

Tesis Doctoral

Estudio de mecanismos de promoción e interferencia de la memoria de reconocimiento de objetos

Villar, María Eugenia

2016-10-04

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:

Villar, María Eugenia. (2016-10-04). Estudio de mecanismos de promoción e interferencia de la memoria de reconocimiento de objetos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Villar, María Eugenia. "Estudio de mecanismos de promoción e interferencia de la memoria de reconocimiento de objetos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-10-04.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio de mecanismos de promoción e interferencia de la memoria de reconocimiento de objetos.

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

María Eugenia Villar

Directora de Tesis: Prof. Dra. Haydée Viola

Consejero de estudios: Dr. Alejandro Delorenzi

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. E. De Robertis"
Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires- CONICET

Buenos Aires, 2016

*A mis padres,
Por darme alas, y ser el aire bajo ellas.*

Índice

Resumen	7
Abstract	9
Objetivos	11
Publicaciones	14
Agradecimientos	16
Abreviaturas	22
Introducción	25
Tipos de memoria.	26
Consolidación de la memoria.	29
De los mecanismos de plasticidad sináptica a la memoria.	32
Etiquetas, proteínas, plasticidad sináptica y memoria.	33
El ABC para los modelos de STC y BT.	36
¿Cuál es el sustrato físico de la memoria?	37
Promoción en la formación de memorias.	40
Interferencia en la formación de memorias.	42
Elección del modelo. Paradigmas conductuales de memoria de reconocimiento empleados en esta tesis.	44
¿Dónde habita la memoria de reconocimiento?	46
¿Qué nos preguntamos en este trabajo de tesis doctoral?	47
Materiales y métodos	49
Capítulo I “La memoria de largo término de reconocimiento de objeto en contexto (ROC) es susceptible de ser retroactivamente interferida.”	
Resultados – Capítulo I	67

Conclusiones – Capítulo I -----	85
Discusión – Capítulo I -----	86
Capítulo II “La consolidación y expresión de una memoria de Reconocimiento de objeto novedoso (RON) es susceptible de ser interferida retroactivamente.”	
Resultados – Capítulo II -----	94
Conclusiones – Capítulo II -----	110
Discusión – Capítulo II -----	111
Capítulo III “¿Cómo podemos promocionar la memoria?”	
Resultados – Capítulo III -----	118
Conclusiones – Capítulo III -----	134
Discusión – Capítulo III -----	135
Discusión Final -----	143
Referencias bibliográficas -----	147

Resumen

Estudio de los mecanismos de promoción e interferencia de la memoria de reconocimiento de objetos.

La memoria de reconocimiento hace referencia a la habilidad de identificar si un objeto o una situación fueron experimentados previamente. Esta memoria se evidencia en roedores por la tendencia natural a explorar por más tiempo aquellos estímulos novedosos respecto a los familiares. En el presente trabajo nos enfocamos en estudiar el fenómeno de interferencia retroactiva (IR) y de promoción de memorias de reconocimiento, utilizando diferentes versiones de la tarea: Reconocimiento de Objeto en contexto (ROC), Reconocimiento de Objeto Novedoso (RON) y Reconocimiento Espacial de Objetos (REO). Tanto para el fenómeno de IR estudiado en la tarea de ROC (Capítulo 1), y en la tarea de RON (Capítulo 2), como para el fenómeno de promoción estudiado en la tarea de REO (Capítulo 3), se caracterizaron las condiciones requeridas para que estos fenómenos ocurran (influencia del contexto y de los objetos), así como los requisitos temporales y los procesos mnemónicos afectados. Por último, inactivamos o bloqueamos la traducción proteica en el Hipocampo dorsal o en la Corteza medial prefrontal, con el fin de dilucidar si la colaboración o la competencia en el uso de la actividad cerebral o de recursos proteicos pueden explicar los fenómenos de promoción e interferencia de la memoria.

Palabras claves: Reconocimiento de objetos, interferencia retroactiva, memoria de largo Término, hipocampo dorsal, corteza prefrontal medial, promoción de la memoria.

Abstract

Study of promotion and interference mechanisms in object recognition memory

Recognition memory refers to the ability to identify an object or a situation and judge if it was previously experienced or not (Warburton y Brown, 2010). This memory is evidenced by the natural tendency of rodents to explore more novel over familiar stimuli. In the present work, we focused on retroactive interference (RI) and promotion phenomena in the formation of recognition memories. We used three different versions of it: the Object-in-Context (OIC) task, the Spontaneous Novel Object Recognition (SNOR) and the Object Location (OL) task. For both, the phenomenon of IR discussed in Chapter 1 using the task of ROC and in the Chapter 2 with the task of RON, and the phenomenon of promotion addressed in Chapter 3 using the task of REO, we characterized the temporary effectiveness and the types of inputs required for these phenomena to occur (by accessing the influence of context and objects). Finally, by inactivation or inhibition of protein translation in the dorsal hippocampus or medial prefrontal cortex, we determine whether the collaboration or the competition of brain activity or protein resources can explain the promotion or interference memory phenomena.

Key Words: Object recognition, retroactive interference, long-term memory, dorsal hippocampus, medial prefrontal cortex, memory promotion

Objetivos

Objetivos Generales:

Estudiar el fenómeno de interferencia retroactiva (IR) y de promoción de la formación de una memoria de largo término (MLT) utilizando tareas de aprendizaje de reconocimiento de objetos.

Caracterizar las condiciones requeridas para que estos fenómenos ocurran, así como los requisitos temporales y los procesos mnemónicos afectados.

Investigar el rol del Hipocampo dorsal y de la Corteza prefrontal medial en los fenómenos de promoción e interferencia de las memorias de reconocimiento.

Objetivos particulares:

Para el estudio de la interferencia retroactiva:

- Estudiar la interacción entre dos trazas de memoria que se están consolidando. Caracterizar la existencia del fenómeno de IR en un paradigma de reconocimiento de objetos en contexto (ROC, Capítulo 1) y en un paradigma de reconocimiento de objeto novedoso (RON, Capítulo 2). Describir el curso temporal entre los dos ensayos de entrenamiento para que ocurra la IR.
- Describir si la IR opera sobre la formación y/o expresión de MCT y la MLT.
- Describir qué características del segundo ensayo son importantes para que se produzca la IR (contexto novedoso/familiar, objetos novedosos/familiar, contexto vacío, etc).

- Estudiar la participación del Hipocampo dorsal y de la Corteza prefrontal medial en el fenómeno de IR de la memoria de ROC y RON.

Para el estudio de la promoción de la formación de MLT:

- Desarrollar un modelo de promoción de memorias de reconocimiento espacial de Objetos (REO, Capítulo 3) en dónde, contrariamente a la IR, en vez de perjudicar la formación de MLT se la pueda promover. Estudiar si dos ensayos de REO débiles e idénticas pueden promover la MLT de este aprendizaje, cuando sólo uno de ellos no logra hacerlo. Describir el curso temporal entre los dos ensayos de entrenamiento para que ocurra la promoción de MLT de REO.
- Describir qué características del segundo ensayo son importantes para que se produzca la promoción de MLT de REO (reentrenamiento, novedad espacial, estrés).
- Evaluar el requerimiento de síntesis proteica en el Hipocampo dorsal o de su activación, en el efecto promotor de la formación de MLT de REO por reentrenamiento.
- Estudiar la participación de la síntesis proteica en Hipocampo dorsal en el fenómeno de promoción de MLT de REO por estrés.

Publicaciones

Los experimentos presentados en este trabajo de tesis han resultado en las siguientes publicaciones:

“Retrograde interference of object-in-context long-term memory: role of dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex.”

María Cecilia Martínez*, *María Eugenia Villar**, Fabricio Ballarini, Haydée Viola

* Authors equally contributed for the preparation of this manuscript.

2014 DICIEMBRE, Hippocampus.

doi: 10.1002/hipo.22328

“Object recognition memory consolidation and expression are susceptible to retroactive interference.”

*Maria Eugenia Villar**, Maria Cecilia Martinez*, Pamela J Lopes da Cunha, Fabricio M Ballarini, Haydée Viola.

* Authors equally contributed for the preparation of this manuscript.

2016 MAYO, Neurobiology of learning and memory.

doi: 10.1016/j.nlm.2016.04.010

Otras publicaciones del período:

“Dorsal medial prefrontal cortex contributes to conditioned taste aversion memory consolidation and retrieval.”

Maria Carolina Gonzalez*, *Maria Eugenia Villar**, Lionel M Igaz, Haydée Viola, Jorge H. Medina.

* Authors equally contributed for the preparation of this manuscript.

2015 OCTUBRE, Neurobiology of learning and memory.

doi: 10.1016/j.nlm.2015.10.007

Agradecimientos

Agradecimientos.

Waw... Es increíble estar escribiendo estas líneas, finalizar esta etapa parecía tan distante, pero aquí estamos, y una de las cosas más maravillosas que tiene es que puedo detenerme y decir gracias. No siempre se tiene esta oportunidad de agradecer de forma tan explícita a todas aquellas personas que me apoyaron, acompañaron e hicieron posible que hoy este aquí, escribiendo esto.

Quiero empezar agradeciendo a Haydée, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de cumplir mi sueño de *hacer ciencia*, la verdad es que cuando terminé la licenciatura no estaba segura de cómo iba seguir mi vida académica, y no puedo estar más agradecida por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por los consejos, las vistas críticas, las correcciones, el análisis de los diseños experimentales y sus resultados. Sos una gran directora e hiciste de esta experiencia algo hermoso.

CeciM, mi *mentora*, gracias por estar ahí para mí desde el comienzo, por toda la sabiduría compartida, el apoyo, por “formarme” en lo que respecta al trabajo del laboratorio, por tu paciencia, gracias, gracias, gracias, decididamente esto no hubiese sido lo mismo sin vos, así que gracias por toda la experiencia, en lo que respecta al labo y en lo que no también, te admiro y quiero mucho, A triunfar!

Siguiendo con el grupo, Fabri, gracias por tus palabras a lo largo de este doctorado, sobre todo gracias por ciertas palabras en determinada conversación que desencadenaron la sucesión de eventos que me llevan ahora hacia mi siguiente sueño, desafío, gracias!, por todas las risas, por sal/pimentar la vida en el laboratorio.

A Pame, por todo el baile que trajiste al laboratorio, atesorar nuestros bailes al ritmo de *all about that bass* después de una larga jornada en la sala de comportamiento cronometro en mano.

A Paul, que fue una bocanada de aire fresco en este tramo final!, gracias, fue realmente estimulante discutir de ciencia con vos, nos hacía falta un francés en el laboratorio, no solo mejoraste nuestra comida, y diversificaste nuestras salidas extra laborales, sino que nos impusiste un riguroso consumo de mate! Gracias por todo el trabajo compartido y el que está por venir!

En esta parte quiero agradecer también a Diego, por siempre tomarse el tiempo para discutir de experimentos y ciencia cuando lo necesité, gracias por todos consejos, que me volvieron en muchos casos a la ruta del sentido común y la practicidad.

Ahora pasando a la otra parte del laboratorio, que no son del grupo, pero casi, a “los medinas” y como no podía ser de otra manera, quiero empezar por Jorge, la persona que le da nombre al grupo. Realmente no sé por dónde empezar, gracias por compartir tanta sabiduría y experiencia, por el apoyo y consejo científico y no científico. Por tantas enriquecedoras discusiones. Por ser una gran persona, y hacer de la vida en el labo un lugar tan humano.

