (2000) *Strengthening the shaky trace through retrieval*. *Nature Reviews Neuroscience* 1(3): 212-213.
- Sara SJ y Hars B (2006) *In memory of consolidation*. *Learning & Memory* 13: 515-521.
- Saucier D y Cain DP (1995) *Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation*. *Nature* 378(6553): 186-189.
- Schneider AM y Sherman W (1968) *Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock*. *Science* 159(3811): 219-221.
- Schwabe L, Nader K y Pruessner JC (2014) *Reconsolidation of human memory: brain mechanisms and clinical relevance*. *Biological Psychiatry* 76(4): 274-280.
- Scoville WB y Milner B (1957) *Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions*. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 20(1): 11-21.
- Sevenster D, Beckers T y Kindt M (2012) *Retrieval per se is not sufficient to trigger reconsolidation of human fear memory*. *Neurobiology of Learning and Memory* 97: 338-345.
- Sevenster D, Beckers T y Kindt M (2013) *Prediction error governs pharmacologically induced amnesia for learned fear*. *Science* 339(6121): 830-833.
- Shema R, Sacktor TC y Dudai Y (2007) *Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM ζ* . *Science* 317(5840): 951-953.
- Sherff CM y Carew TJ (2004) *Parallel somatic and synaptic processing in the induction of intermediate-term and long-term synaptic facilitation in Aplysia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(19): 7463-7468.
- Shirahata T, Tsunoda M, Santa T, Kirino Y y Watanabe S (2006) *Depletion of serotonin selectively impairs short-term memory without affecting long-term memory in odor learning in the terrestrial slug *Limax valentianus**. *Learning & Memory* 13(3):267-270.
- Shors TJ y Matzel LD (1997) *Long-term potentiation: what's learning got to do with it?*. *The Behavioral and Brain Sciences* 20(4): 597-614.
- Si J, Yang J, Xue L, Yang C, Luo Y, Shi H y Lu L (2012) *Activation of NF-kB in basolateral amygdala is required for memory reconsolidation in auditory fear conditioning*. *PLoS One* 7(9): e43973.
- Smal L, Suárez LD y Delorenzi A (2011) *Enhancement of long-term memory expression by a single trial during consolidation*. *Neuroscience Letters* 487: 36-40.

- Smith GJ y Spear NE (1979) *Reactivation of an appetitive discrimination memory following retroactive interference*. *Animal Learning & Behavior* 7(3): 289-293.
- Solntseva SV y Nikitin VP (2010) *Reversible and irreversible stages in the development of amnesia after disruption of the reactivation of associative memory in snails*. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 40(6): 679-686.
- Spear NE (1973) *Retrieval of memory in animals*. *Psychological Review* 80(3): 163-194.
- Spivak ED (2010) *The crab Neohelice (=Chasmagnathus) granulata: an emergent animal model from emergent countries*. *Helgoland Marine Research* 64(3): 149-154.
- Squire LR, Slater PC y Chace PM (1975) *Retrograde amnesia: temporal gradient in very long term memory following electroconvulsive therapy*. *Science* 187(4171): 77-79.
- Squire LR, Slater PC y Chace PM (1976a) *Reactivation of recent or remote memory before electroconvulsive therapy does not produce retrograde amnesia*. *Behavioral Biology* 18: 335-343.
- Squire LR, Chace PM y Slater PC (1976b) *Retrograde amnesia following electroconvulsive therapy*. *Nature* 260: 775-777.
- Squire LR y Spanis CW (1984) *Long gradient of retrograde amnesia in mice: continuity with the findings in humans*. *Behavioral Neuroscience* 98(2): 345-348.
- Stafford JM y Lattal KM (2009) *Direct comparisons of the size and persistence of anisomycin-induced consolidation and reconsolidation deficits*. *Learning & Memory* 16: 494-503.
- Stollhoff N, Menzel R y Eisenhardt D (2005) *Spontaneous recovery from extinction depends on the reconsolidation of the acquisition memory in an appetitive learning paradigm in the honeybee (Apis mellifera)*. *The Journal of Neuroscience* 25(18): 4485-4492.
- Suárez LD, Smal L y Delorenzi A (2010) *Updating contextual information during consolidation as result of a new memory trace*. *Neurobiology of Learning and Memory* 93(4): 561-571.
- Summers MJ, Crowe SF, Ng KT (1995) *Administration of glutamate following a reminder induces transient memory loss in day-old chicks*. *Cognitive Brain Research* 3: 1-8.
- Summers MJ, Crowe SF, Ng KT (2000) *Modification of a weak learning experience by memory retrieval in the day-old chick*. *Behavioral Neuroscience* 114(4): 713-719.
- Sutton MA, Masters SE, Bagnall MW y Carew TJ (2001) *Molecular mechanisms underlying a unique intermediate phase of memory in aplysia*. *Neuron* 31: 143-154.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ y Kida S (2004) *Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures*. *The Journal of Neuroscience* 24(20): 4787-4795.