Katche, cyn, punto de referencia indiscutido de cualquier interrogante, gracias por ser un constante punto de referencia con el cual poder discutir!, y por todos los momentos compartidos fuera del labo!

Las ex medinas, que se me grabaron en el corazón, Micol, tana, te adoro, tu intensidad y compromiso me encantan, gracias por ser mi amiga, y no puedo olvidarme de agradecerte por reencontrarme con la sala de lectura de la biblioteca,

definitivamente me ayudo a llevar a cabo este escrito!, aquí también entra mi grupo personal de autoayuda (ugis) Caro y Ceci, cuyos destinos las llevaron a tantos kilómetros de distancia pero que siento tan cerca, por todos los momentos compartidos desde el principio, experimentos, meriendas y caminatas... como las extraño!!, pero sobre todo gracias por todo el aguante!!, por soportar mi locura y altibajos emocionales en especial en estos últimos meses!, no sé que hubiera hecho sin su constante apoyo, las quiero chicas!! Flavia!, otra que se fue lejos! Fue hermoso compartir con vos mi primeros años de doctorado, siempre me diste muchas y buenas energías!, y recomendaciones literarias!!! Gracias.

Los más “nuevos” del labo, Fer, mas tandilense que tres veces, Magda, gracias por las sesiones de masajes!, Mika y Ana gracias!, posta chicos, son geniales.

Lina, gracias por la buena onda, el interés constante, sos una pieza fundamental en el laboratorio.

Pedro, sos una increíble persona, un superhéroe de la ciencia! Gracias por todo.

Magui, no pierdas nunca esa sonrisa!, gracias.

Lion, gracias por tanta discusión, si Lion lo aprueba está bien hecho! Sos un referente de calidad, gracias por todo.

Noe, gracias por el consejo, por ser un referente y modelo a seguir.

Facu, me encanta que esta experiencia me haya hecho conocerte! Te adoro!!
Sos un groso.

Fuera del laboratorio pero dentro del instituto, También conocí personas geniales a las cuales tampoco puedo dejar de agradecer, Anto, Fer, Pau, Lola, Facu y Fran. Posta gracias!!, fueron realmente un soporte durante toda esta experiencia, no

solo en lo laboral sino también en lo personal, estuvieron ahí para mi siempre dispuestos a darme una mano, consolarme o prestarme el oído, los quiero muchísimo (si no fuese una viola, me hubiese encantado ser una ledda-paratcha).

A las “chicas de la facu”, amigas en esa intensa aventura que fue la carrera de biología, Poli, Nanu, Lauri, Magda y Pato. Por las largas sesiones de estudio compartidas, las cursadas, las salidas. Podría enumerar aquí miles de razones por las que les estoy agradecida, desde la sesión de 24hs de estudio intensivo de zoo a la que me arrastraron y gracias a la cual aprobé, hasta las geniales vacaciones y salidas que compartimos. Las quiero amis!!!!

Y ahora sí, toda la gente que fuera del ámbito científico...

A mi mamá, a quien extraño dolorosamente, mami, esto no hubiese sido posible sin vos. No me alcanzan las palabras para agradecerte todo lo que hiciste por mí, la imposibilidad de compartir este momento tan feliz con vos es lo único que lo opaca. Siempre me alentaste y ayudaste a conseguir mis metas, me diste la libertad de elegir y apoyaste mis decisiones, conflictiva, contradictoria, muchas veces difícil como fuiste, pero siempre mirando para adelante, plantándote contra la adversidad y dándole pelea. Una persona incondicional en mi vida, tu amor me acompaña cada día. Gracias Má!!

A la otra persona incondicional en mi vida, Pu, gracias, esto tampoco hubiese sido posible sin vos, tu amor y apoyo son invaluables en mi vida, y sin ellos no estaría aquí. Te quiero pu!! Por dejarme saquear tu biblioteca desde muy temprano, y contagiarme tu gusto por la ciencia ficción, por hacer de mi una trekkie, por estar

siempre ahí para mí, y ayudarme siempre. No puedo estar más agradecida por los padres que tengo, sin ellos no estaría escribiendo esto ahora, los amo.

Lima, hermano querido, se que somos muy diferentes, pero el amor que nos une es más fuerte, te adoro, tu visión de la vida siempre me ayuda a salir adelante, gracias por estar ahí para mí, tu consejo de “visualizarme en lo que deseo que suceda” me acompaña siempre. Gracias Juanis, te amo.

A mi abuela Carmen, que ya no está, pero fue una gran compañera, A mis abuelos Lucia y Roberto, que aun no tienen muy claro que es lo que hago, pero me aman y los amo profundamente.

Ema, todo un apartado especial para vos, posta, ya desde la carrera, has sido un apoyo constante, sos él no biólogo, *satirizador* de la biología, que mas apoyo me ha dado. No sólo acompañándome en esos largos periodos de estudio chateando mientras me quemaba las pestañas, sino que estando ahí para mí innumerables veces!, creo que algo de biólogo en el fondo tenés, al menos algo debe de habésete pegado de tanto que me ayudaste. Gracias Ema, te quiero!

Turco, amigo querido, gracias, por tanto!, te quiero.

A Belén y Ricky, por crecer, literalmente, a mi lado, los amo!

A Marga y la peque, que estuvieron encima mio (literalmente), mientras escribía esto.

Y por último pero para nada menos importantes, a mis amigas del alma, mis medias naranjas, peras y mandarinas!, Marie, Pete, lu, Porcha, mis almas gemelas, los pilares de mi vida, la familia que elijo, gracias, las amo chicas.

Abreviaturas

Abreviaturas

BT: Etiquetado conductual (del inglés behavioral tagging).

CA: Campo abierto.

CPFm: Corteza prefrontal medial.

CREB: Elemento de unión de respuesta a AMPc (del inglés cAMP response element-binding).

CTX: Contexto.

Ei: Evitamiento Inhinitorio.

Hp : Hipocampo .

HPA : eje Hipotalamico-pituitario-adrenal.

IR: Interferencia Retroactiva.

IEG : genes de expresión temprana (del ingles immediate early genes).

iti: intervalo Entre Ensayos (del inglés inter-trial interval).

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos (del inglés Mitogen-Activated Protein Kinases).

MCT: Memoria de Corto término.

MLT: Memoria de Largo término.

Obj: Objeto.

PRPs: Proteínas de Plasticidad (del inglés Plasticity Related Proteins).

RG: Receptores de glucocorticoides.

RM: Receptores de Mineralocorticoides.

ROC: Reconocimiento de objeto en contexto.

RON: Reconocimiento de Objeto novedoso.

SNC: Sistema Nervioso Central.

STC: Etiquetado sináptico y captura (del inglés *synaptic tagging and capture*).

Introducción

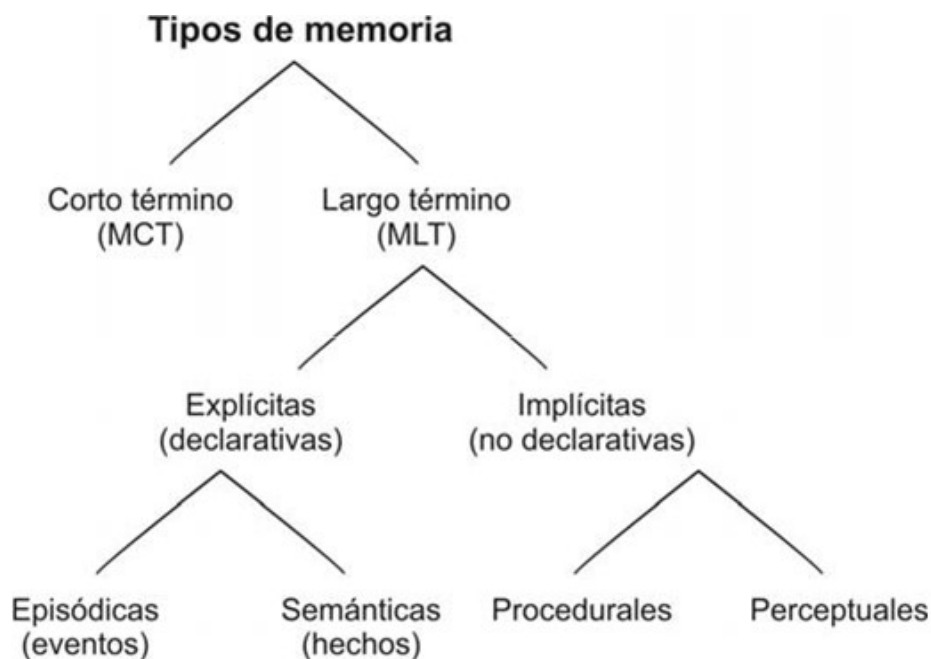
Introducción

¿Qué es la memoria? ¿Dónde se guarda? Podemos empezar a responder estas preguntas diciendo que la memoria es un proceso cerebral. En el ámbito científico, la *memoria* es definida como la capacidad de adquirir, almacenar y evocar información (Kandel y Squire, 2000). Durante el aprendizaje, los animales adquirimos la información acerca de una experiencia comportamental, la que se codifica en circuitos neuronales, pudiéndose expresar como un cambio en el comportamiento (Héctor Maldonado “la memoria animal” 2008), cuando un sujeto está en contacto con su entorno recibe constantemente información acerca del mundo que lo rodea a través de los sentidos. Pero no podemos recordar absolutamente todo lo que nos sucede, sino nos volveríamos locos como Funes el memorioso del cuento de Borges. Sólo parte de esta información adquirida es procesada a nivel central en el cerebro, donde se codificará y, si las condiciones están dadas para que ocurra, posteriormente será almacenada en una traza duradera. Al proceso por el cual una memoria se vuelve estable se lo denomina “consolidación”, que proviene del vocablo latino consolido, hacerse sólido (Dudai, 2004). Una vez almacenada, la información puede ser recuperada en un proceso conocido como evocación.

A nivel experimental, es decir en el laboratorio, el aprendizaje ocurre a través del entrenamiento. Luego del entrenamiento, ocurrirán los fenómenos intracelulares e inter-estructurales que conducirán a la consolidación de la memoria (McGaugh, 2000; Dudai, 2004). Posteriormente, en la instancia del testeo el sujeto expresa lo aprendido y de esta forma se evalúa su memoria.

Tipos de memoria.

Existen muchos tipos de memorias y como a nosotros los humanos y en particular a los científicos nos encanta encasillar las cosas, los diferentes tipos de memorias no escapan a esto. La memoria puede clasificarse según el tipo de estímulo, el tipo de tarea o en función del sustrato donde va a ser almacenada. Incluso, dado que no todas las memorias tienen la misma duración también se clasifican en función de ésta. Según el tipo de aprendizaje y la forma de acceder a ellas, las memorias pueden ser explícitas (declarativas) o implícitas (de procedimiento) (Esquema 1). Las memorias implícitas no requieren una evocación mediada por la conciencia y se basan en aprendizajes motores, hábitos o habilidades perceptuales, como por ejemplo practicar un deporte, dibujar o andar en bicicleta. A diferencia de las memorias implícitas, las memorias explícitas se caracterizan por una recuperación consiente de la información. Este tipo de memoria es la que nos permite relatar historias o recapitular una serie de eventos. Éstas a su vez se suelen subdividir en semánticas (hechos) y episódicas (eventos): la primera consiste en información sobre el mundo, como cuál es la capital de Canadá o que la bicicleta es un artefacto de dos ruedas que nos permite movilizarnos, mientras que la segunda se caracteriza originalmente como la evocación de eventos específicos del pasado personal en humanos, como por ejemplo, el día que aprendimos a andar en bicicleta, quien nos enseñó y cuantas veces nos caímos (Tulving, 2002)



Esquema 1. Taxonomía de los tipos de memoria.

La memoria de largo término se puede dividir en memorias explícitas (declarativas) e implícitas (no declarativas). La memoria implícita afecta a la conducta sin participación de la conciencia. La memoria explícita se subdivide en memoria semántica, representando el conocimiento general sobre el mundo, y la memoria episódica, representando el conocimiento personal sobre el pasado propio. Aunque esta forma genérica de división se aplica directamente a los sistemas de memoria en humanos, una clasificación similar sería aplicable a la memoria en animales, aunque pueda carecer de algunas características típicas de las memorias en humanos. Adaptado de Kandel y Squire, 2000

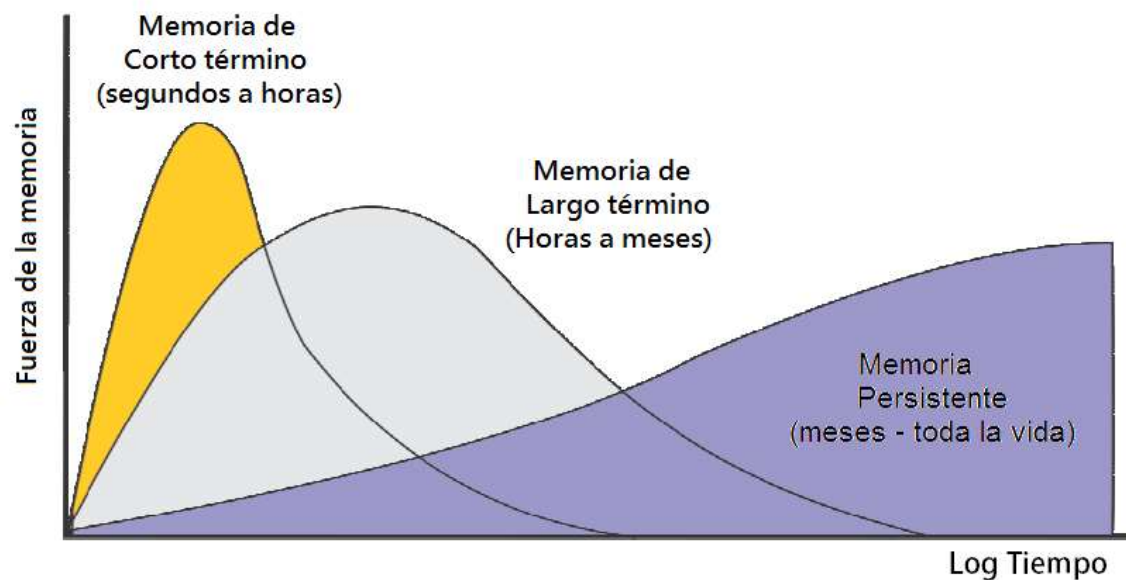
Otra manera de agrupar las memorias es en función de la modalidad del estímulo: pudiendo ser aversivas, no aversivas, apetitivas, espaciales, etc. Las memorias aversivas son aquellas que tienen un componente negativo (por ejemplo, experiencias que generan miedo, dolor, malestar) para quien las experimenta. Cuando el sujeto evoca ese evento, modifica su conducta a fin de evitar volver a pasar por este tipo de sensación displacentera. En contraparte, las memorias apetitivas son aquellas que tienen un componente positivo, placentero para quien las experimenta (por ejemplo, experiencias relacionadas con comida, sexo, alegría, etc.). En este caso, el

sujeto tenderá a modificar su conducta para repetir la experiencia placentera. En cambio, en las memorias espaciales, el sujeto aprende la asociación entre ciertos estímulos (ya sean negativos, positivos o neutros) y el ambiente a su alrededor (Silva et al., 1998; Morici et al., 2015).

En cuanto a su duración, podemos clasificar a las memorias en memorias de corto y memorias de largo término (MCT y MLT) (Vianna et al., 2000a). Las memorias de largo término no son establecidas en su forma definitiva inmediatamente luego de ser adquiridas. Necesitan atravesar un proceso de consolidación, que requiere de eventos moleculares en estructuras involucradas en su procesamiento. Dichos eventos son cambios plásticos dependientes de síntesis de proteínas (McGaugh, 2000; Izquierdo et al., 2002a; Quevedo et al., 2004). Una vez consolidadas, estas memorias pueden durar muchas horas, días y hasta semanas. Por el contrario, la MCT no requiere de la síntesis de proteínas de plasticidad (PRPs, del inglés “plasticity related proteins”), siendo por lo tanto insensible a todos los factores que afecten la transcripción y la traducción de genes (Goelet et al., 1986; Izquierdo et al., 2002b; Quevedo et al., 2004). En términos operacionales, en este trabajo la MCT es evaluada en una sesión de testeo realizada a pocas horas del aprendizaje y la MLT es evaluada a las 24 horas de ocurrido el aprendizaje (entrenamiento). Aunque ésta es una definición arbitraria ya que hay MLTs que pueden durar semanas, meses e incluso toda una vida y se las denomina memorias persistentes (McGaugh, 2000; Bekinschtein et al., 2010) (esquema 2).

Inicialmente se propuso que la formación de MCT, precedía a la formación de la MLT (Hebb, 1949; Gerard, 1949). Posteriormente, a partir de la evidencia

experimental, se propuso que hay al menos dos etapas en la formación de las memorias (independiente y dependiente de síntesis proteica) y que incluso podrían ser procesos simultáneos e independientes entre sí (McGaugh, 2000; Izquierdo et al., 2002b; Rossato et al., 2009).



Esquema 2) Clasificación de las memorias por su duración.

La estabilización de una nueva traza es dependiente del tiempo y sugieren que la MCT y las diferentes etapas de las memorias duraderas no están enlazadas de forma secuencial si no que serían procesos independientes que actúan en paralelo. Las etapas iniciales involucrarían cascadas de señalización intracelular y síntesis de proteínas mientras que las etapas más tardías de la consolidación implicarían la interacción de sistemas cerebrales en la reorganización y estabilización de las conexiones distribuidas. (Adaptado de McGaugh, 2000). Duración de las memorias en roedores: Memoria de corto término, unas pocas horas. Memoria de largo término, varias horas, días. Memoria de largo término persistente, muchos días, semanas / meses.

Consolidación de la memoria.

Tal como se mencionó antes, la consolidación se refiere a la estabilización del aprendizaje luego de la adquisición. Este proceso subyace a la formación de los

diferentes tipos de MLT con independencia de su clasificación. La teoría clásica de la consolidación de la memoria dice que la nueva información inicialmente atraviesa un período de fragilidad y se estabiliza con el tiempo dando lugar a una MLT. Durante ese período, diferentes cambios moleculares y celulares ocurren en los lugares donde se forma la memoria y afectan ese guardado (McGaugh, 2000). Una condición necesaria para la formación de una MLT es la inducción de la síntesis de ciertas proteínas (Schafe et al., 1999; McGaugh, 2000; Quevedo et al., 2004; Costa-Mattioli y Sonenberg, 2008).

Hay evidencia considerable que deja pensar que la consolidación de la memoria es una función adaptativa para permitir que los procesos endógenos activados por la experiencia puedan modular positiva o negativamente la formación de la memoria (McGaugh 2000). Durante mucho tiempo se ha sugerido que los recuerdos recientes necesitan tiempo para estabilizarse, y que, a menudo, estas trazas son propensas a la interferencia por estímulos distractores, lesiones o toxinas, que, sin embargo, pierden su eficacia con el paso del tiempo (Dudai, 2004).

El término "consolidación" se le atribuye a Muller & Pilzecker, quienes descubrieron, en una serie de estudios llevados a cabo en Göttingen entre 1892 y 1900, que la memoria necesita tiempo para fijarse, o someterse a *Konsolidierung* (Muller & Pilzecker 1900).

La consolidación implica la reorganización, tanto a nivel sináptico como sistémico. La *consolidación sináptica o celular* se completa en cuestión de horas luego del entrenamiento, y consiste en la estabilización de los cambios en la conectividad sináptica en circuitos localizados (Squire y Kandel, 1999; Ledoux, 2001; Dudai, 2004).

En contraste, la *consolidación sistémica* es un proceso más prolongado e implica reorganización gradual de las regiones del cerebro que soportan la memoria. Por ejemplo, esto puede implicar un cambio dependiente del tiempo en los circuitos que soportan la recuperación de la memoria (Squire y Kandel, 1999; Dudai, 2004). Entonces podemos decir que la consolidación involucra dos tipos de procesos con diferentes propiedades cinéticas, uno rápido y otro lento. (Dudai, 1996; Dudai y Morris, 2000; Frankland y Bontempi, 2005).

El proceso rápido de consolidación sináptica o celular implica los cambios morfológicos necesarios para la estabilización inicial de las memorias en los circuitos afectados. Estos cambios, que incluyen el crecimiento de nuevas conexiones sinápticas, así como la reestructuración de las conexiones sinápticas existentes, tienen lugar en las primeras horas que siguen aprendizaje (Squire y Kandel, 1999; Ledoux, 2001; Dudai, 2004). Dependen de una cascada que se inicia por la activación sináptica, lo que conduce al reclutamiento de sistemas de segundos mensajeros, la activación de factores de transcripción y, en última instancia, la síntesis de nuevas proteínas necesarias para los cambios estructurales. Cualquier manipulación, ya sea comportamental (por ejemplo, la interferencia retroactiva), farmacológica (por ejemplo, bloqueadores de la síntesis proteica, Bourtchouladze et al., 1998) o genética (por ejemplo, la alteración genética de proteína CREB, Kida et al., 2002) que interfiera con cualquier parte de esta cascada bloqueará la formación de la memoria. De igual manera tratamientos similares aplicados fuera del período de consolidación no pueden perturbar la memoria (Frankland y Bontempi, 2005).

De los mecanismos de plasticidad sináptica a la memoria:

El proceso de formación de la memoria, por todo lo expuesto hasta el momento, muestra algunas de las siguientes características: permite la retención de información específica sobre el mundo, pasando inicialmente por un estado frágil luego del cual la información puede ser consolidada lentamente en una MLT, que puede eventualmente persistir durante toda la vida del animal (Muller & Pilzecker 1900; Lechner et al., 1999; McGaugh, 2000; Lima et al., 2009). Pero ahora bien, ¿qué es la memoria en sí? Se ha postulado que cambios dependientes de actividad de las conexiones sinápticas en el SNC son los mecanismos que les permiten a los organismos adaptarse conductualmente, aprender y recordar (Martin et al., 2000). ¿Qué es lo que pasa en esas conexiones sinápticas que generan dicha traza mnemónica? Algunos cambios plásticos que detallaremos en el párrafo siguiente.