- Sweatt JD (2007) *Retrieval: Molecular mechanisms*. En "Science of memory: concepts" (HL Roediger III, Y Dudai y SM Fitzpatrick eds.). Oxford University Press, New York, pp. 209-213.
- Sztarker J y Tomsic D (2008) *Neuronal correlates of the visually elicited escape response of the crab Chasmagnathus upon seasonal variations, stimuli changes and perceptual alterations*. *Journal of Comparative Physiology A* 194: 587-596.
- Sztarker J y Tomsic D (2011) *Brain modularity in arthropods: individual neurons that support "what" but not "where" memories*. *The Journal of Neuroscience* 31(22): 8175-8180.
- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B y Alberini CM (2001) *The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP β* . *Nature Neuroscience* 4(8): 813-818.
- Tomsic D y Maldonado H y Rakitin A (1991) *Morphine and GABA: effects on perception, escape response and long-term habituation to a danger stimulus in the crab Chasmagnathus*. *Brain Research Bulletin* 26(5): 699-706.
- Tomsic D, Pedreira ME, Romano AG, Hermitte G y Maldonado H (1998) *Context-US association as a determinant of long-term habituation in the crab Chasmagnathus*. *Animal Learning & Behavior* 26(2): 196-209.
- Tomsic D, Berón de Astrada M, Sztarker J (2003) *Identification of individual neurons reflecting short- and long-term visual memory in an Arthropod*. *The Journal of Neuroscience* 23(24): 8539-8546.
- Tomsic D, Berón de Astrada MB, Sztarker J y Maldonado H (2009) *Behavioral and neuronal attributes of short- and long-term habituation in the crab Chasmagnathus*. *Neurobiology of Learning and Memory* 92(2): 176-182.
- Tomsic D y Romano A (2013) *A multidisciplinary approach to learning and memory in the crab Neohelice (Chasmagnathus) granulata*. En "Invertebrate Learning and Memory" (R Menzel y PR Benjamin eds.). Academic Press/Elsevier, San Diego, pp. 337-355.

- Troncoso J y Maldonado H (2002) *Two related forms of memory in the crab Chasmagnathus are differentially affected by NMDA receptor antagonists*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 72: 251-265.
- Tronson NC, Wiseman SL Olausson P y Taylor JR (2006) *Bidirectional behavioural plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A*. *Nature Neuroscience* 9(2): 167-169.
- Tronson NC y Taylor JR (2007) *Molecular mechanisms of memory reconsolidation*. *Nature Reviews Neuroscience* 8: 262-275.
- Tse D, Langston RF, Takeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP y Morris RGM (2007) *Schemas and memory consolidation*. *Science* 316(5821): 76-82.
- Tulving E y Pearlstone Z (1966) *Availability versus accessibility of information in memory for words*. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior* 5: 381-391.
- Tulving E y Thomson DM (1973) *Encoding specificity and retrieval processes in episodic memory*. *Psychological Review* 80(5): 352-373.
- Tulving E (1983) *Ecphoric processes in episodic memory*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 302: 361-371.
- Tulving E (2007) *Are there 256 different kinds of memory?*. En "The foundations of remembering: essays in honor of Henry L. Roediger III" (JS Nairne ed.) Psychology Press, New, pp. 39-52.
- Urcelay GP y Miller RR (2008) *Retrieval from memory*. En "Learning and memory. A comprehensive reference, Vol. 1: Learning theory and behaviour" (R Menzel y JH Byrne eds.). Academic Press/Elsevier, San Diego, pp. 53-71.
- Viskontas IV, McAndrews MP y Moscovitch M (2000) *Remote episodic memory deficits in patients with unilateral temporal lobe epilepsy and excisions*. *The Journal of Neuroscience* 20(15): 5853-5857.
- von Herten LSJ y Giese KP (2005) *Memory reconsolidation engages only a subset of intermediate-early genes induced during consolidation*. *The Journal of Neuroscience* 25(8): 1935-1942.
- Wiltgen BJ, Brown RAM, Talton LE y Silva AJ (2004) *New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation*. *Neuron* 44: 101-108.
- Wiltgen BJ y Silva AJ (2007) *Memory for context becomes less specific with time*. *Learning & Memory* 14: 313-317.
- Yamada A, Sekiguchi T, Suzuki H y Mizukami A (1992) *Behavioral analysis of internal memory states using cooling-induced retrograde amnesia in Limax flavus*. *The Journal of Neuroscience* 12(3): 729-735.
- Yang CH, Liu XM, Si JJ, Shi HS, Xue YX, Liu JF, Luo YX, Chen C, Li P, Yang JL, Wu P y Lu L (2012) *Role of IKK/NF- κ B signaling in extinction of conditioned place aversion memory in rats*. *PLoS One* 7(6): e39696.
- Yeh SH, Lin CH, Lee CF y Gean PW (2002) *A requirement of nuclear factor- κ B activation in fear-potentiated startle*. *The Journal of Biological Chemistry* 277(48): 46720-46729.