La potenciación sináptica de largo plazo (LTP) y la depresión de largo plazo (LTD) son los procesos de plasticidad sináptica que subyacen a algunos tipos de memoria debido a la semejanza que poseen con los atributos generales de la traza mnésica (Bliss y Collingridge, 1993; Bear y Malenka, 1994; Lisberger, 1998; Martin et al., 2000). El LTP, descubierto por Bliss y Lomo, en los años 70 consiste en el aumento de la fuerza de las conexiones sinápticas (eficacia sináptica) luego de una estimulación tetánica en preparaciones in-vitro. Si bien éste es un fenómeno que ocurre a nivel celular, mientras que la memoria es un fenómeno a nivel del organismo, existen similitudes que lo convierten en un atractivo análogo de la memoria. Por un lado tanto el LTP como la memoria son fenómenos en los que la información guardada es específica para cada estimulación y es almacenada de manera persistente

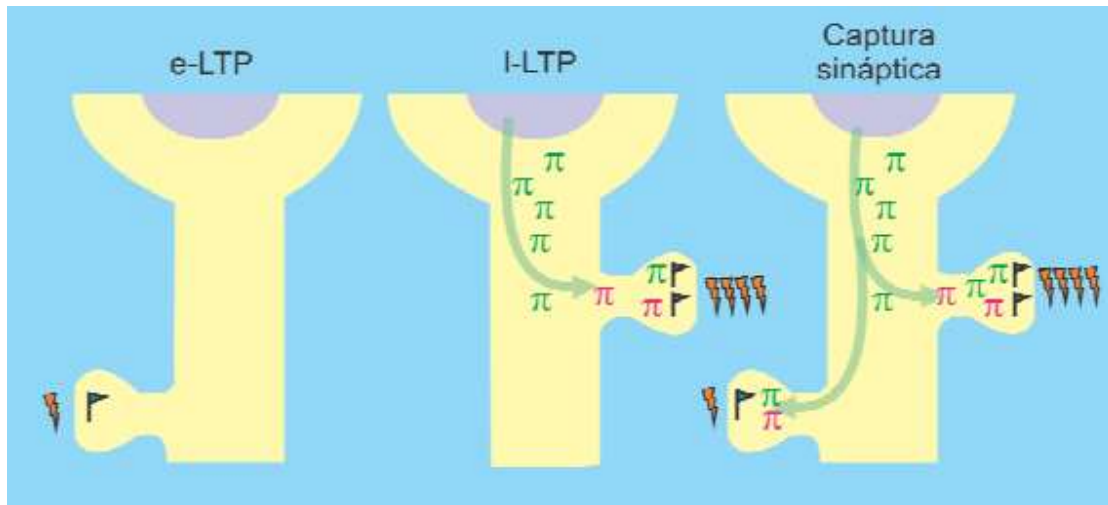
en el tiempo (Martin et al., 2000). Por otro lado presentan un paralelismo relacionado a sus características cinéticas: existe MCT y una MLT, como también es posible inducir un potenciación de largo término temprana (e-LTP temprana) independiente de la transcripción y traducción de proteínas; y otra de largo término (l-LTP) dependiente de dichos procesos (Nicoll y Malenka, 1999; Martin et al., 2000; Izquierdo et al., 2006). Estas similitudes y otras fueron las que condujeron a la postulación de la “Hipótesis de la plasticidad sináptica y memoria” (Martin et al., 2000; Martin y Morris, 2002). Esta hipótesis afirma que las modificaciones plásticas dependientes de la actividad son inducidas en las sinapsis apropiadas durante la formación de la memoria. Por lo tanto, es lógico pensar que los cambios plásticos deben ocurrir en esas áreas del cerebro donde se está procesando la memoria y que son a la vez necesarios y suficientes para el almacenamiento de la información (Martin et al., 2000).

Etiquetas, proteínas, plasticidad sináptica y memoria.

Hemos mencionado que tanto para la consolidación de memorias duraderas como para el establecimiento de una plasticidad sináptica de largo plazo, es requisito que se sinteticen proteínas (Stanton y Sarvey, 1984; Goelet et al., 1986; Frey et al., 1988; Izquierdo et al., 2002b). Los estímulos fuertes son capaces de inducir la síntesis de proteínas y producir dichos cambios duraderos. Sin embargo, hace un par de décadas se observó que eventos que tienen lugar tanto antes como después de un estímulo débil pueden ejercer influencia sobre el mismo, generando una respuesta duradera. Lo cual nos lleva a la pregunta fundamental sobre cuáles son los mecanismos que subyacen a este fenómeno de asociación tardía. La respuesta a esta

pregunta puede encontrarse al considerar los cambios duraderos que ocurren a nivel de los inputs activados por el estímulo. La teoría del Etiquetado sináptico y captura (STC del inglés *synaptic tagging and capture*, esquema 3) propone un mecanismo celular que puede explicar como una estimulación por una vía que normalmente lleva a un potenciación de e-LTP puede establecerse en una l-LTP si una vía diferente, pero que converge a una población común de neuronas, es fuertemente tetanizada dentro de una ventana temporal específica (Frey y Morris, 1997).

La hipótesis del STC afirma que el LTP involucra el etiquetado local de las sinapsis en el momento en que es inducido. Por lo tanto, estímulos que inducen e-LTP generan una etiqueta sináptica transiente, pero solo aquellos estímulos que inducen l-LTP podrán además de establecer la etiqueta, desencadenar la síntesis proteica (PRP). Las etiquetas son capaces de capturar las PRPs, sintetizadas debido a la fuerte estimulación tetánica, y es esta interacción entre etiquetas y PRPs es el suceso esencial para la estabilización de la potenciación de e-LTP a l-LTP (Frey y Morris, 1997, 1998; Redondo y Morris, 2011). Este mecanismo presenta una elevada especificidad dado que la potenciación sólo sucederá en aquellos inputs que fueron marcados por la actividad. Sólo sinapsis específicas serán potenciadas, dado que las proteínas, ya sean sintetizadas en el soma o en los dominios dendríticos locales, se distribuirán a lo largo del árbol dendrítico de forma relativamente difusa y careciendo de una dirección específica, pero sólo al ser capturadas por las sinapsis etiquetadas podrán ser utilizadas (Frey y Morris, 1998).



Esquema 3) Esquema de la activación sináptica y los procesos de potenciación utilizando la hipótesis de "etiquetado sináptico y captura".

Se observa que un e-LTP, generado a partir de una estimulación débil, solo genera etiqueta (bandera), mientras que una estimulación fuerte que genera un I-LTP, no sólo genera etiquetas sino que también estimula la síntesis de proteínas (π), y por último se muestra la convergencia de ambos procesos, en donde la etiqueta establecida por el estímulo débil captura las proteínas provistas por el estímulo fuerte (Captura sináptica).

Si la formación de memorias utiliza mecanismos plásticos como el de LTP, entonces podría verse este fenómeno de asociación tardía entre aprendizajes que converjan en tiempo y espacio. Se ha demostrado que entrenamientos débiles que sólo generan MCT pueden consolidarse en MLT si los animales experimentan un evento fuerte (que induce síntesis de proteínas) en una determinada ventana temporal alrededor del entrenamiento débil. Este es un proceso que fue llamado Etiquetado conductual (BT, del ingles behavioral tagging)(Moncada y Viola, 2007). Lo que sugiere que el entrenamiento débil genera una etiqueta donde las PRPs proporcionadas por el evento fuerte serán capturadas, con el fin de establecer una traza mnemónica persistente.

Tanto STC y BT proponen mecanismos análogos, mediante los cuales los cambios a largo plazo inducidos por la estimulación electrofisiológica y los procesos de aprendizaje pueden ocurrir.

EL ABC para los modelos de STC y BT.

Los efectos de la interacción entre dos experiencias conductuales sobre la formación de una MLT en ratas es el tema de estudio de nuestro grupo de trabajo, y llevaron al desarrollo de la hipótesis del BT, basados en el de STC y fundadas en tres puntos principales (Viola et al., 2014):

A) El estímulo/entrenamiento débil induce tanto fenómenos de plasticidad de corto plazo como las etiquetas capaces de capturar las PRPs. Un estímulo/entrenamiento fuerte e independiente del débil, que ocurre alrededor de éste, induce la síntesis de las PRPs. La captura de los PRPs por las etiquetas permite los procesos de plasticidad duraderos selectivamente relacionados con los inputs activados por el estímulo débil (ver esquema 4).

B) Tanto la etiqueta, como las PRPs tienen una duración transitoria.

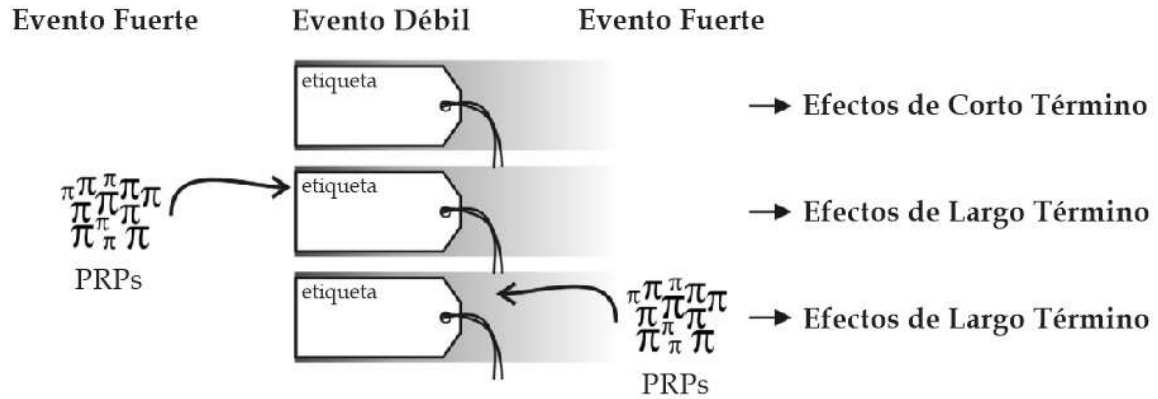
C) Con el fin de capturar los productos, etiquetas y PRPs debe estar presente en el mismo sustrato neural y al mismo tiempo.

A partir de estos tres postulados clave, emergen tres predicciones principales:

1. Los inhibidores de la síntesis proteica deben poner en peligro el mecanismo de etiquetado conductual.

2. Si las PRPs llegan cuando la etiqueta ya ha caído, el mecanismo de captura no debería funcionar.

3. Si las PRPs se sintetizan y se entregaron lejos del punto en el que las etiquetas fueron (o serán) establecidas, el mecanismo de la captura no podría ocurrir.



Esquema 4) Resumen de los procesos de marcado y captura.

Un evento débil que induce cambios transitorios en el cerebro puede establecer fenómenos de larga duración a través de un proceso de etiquetado y de captura. Las etiquetas generadas por el evento débil son capaces de capturar PRPs sintetizados por un evento fuerte independiente. Este proceso presenta una simetría dado que la producción de PRPs a ser capturados pueden ser sintetizados antes o después de la fijación de la etiqueta. Adaptado de Viola et al., 2014

¿Cuál es el sustrato físico de la memoria?

Hasta aquí hemos hablado de los mecanismos que llevan a la formación de las memorias, pero ¿Dónde ocurren estos procesos?

Se piensa que las memorias son codificadas mediante cambios físicos en el cerebro o *engramas* (Semon, 1921, 1923). El término Engrama fue acuñado por Semon hace más de 100 años. Hace referencia al sustrato físico de la memoria, a los cambios físicos y químicos duraderos inducidos por el aprendizaje. La formación del engrama requiere del reforzamiento de los contactos sinápticos entre poblaciones de neuronas (ensambles) y presenta las siguientes 4 características (Schacter D.L., 2001):

1) Está representado por cambios persistentes en el cerebro como resultado de una experiencia o evento específico. 2) Posée el potencia para *ecphory*, lo que significa que puede expresarse comportamentalmente mediante la interacción con pistas que generan su evocación. Es decir, es la capacidad de la traza mnesica ó engrama de salir de su estado latente y manifestarse comportamentalmente. 3) Refleja lo que ocurrió en la codificación y predice lo que puede ser recuperado durante la evocación posterior. 4) Puede existir en un estado latente (durmiente) entre los dos procesos activos de codificación y recuperación.

El engrama no se encuentra confinado a una sola región neuronal, sino que más bien está compuesto por una red ampliamente distribuida de ensamblajes neuronales (Josselyn et al., 2015). Es importante destacar que el engrama no es estático. Luego de la codificación, el proceso de consolidación puede alterar la organización física y química de los engramas, modificándolo en termino de fuerza y calidad (Dudai y Eisenberg, 2004).

¿Existen células y sinapsis específicas dentro de un circuito dado que se comprometen o participan durante el aprendizaje, o esto es ocurre al azar?

Al proceso que determina cuales son las neuronas y las sinapsis que se encargaran de guardar una determinada memoria se lo conoce como *memory allocation* (Silva et al., 2009), lo que podríamos traducir como asignación o distribución de la memoria. La asignación neuronal (*neural allocation*) es un fenómeno de la formación de la memoria recientemente descubierto que da cuenta de cómo neuronas específicas en una red, son comprometidas con el almacenamiento de una memoria específica. Este fenómeno se haya estrechamente relacionado con los

mecanismos de asignación sinápticas (es decir, STC, clusterin de espinas, y otros) que determinan cómo la información es repartida en sinapsis específicas (Rogerson et al., 2014).

Estudios iniciales de *memory allocation* utilizando vectores virales demostraron que un cambio en los niveles del elemento de unión de respuesta a AMPc (CREB) dentro de una subpoblación específica de neuronas de la amígdala lateral (AL) afecta la probabilidad de que estas neuronas sean reclutadas en una memoria de miedo auditiva: el aumento de los niveles de CREB aumenta la probabilidad de que estas neuronas sean involucradas en este condicionamiento, mientras que la disminución de los niveles de este factor de transcripción tiene el efecto contrario (Han et al., 2007, 2009; Zhou et al., 2009). Estos mismos resultados fueron obtenidos también en la AL y en la corteza insular durante la codificación de la memoria de condicionado de aversión al gusto (Zhou et al., 2009; Sano et al., 2014), en la AL en la codificación de condicionamiento de preferencia de lugar con cocaína (Hsiang et al., 2014), y en el giro dentado durante la codificación de una memoria de miedo contextual (Sekeres et al., 2012).

Estudios posteriores demostraron que las neuronas con una mayor actividad de CREB fueron asignadas preferentemente porque eran más excitables que sus vecinas (Zhou et al., 2009; Sekeres et al., 2012; Yiu et al., 2014). Entonces, otros mecanismos que afecten la excitabilidad neuronal también pueden afectar la asignación neuronal. Una hipótesis tentadora propuesta en el trabajo de Rogerson y col. (2014) es que los mecanismos implicados en la consolidación de una memoria también pueden provocar cambios en la excitabilidad de las neuronas involucradas en

su almacenamiento, de modo que durante un tiempo son más propensas a estar involucradas en el almacenamiento de otras memorias posteriores. De esta manera la *memory allocation* funcionaría como un vínculo entre dos memorias que se forman dentro de un determinado intervalo temporal. La idea es que el primer evento de formación de memoria activa CREB en una subpoblación de neuronas. Esta activación conduce a un aumento de la excitabilidad en estas neuronas que entonces desvía el almacenamiento de la memoria de un segundo evento para muchas de las mismas neuronas que almacenan el primero. Este mecanismo permitiría entonces que se recluten en una misma neurona la codificación de la memoria tanto del evento fuerte como del débil, permitiendo así que los procesos de STC y BT discutidos en la sección anterior tengan lugar (Rogerson et al., 2014).

Promoción en la formación de memorias.

Los efectos de la interacción entre dos experiencias conductuales sobre la formación de una MLT en ratas es el tema de estudio de nuestro grupo de trabajo. En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha demostrado que cuando los animales exploran un ambiente novedoso (campo abierto, CA, estímulo Fuerte) cerca de la adquisición de un aprendizaje asociativo (estímulo débil, entrenamiento débil en el paradigma de evitación inhibitoria), la memoria transiente que éste induce se establece de forma duradera (Moncada y Viola, 2007). Es decir, cuando un entrenamiento es débil y no induce la formación de MLT, su adecuada asociación con otra tarea hace posible el surgimiento de su MLT, a este proceso llamamos promoción de la memoria.

Hemos descrito que este fenómeno de promoción es dependiente de la síntesis de proteínas gatillada por el CA y dependiente de la neurotransmisión dopaminérgica y noradrenérgica en la región CA1 del hipocampo (Moncada y Viola, 2007; Moncada et al., 2011). En el modelo de BT planteado por nuestro laboratorio, las PRPs derivadas de la experiencia novedosa pueden ser utilizadas para promover la formación de una MLT a partir de una traza de corta duración inducida por un entrenamiento suave. Este tipo de entrenamiento suave, que no puede formar una MLT por sí mismo, generaría las etiquetas capaces de capturar las PRPs cuya síntesis fue inducida por la otra experiencia.

Nuestros experimentos fueron los pioneros en esta área y postulamos que el etiquetado conductual opera como mecanismo general en la formación de MLT, logrando resultados similares en paradigmas de miedo contextual, reconocimiento espacial de objetos y aversión condicionada al gusto (Ballarini et al., 2009; Moncada et al., 2011; Viola et al., 2014). El fenómeno de BT ha sido explorado y demostrado por otros grupos de investigadores quienes utilizaron paradigmas conductuales tanto aversivos como espaciales (Merhav y Rosenblum, 2008; Wang et al., 2010; Lu et al., 2011; Redondo y Morris, 2011; Almaguer-Melian et al., 2012; de Carvalho Myskiw et al., 2014; Salvetti et al., 2014). Nuestro grupo además ha demostrado que aprendizajes débiles asociados a situaciones novedosas, no solo inducen la consolidación de una memoria en un modelo murino, sino también en humanos. Utilizando una población de alumnos de 7 a 9 años de diversos establecimientos educativos, demostramos que experiencias nuevas (pero no aquellas familiares) dentro del aula, mejoran memorias gráficas o literarias cuando ocurren una hora

antes o después de la situación de aprendizaje (Ballarini et al., 2013). Estos resultados sugieren que el mecanismo del BT podría estar operando también en humanos. Una publicación reciente avala esta idea (Dunsmoor et al., 2015).

Interferencia en la formación de memorias.

La interacción entre dos tareas conductuales no siempre deja como resultado la promoción de la memoria. Hace más de un siglo Muller y Pilzecker (1900) en sus estudios pioneros realizados en humanos, encontraron que la memoria del aprendizaje de una nueva información podía ser interrumpida por el aprendizaje de otra información poco después del aprendizaje original. En nuestra vida cotidiana atravesamos un número considerable de experiencias que varían en términos de componentes emocionales y nuestra conciencia o estado atencional acerca de ellas. Sin embargo, la mayoría de las experiencias no van a ser almacenadas en nuestra memoria. Por ejemplo, estamos tratando de guardar en nuestra memoria un número telefónico y de golpe somos distraídos por un accidente de tránsito o el encuentro fortuito con un conocido. Probablemente, el número sea olvidado mientras que el accidente o encuentro van a ser almacenados y recordados.

La interferencia se refiere al efecto amnésico de un aprendizaje nuevo o de cierta información sobre otro material a ser codificado. Si es sobre un aprendizaje previamente adquirido, se la llama interferencia retroactiva, mientras que cuando precede al aprendizaje es anterógrada (Sara y Hars, 2006). La interferencia retroactiva (IR) es un tipo de amnesia que ha sido ampliamente estudiada durante

más de un siglo y se caracteriza por el efecto disruptivo de una nueva experiencia de aprendizaje sobre el material previamente codificado (Wixted, 2004).

Bajo la hipótesis del BT hemos descrito que la utilización de los recursos proteicos lleva a la estabilización de las memorias. El marco conceptual de esta hipótesis también contempla que la competición entre dos trazas mnesicas para su consolidación puede ocurrir cuando los recursos proteicos son limitados. La interferencia en la formación de memorias puede ser, por lo tanto, también explicada en términos de competición por recursos proteicos entre dos tareas de aprendizaje diferentes. Un buen ejemplo de esto, lo encontramos en los trabajos realizados por Martínez y col en el año 2012 dónde se demostró que un entrenamiento aversivo suave de evitación inhibitoria induce IR sobre la formación de MLT de habituación a un CA. Paralelamente, la MLT de la tarea de aversiva era promovida en forma dependiente de la síntesis proteica inducida por el CA. Estos experimentos sugieren que las PRPs inducidas por el CA se comparten para intentar consolidar la memoria de ambas tareas conductuales, sin embargo se ha observado que como consecuencia una se pierde y la otra se beneficia (Martínez et al., 2012).

En este trabajo nos proponemos estudiar y caracterizar los fenómenos de IR y promoción de memorias de reconocimiento, realizando un análisis de los resultados obtenidos bajo la hipótesis del BT.

Elección del modelo. Paradigmas conductuales de memoria de reconocimiento empleados en esta tesis.

La memoria de reconocimiento se refiere a la capacidad de identificar un elemento encontrado anteriormente, así como la memoria espacial se refiere a la capacidad de recordar un lugar. El paradigma de reconocimiento de objeto (RON) implica el reconocimiento simple entre dos items. Este tipo de aprendizaje se fundamenta en una tendencia natural de los animales a explorar los objetos novedosos sin que sea necesario generar una asociación entre el objeto y otros estímulos reforzadores (Dere et al., 2007). El paradigma de RON evalúa el comportamiento espontáneo de los sujetos y genera menos estrés o arousal que otras tareas basadas en el refuerzo negativo del comportamiento, y es por esto que se lo relaciona con las condiciones normales de la formación de memorias en humanos (Ennaceur y Delacour, 1988; Dere et al., 2005). De esta manera se puede establecer un mayor paralelismo con el procesamiento de la información del día a día.

El reconocimiento y la memoria espacial son las dos formas de la memoria declarativa en los seres humanos y son dos de los ejemplos más estudiados de la memoria en roedores (Clark, 2013). En particular la memoria de reconocimiento está formada por dos componentes: la recolección y la familiaridad. La recolección involucra recordar detalles contextuales específicos sobre un episodio de aprendizaje previo. La familiaridad involucra simplemente saber que un ítem fue presentado con anterioridad sin tener información adicional sobre el episodio de aprendizaje (Clark, 2013).

Algunos autores sostienen que la memoria de reconocimiento y la memoria episódica son parte de un mismo continuo (Rugg y Yonelinas, 2003; Dunn, 2004; Squire et al., 2004). Sin embargo, otros autores argumentan que ambos tipos de memorias están relacionados solamente si a la memoria de reconocimiento subyacen procesos de recolección (Brown y Aggleton, 2001; Yonelinas, 2002; Aggleton y Brown, 2006). Independientemente de esta discrepancia, la memoria de reconocimiento contempla el recuerdo acerca de un objeto o persona en particular ("qué"), del contexto en el que la experiencia se llevó a cabo, que puede ser la arena en sí o la ubicación concreta del objeto dentro de la arena ("dónde") y del momento concreto en el que el evento ocurrió ("cuando"). Esta definición en lugar de la más antropocéntrica empleada históricamente permite el estudio de memoria episódica en modelos animales (Morici et al., 2015). Llevados al laboratorio, estas características de la memoria de reconocimiento se estudian utilizando diferentes versiones de la tarea de *delay non-matching to sample task*, que se podría traducir como no coincidencia con la muestra luego de un demora, y es la base de la tarea de Reconocimiento de Objeto Novedoso (RON) que utilizamos principalmente en el segundo capítulo de la presente tesis. La tarea de RON nos permite estudiar el componente del "qué" de la memoria de reconocimiento. Otras versiones de esta tarea son el reconocimiento de objeto en contexto (ROC) y el reconocimiento espacial de objetos (REO) que utilizamos principalmente en los capítulos 1 y 3 respectivamente y nos permiten estudiar el componente espacial o del "donde" de la memoria de reconocimiento.

¿Dónde habita la memoria de reconocimiento?

Con respecto al sustrato anatómico de la memoria de reconocimiento existe actualmente un debate. Fue propuesto que estos componentes están relacionados con diferentes regiones cerebrales (Brown y Aggleton, 2001; Winters, 2004; Warburton y Brown, 2015), siendo la “recolección” dependiente del hipocampo (Hp) y la “familiaridad” de la corteza perirrinal adyacente. Sin embargo, una perspectiva alternativa sugiere que estas estructuras trabajan de una manera cooperativa y complementaria estando ambas involucradas en estos componentes, lo que puede ser interpretado en términos de memorias débiles y memorias fuertes. (Squire et al., 2007; Clark, 2013; Cohen y Stackman, 2015).

Existen numerosas evidencias de que el Hp se encuentra involucrado en el procesamiento del REO (Clark y Martin, 2005; Dere et al., 2005; Lima et al., 2009; Clarke et al., 2010) así como también en el procesamiento de memorias de ROC (Balderas et al., 2008) sin embargo, su participación en memorias de RON es a la fecha controversial (Mumby et al. 2002; Vnek y Rothblat, 1996; Broadbent et al., 2004; Winters, 2004; Rossato et al., 2007a, 2015; Barker y Warburton, 2011; Cohen et al., 2013; Kim et al., 2014; Zalcmán et al., 2015).

Otra región notable involucrada en la memoria de un objeto en relación con la información sobre un determinado lugar o tiempo, es la corteza prefrontal medial (CPFm) (Barker et al., 2007; Banks et al., 2012). Existen varios estudios que involucran a esta región con la memoria de reconocimiento (Barbosa et al., 2013; Morici et al., 2015; Pezze et al., 2015).

Dado estos antecedentes, vamos a estudiar el rol del área CA1 del hipocampo dorsal y la CPFm en diferentes tipos de memoria de reconocimiento, prestando especial atención a su participación en los fenómenos de interferencia y promoción de estas MLT.

¿Qué nos preguntamos en este trabajo de tesis doctoral?

¿Ocurren fenómenos de interferencia (capítulos 1 y 2) y promoción (capítulo 3) durante la consolidación de las tareas de reconocimiento? ¿Bajo qué condiciones contextuales y temporales?

Referido al estudio de interferencia, investigamos si ella ocurre debido a un mecanismo de competencia entre trazas por la utilización de regiones cerebrales que se activan por dichas experiencias. Por ello estudiamos la participación del Hp y de la CPFm en la formación de MLT de ROC y RON poniendo a prueba si la inactivación transitoria de alguna de estas estructuras impide la formación de la memoria que interfiere permitiendo se forme la que era interferida.

En cuanto al fenómeno de promoción trabajamos con dos ensayos suaves idénticos consecutivos de REO (re-entrenamiento) realizando un análisis de la contribución de cada uno de ellos en la inducción de una MLT. Pensamos que la primera experiencia provoca el reclutamiento de los elementos que podrán, dentro de una ventana temporal, interactuar con el segundo ensayo para establecer así la MLT.

En conclusión, este trabajo profundizará sobre la interferencia y la promoción de MLT de reconocimiento, estudiando si los fenómenos de competencia o de

sumación de efectos (postulados en la hipótesis del BT) son mecanismos involucrados en la construcción de tales procesos mnémicos.

Materiales y métodos

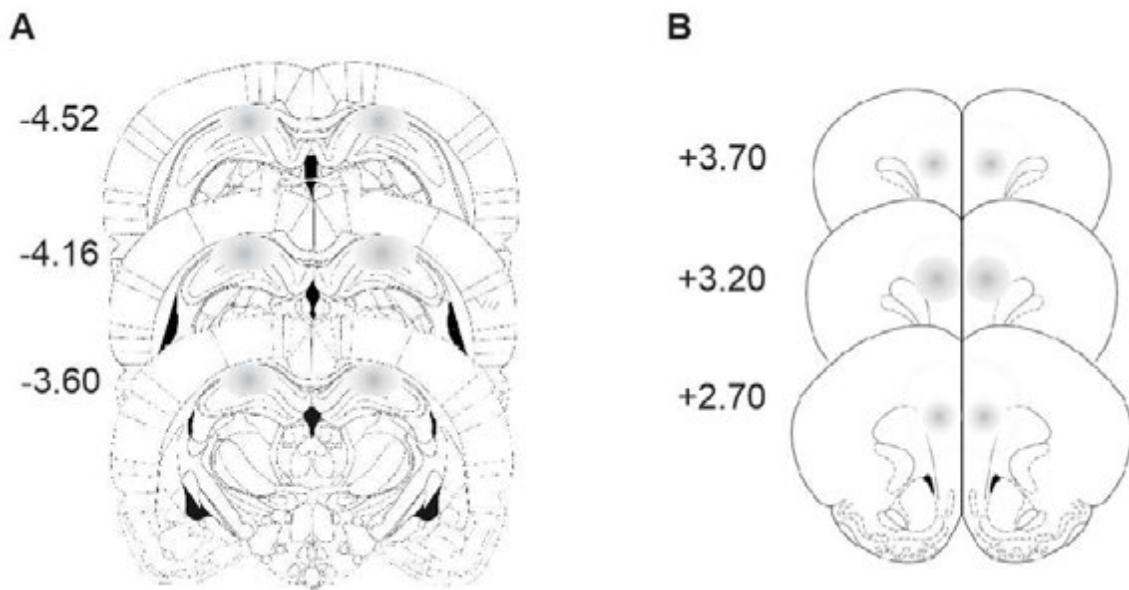
Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron Ratas Wistar macho de 220-350 g criados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron distribuidos al azar en grupos de 5-6 por jaula, con agua y comida “ad libitum” y mantenidos en el cuarto de experimentación conductual, climatizado a 21°C y con ciclo de luz oscuridad de 12 hs. (la luz se enciende a las 7:00 a.m). Dos días antes del experimento fueron manipulados durante al menos tres minutos (handling), para disminuir el estrés emocional. Para los distintos experimentos, todos los grupos experimentales se encontraban representados en cada una de las jaulas. Todos los procedimientos fueron evaluados y autorizados por el CICUAL de la Facultad de Medicina.

Cirugía e infusión de drogas

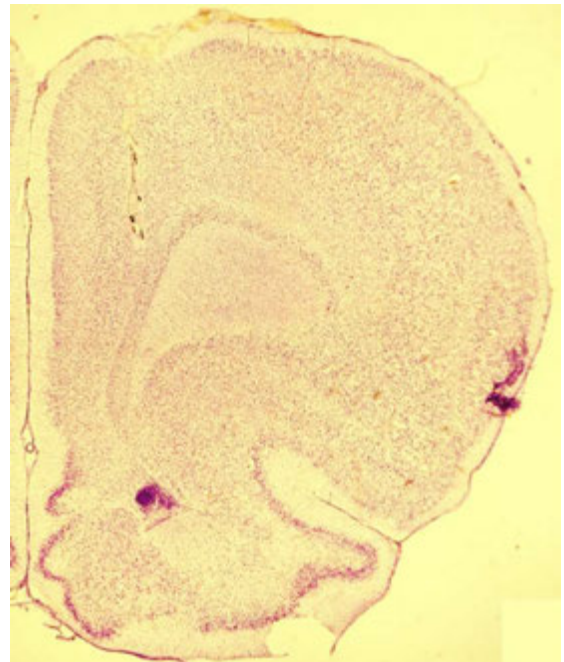
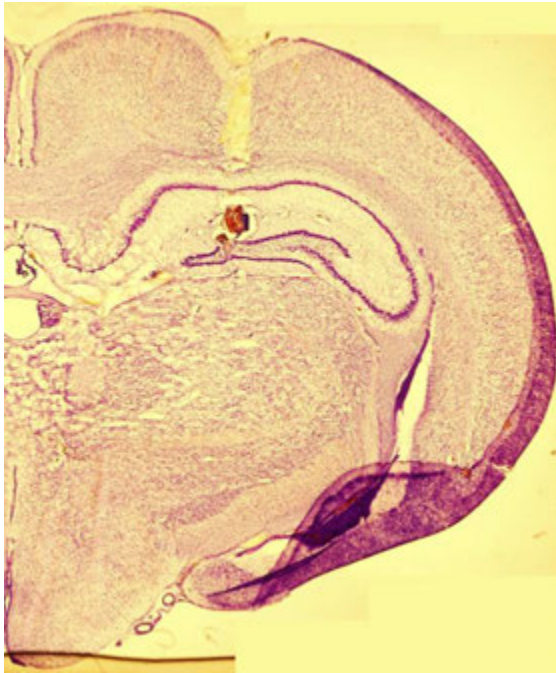
Se implantaron cánulas guía para la infusión intracraneal de drogas. Para el procedimiento quirúrgico las ratas fueron anestesiadas con una combinación de 70 mg/kg ketamina y 8 mg/kg Xylazina. Las cánulas guía de calibre 22-G fueron ubicadas utilizando las coordenadas estereotáxicas AP +3.9 mm., L \pm 3.0 mm., V 3.0 mm. para la región CA1 del hipocampo dorsal (Hp), o A+3.2 mm., L \pm 0.75 mm., V- 3.2 mm para la región dorsal de la corteza prefrontal medial (CPFm) (Paxinos y Watson, 2007, ver esquema 5) todas las coordenadas son relativas al bregma, posicionado a la misma altura que el lamda en el eje dorso ventral. Las cánulas fueron fijadas al cráneo con acrílico dental.



Esquema 5) Representación esquemática del área de infusión.

Secciones coronales de cerebro de rata en varios planos rostro caudales, tomados del Atlas de Paxinos y Watson (2007). En gris se muestra el área a la que llegó la infusión. A) CA1 del Hipocampo Dorsal -3.60, -4.16 and -4.52 del bregma. B) Región Dorsal de la Corteza prefrontal medial +2.70, +3.20, +3.70 del bregma

Todos los animales recibieron al finalizar la cirugía una aplicación subcutánea de analgésicos y antibióticos (Meloxicam 0.2mg/Kg, gentamicina 3mg/Kg). Los animales permanecieron en sus jaulas para su recuperación post-operatoria durante 4 días. Las drogas fueron administradas mediante una cánula de infusión de 30-G, cuya punta sobresalía 1.0 mm de la cánula guía. El procedimiento de infusión llevó alrededor de 1 minuto por lado, dejando la cánula de infusión durante un minuto adicional para evitar el reflujo. Una vez concluidos los experimentos se realizó un análisis histológico de la ubicación de las cánulas mediante la infusión de una solución de azul de metileno 4% en solución salina. Sólo fueron analizados los datos correspondientes a los animales cuyas cánulas estaban correctamente implantadas (95% de los animales) (Esquema 6).



Esquema 6) Ejemplo de sitios de infusión.

Los cortes fueron teñidos con violeta de Cresilo. Imagen de la izquierda, corte a la altura de la cánula en la CA1 del Hipocampo dorsal, imagen de la derecha, corte a la altura de la región dorsal de la corteza pre frontal medial donde puede observarse la marca de la cánula de infusión.

Drogas

El musicimol, agonista de los receptores GABA_A (MUS, Sigma), se inyectó en un volumen de 0,5 μl por lado en una concentración de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ diluido en solución salina. Dosis que fue reportada ser efectiva (Gonzalez et al., 2013).

La anisomicina (ANI, Sigma), sustancia inhibidora de la traducción proteica, fue disuelta primero en HCl concentrado, luego se ajustó el pH de la solución a $\cong 7.0$ con NaOH concentrado y fue llevada a su concentración de uso con solución fisiológica. Se inyectó un volumen de 0.8 μl por lado de soluciones de 80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dosis que fue reportada ser efectiva (Vianna et al., 2000b; Moncada y Viola, 2007)

Ensayos Conductuales

A lo largo de esta tesis utilizamos diferentes variaciones de protocolos experimentales que permiten evaluar diferentes aspectos de la memoria de reconocimiento (esquema 7).

a. Reconocimiento de Objeto Novedoso (RON).



a.1 RON en experimentos de interferencia utilizando el mismo CTX.



a.2 RON en experimentos de interferencia utilizando diferentes CTXs.



b. Reconocimiento de Objeto en Contexto (ROC).



c. Reconocimiento espacial de Objetos (REO).



c.1 Protocolo de re-entrenamiento de REO.



Esquema 7) Representación de los protocolos de entrenamiento y testeo de los diferentes paradigmas de reconocimiento de objetos. La fecha indica el Objeto que debería ser explorado en preferencia durante el testeo en caso de haber memoria. Los intervalos entre las sesiones de exploración son variables y se explicarán en cada caso.

Habitación:

Las sesiones de habitación se realizaron con el fin de familiarizar a las ratas con los contextos en los cuales se realizará el entrenamiento. La habitación consistió en una sesión diaria de 15min (para protocolos de RON y ROC) ó 20 min (para protocolos de REO) en los que los animales se expusieron a la arena (sin objetos) durante dos días. Salvo cuando se indique lo contrario, todos los sujetos fueron habituados por dos días consecutivos a la/s arena/s utilizadas durante el protocolo experimental.

Reconocimiento de Objeto en Contexto (ROC)

La memoria de de ROC se define como el reconocimiento de un objeto familiar en un contexto diferente del Contexto en que fue previamente encontrado (Dix y Aggleton 1999). Esta situación de incongruencia motiva a los roedores a explorar más a dicho objeto en detrimento de la exploración hacia el objeto congruente (aquel que en la sesión de entrenamiento fue explorado en el mismo contexto que en la sesión de testeo). En el esquema 7b puede observarse una representación del protocolo experimental utilizado. El entrenamiento consta de 2 ensayos de 5 minutos, cada uno en un contexto (CTX) diferente y separados entre sí por un determinado intervalo temporal (iti). En cada ensayo se introduce al animal en un CTX (al que ha sido familiarizado, ver habitación) y se le presenta un par de objetos iguales, llamados Obj1 cuando son presentados en el primer ensayo, y Obj2 cuando lo son en el segundo. Durante el ensayo, se registra el tiempo de exploración a cada uno de los objetos. Una vez finalizado el primer ensayo (en el CTX1 en presencia de los Obj1), el animal vuelve a su jaula y permanece allí hasta que es sometido a un segundo ensayo (en el CTX2 en

presencia de los Obj2), con la excepción de los animales en el grupo control que fueron expuestos a un solo ensayo y por lo tanto a sólo una de las arenas. El orden de los contextos así como los objetos definidos como Obj1 y Obj2 presentados en cada una de los ensayos fueron balanceados en los experimentos.

Uno de los CTX utilizados fue un aparato de 60cm de ancho, 34cm de profundidad y 35cm de alto, hecho de acrílico, con claves visuales en cada una de sus paredes. La pared frontal es transparente y la posterior blanca con rayas verticales negras. El otro CTX era un aparato de forma circular con un diámetro de 50cm y una altura de 34cm con un piso de madera negro. Los objetos son de plástico, vidrio, aluminio y de tamaños similares.

Para el testeo (un determinado tiempo después del entrenamiento) los animales son introducidos en uno de los contextos (CTX1 o CTX2) durante 3 minutos donde se les presenta un par de objetos conformado por un objeto congruente (el que ha sido presentado en este CTX) y un objeto incongruente (el que ha sido presentado en el otro CTX), es decir se les presenta un par de objetos formados por una copia de un Obj1 y una copia del Obj2. La memoria de reconocimiento del objeto asociado al contexto (ROC), se evidencia como una mayor exploración del objeto incongruente con respecto al congruente. Se consideró que el animal exploraba el objeto cuando lo olía o lo tocaba con las vibrisas, pero no cuando estaba cerca sin mirarlo o cuando se sentaba en él. El tiempo de exploración de cada objeto fue registrado utilizando cronómetros de mano y fue expresado como el porcentaje de preferencia, calculado de la siguiente manera: $\% \text{ Pref} = (\text{Tiempo de exploración del objeto} \times 100) / \text{Tiempo total de exploración de ambos objetos}$.

Es condición necesaria que en la sesión de entrenamiento ambos objetos sean explorados por una cantidad de segundos mínima y apropiada para hacer un análisis confiable y que estas cantidades sean similares entre sí. Ello asegura que ni el objeto ni la posición del objeto presenten preferencia *per se* para los animales. Es por ello, que si en algún caso la exploración al par de objetos en el entrenamiento era menor a 10 segundos ó difería por más de un 30% la exploración entre ambos ejemplares, que son iguales, el animal era excluido del análisis. Esto ocurrió en menos de un 5% de los animales utilizados. Para el grupo control, durante el entrenamiento la exploración media total a ambos objetos fue de 40.63 ± 2.69 . Con un % de exploración similar entre los objetos idénticos, lo cual da un % de preferencia cercano al 50%. Para simplificar la exposición de los resultados en la tesis, no se incluyó esta información en el texto, sin embargo se ha tomado como requisito para continuar con el experimento y su análisis. Para el caso de la sesión de testeo, se consideran los animales que en los 3 min exploran en total al menos 10 segundos a los objetos. Para ilustrar se reporta el tiempo de exploración total media a ambos objetos durante el testeo del grupo control 23.90 ± 3.02 seg.

RON en experimentos de interferencia utilizando diferentes contextos.

Este Protocolo fue utilizado en el capítulo 1, un diagrama del protocolo experimental se puede observar en el esquema 7 a.2.

La sesión de entrenamiento fue idéntica a la de ROC utilizando un iti de 1 hora entre ensayos, pero esta vez, durante la sesión de testeo, se presentaron un objeto completamente novedoso junto con uno de los objetos presentados en ese CTX

durante el entrenamiento. La expresión de la memoria de RON, en el momento del testeo, se determinó como una mayor exploración del objeto novedoso en comparación con la exploración del objeto que había sido previamente presentado en ese CTX durante el entrenamiento.

Para evaluar qué aspectos del segundo ensayo son requeridos para la existencia de IR en la tarea de ROC, se utilizaron las siguientes variables:

Ensayo en contexto Vacío.

Este ensayo se llevó a cabo en un CTX vacío, sin objetos, al cual los animales habían sido previamente habituados.

Ensayo de Objeto Familiar en Contexto Novedoso (Mix)

Para este ensayo los animales fueron habituados los dos días previos al entrenamiento a un par de objetos. Los animales fueron expuestos a los objetos de manera individual durante 15min cada día en una jaula similar a la utilizada para su alojamiento. Durante la sesión de entrenamiento, los sujetos exploraron estos objetos familiares en un CTX al que no habían sido habituados, CTX novedoso.

Ensayo de Objeto familiar en un Contexto Familiar (Fam).

Los animales que formaron parte de este ensayo fueron expuestos a un par de objetos dentro de uno de los contextos mientras eran habituados al mismo. De manera

tal que al momento del entrenamiento durante la sesión correspondiente los animales estaban ya familiarizados con ambos.

Exploración del Campo Abierto (CA)

El campo abierto cuadrado consiste en una caja de madera, de dimensiones 50 cm x 50 cm x 39 cm con paredes negras y piso dividido en 9 cuadrantes iguales (ver Foto 1). La exploración consiste en una sesión de 5 minutos. Se midió la actividad exploratoria como el número de cruces entre cuadrantes (cruces) o exploraciones aéreas (elevaciones) registrados minuto a minuto. El porcentaje de habituación para cada sujeto experimental fue calculado con la siguiente fórmula $[(Tr - Ts)/Tr] \times 100$, donde "Tr" es el número total de eventos (cruces o elevaciones) registrados durante el entrenamiento y "Ts", el número total de eventos durante la sesión de testeo. Un porcentaje de habituación mayor (una mayor caída de la actividad exploratoria) representa una memoria más robusta para esta actividad.



Foto 1) Vista cenital de un animal durante el entrenamiento en el CA. Se pueden observar los cuadrantes en el suelo de la caja que se emplean para el conteo del número de cruces.

Reconocimiento de Objeto Novedoso (RON):

La tarea de RON consiste en una sesión de entrenamiento en la cual un par de objetos son presentados en un CTX familiar, y un determinado tiempo después, en una instancia de testeo, en este mismo CTX los animales exploran un objeto previamente presentado y uno completamente novedoso (Esquema 7.a). En este paradigma, la preferencia espontánea de las ratas por la novedad es utilizada para realizar un índice de la memoria (Clark y Martin 2005). Como las ratas presentan una preferencia innata por los objetos novedosos, la tarea de RON no requiere reglas de aprendizaje explícitas. El porcentaje del tiempo explorando el objeto novedoso sirve como medida de la memoria de reconocimiento del objeto familiar.

Para estudiar si la memoria de RON es susceptible de IR, realizamos el protocolo experimental que se ilustra en el esquema 7.a, en el mismo las ratas fueron expuestas a dos ensayos de RON durante el entrenamiento, ambos en el mismo CTX. El CTX fue

un aparato rectangular de 60cm de ancho, 34cm de profundidad y 35cm de alto, hecho de acrílico blanco, con claves visuales en cada una de sus paredes, la pared frontal transparente y la posterior blanca con rayas verticales negras, al que los animales fueron previamente habituados (ver esquema 8). Durante el primer ensayo de entrenamiento los animales fueron introducidos durante 5 min en el CTX en presencia de un par de objetos idénticos (Obj1). El tiempo de exploración de cada objeto fue medido utilizando un cronometro manual. La media de exploración total durante este primer ensayo en el grupo control fue 68.71 ± 4.29 seg, con un % de preferencia a cada objeto (idénticos) que no difería del 50%. Un determinado intervalo temporal después (iti, 1h, 3hs, 4hs o 7hs) del primer ensayo, los animales fueron reintroducidos en el CTX en presencia de un nuevo par de objetos idénticos entre sí (Obj2). La actividad exploratoria de los objetos fue medida de igual forma que en el primer ensayo. Los objetos definidos como Obj1 y Obj2 fueron balanceados en cada experimento.

Veinticuatro horas luego del entrenamiento (para los experimentos de MLT), y tres horas y media después del entrenamiento (para los experimentos de MCT) la mitad de los animales fueron testeados al reintroducirlos en el CTX durante 3 min en presencia de una copia del Obj1 y de un objeto novedoso, y la otra mitad en presencia de una copia del Obj2 y de un objeto novedoso. Durante la sesión de testeo, la expresión de memoria se determinó como una mayor exploración por el objeto novedoso en detrimento de la exploración del objeto presentado durante el entrenamiento. La exploración promedio en los 3 minutos del testeo para los animales que tuvieron sólo una sesión de entrenamiento fue de 37.84 ± 2.14 seg. Aquellos animales que durante la sesión de testeo tuvieron una exploración menor a los 10 seg.

fueron excluidos del análisis. El criterio de exploración fue el mismo que el utilizado para el protocolo de ROC.

De igual manera que en los protocolos anteriores, el tiempo de exploración para cada objeto fue registrado y expresado como porcentaje con respecto al tiempo total de exploración (% de preferencia)

a)

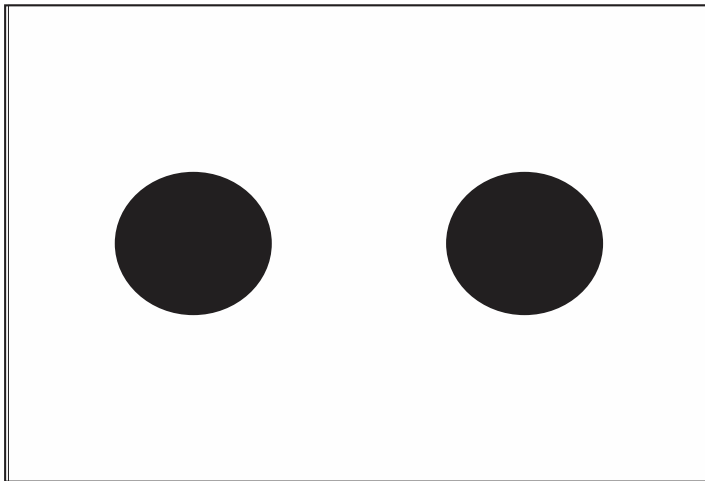


Esquema 8)

a) Vista superior del contexto utilizado y un par de Objetos.

b) Esquematización de la foto a).

b)



Expresión de la memoria de RON

Para estudiar si la expresión de la memoria de RON podía ser afectada por un ensayo presentado cerca del momento del testeo, se entrenó a los animales con un

solo ensayo y 30 min antes del testeo se realizó el segundo ensayo, la sesión de testeo se realizó 90min (para evaluar MCT) o 24hs (para evaluar MLT) del primer ensayo de entrenamiento.

Para evaluar qué aspectos del segundo ensayo son requeridos para la existencia de IR en la tarea de RON, se utilizaron las siguientes variables:

Contexto diferente:

Cuando el segundo ensayo en el protocolo de IR de RON fue llevado a cabo en un CTX diferente, la arena utilizada fue el aparato circular descrito para el protocolo de ROC. Al cual los animales pudieron ser habituados previamente al entrenamiento, cuando se trató de un CTX diferente familiar, o no, para el caso de CTX diferente novedoso.

Contexto Vacío:

Para este ensayo los sujetos fueron introducidos en la arena sin objetos dentro, pudiendo haber sido o no previamente habituados a esta según se indique. El CTX en cuestión pudo ser el mismo que el del primer ensayo (en este caso siempre fue familiar) o uno distinto, en cuyo caso se trató del CTX circular o del CA mencionados anteriormente.

Objeto Familiar:

Cuando fue necesaria una previa familiarización con los objetos, los animales fueron puestos individualmente en jaulas como las de hospedaje por 15 min en presencia del par de objetos con los que debían familiarizarse. Este procedimiento se realizó una vez cada día, durante los dos días previos al entrenamiento.

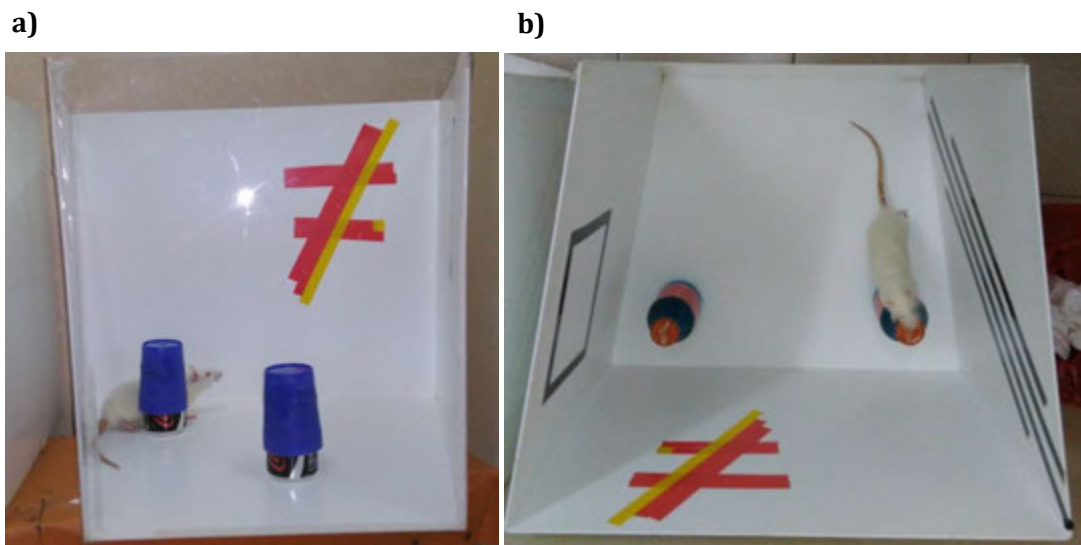
Reconocimiento espacial de objetos (REO).

En esta tarea se evalúa la habilidad de detectar el desplazamiento de un objeto familiar a una ubicación novedosa dentro de un CTX.

La arena utilizada para este protocolo fue un CTX trapezoide de 50cm de alto, paredes laterales de 49,5 cm blancas con claves visuales, una pared frontal de 41cm transparente, y una pared posterior de 60cm también blanca con claves visuales (ver esquema 9). Es importante recordar que para este protocolo los animales fueron habituados a este CTX vacío los dos días previos al entrenamiento durante 20min cada vez.

Durante el entrenamiento, los animales se introdujeron en la arena por 4 min en presencia de 2 objetos idénticos, los tiempos de exploración de cada uno fueron registrados con cronómetros manuales como en los casos anteriores. Se establecieron dentro de la arena 3 posibles posiciones equidistantes entre sí en las cuales podían encontrarse los objetos, las 2 posiciones utilizadas fueron asignadas de forma aleatoria y balanceada dentro de cada experimento. Veinticuatro horas más tarde del entrenamiento para los experimentos MLT o 30 min para los experimentos de MCT se testeó la expresión de la memoria de REO. Durante la sesión de testeó, se

reintrodujeron los animales en el CTX y se les permitió explorar durante 2 min, en presencia de los mismos dos objetos vistos durante el entrenamiento, sólo que esta vez uno de ellos se encontraba en una posición diferente, y por lo tanto novedosa (para una representación de este protocolo ver el esquema 7c). La memoria de REO se determinó como una mayor exploración del objeto en la posición novedosa con respecto al que se encontraba en la posición familiar. Como en los casos anteriores se registró el tiempo de exploración para cada objeto y fue expresado como porcentaje del tiempo total de exploración y se tomó nuevamente como requisito para ser considerado en el análisis que la exploración total superara los 10seg.



Esquema 9) Fotos del contexto trapezoide a) Vista frontal. B) Vista superior.

Re-entrenamiento de REO:

Este protocolo es similar al de REO mencionado en el ítem anterior sólo que en este caso durante el entrenamiento se realizan dos ensayos idénticos de exposición a los objetos en el CTX (ver esquema 7 c.1), es decir, se introdujo durante 4 min. a los

animales en un primer ensayo de exploración en presencia de dos objetos idénticos en una determinada posición. Luego de esto, los animales fueron regresados a sus jaulas de alojamiento y un determinado tiempo después (30min, 1, 4 ó 7 horas) se los sometió a un segundo ensayo de entrenamiento en la cual se les permitió explorar nuevamente durante 4 minutos los mismos objetos en las mismas posiciones. La excepción fue el grupo control que sólo experimentó un ensayo durante el entrenamiento. El tiempo de exploración total promedio para ambos objetos en el grupo control durante el entrenamiento fue de $60,21 \pm 3,97$ seg. El testeo se realizó de igual manera a la descrita en el caso anterior, al reintroducirllos un día después del entrenamiento en el mismo CTX durante 2 min en presencia de los mismos objetos, solo que esta vez mientras que uno se encontraba en la misma posición que durante el entrenamiento (posición familiar) el otro se encontraba en una posición diferente (posición novedosa). A modo de ejemplo, el tiempo promedio de exploración total durante el testeo para animales en el grupo control fue de $27,11 \pm 2,015$ seg.

Como ya se mencionó, se determina que los animales expresan memoria de REO cuando pasan más tiempo explorando el objeto en la posición novedosa con respecto al objeto en la posición familiar. Como en los casos anteriores se registró el tiempo de exploración para cada objeto y se la expresó como porcentaje del tiempo total de exploración.

Plataforma elevada

El evento estresante fue realizado colocando durante 30 min a las ratas en una plataforma elevada de acrílico blanco de 20 cm por 20cm y 80 cm de alto, donde además eran iluminadas con luz brillante (ver esquema 10)



Esquema 10)

Foto de la plataforma elevada.

Análisis de los datos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un test de Student (no pareado o pareado, según corresponda), utilizando el software GraphPad 5 (GraphPad Software Inc).

Resultados

Resultados – Capítulo I:

La memoria de largo término de reconocimiento de objeto en contexto (ROC) es susceptible de ser retroactivamente interferida.

La memoria de reconocimiento hace referencia a la habilidad de identificar un objeto o situación y juzga si fue previamente experimentado o no (Warburton y Brown, 2010). Este tipo de memoria es de vital importancia para la vida de los individuos ya que nos permite juzgar si un elemento individual es novedoso o familiar y/o si un elemento se ha asociado previamente con otro elemento, o con un lugar o contexto particular. En particular la memoria ROC, la utilizamos por ejemplo para poder reconocer nuevos arreglos del mobiliario en una habitación conocida. El reconocimiento de un ítem en un contexto (qué-dónde) constituye un elemento importante de la memoria episódica, que también implica recordar acerca del qué-cuándo (Clark y Martin, 2005). Las memorias episódicas son evocadas rutinariamente cuando tenemos acceso a eventos u ocasiones incluyendo localizaciones espaciales y las características del contexto entorno en el que el evento tuvo lugar.

Como ocurre con otros tipos de memoria, la formación de la memoria de reconocimiento implica diferentes etapas (adquisición, consolidación, evocación entre ellas) y los impedimentos que suceden en cualquiera de éstas pueden dar lugar a la falta de memoria. La interferencia retroactiva (IR) es un tipo de amnesia que ha sido ampliamente estudiada durante más de un siglo y se caracteriza por el efecto perturbador de una nueva experiencia de aprendizaje sobre un material previamente codificado (Wixted, 2004). En este capítulo, mostramos que la adquisición o la evocación de una asociación de un par de objetos en un contexto determinado puede

poner en riesgo la formación de la memoria a largo término (MLT) de una asociación aprendida previamente entre un objeto diferente con otro contexto. También investigamos la ventana temporal efectiva en la que una segunda experiencia puede inducir interferencia sobre una anterior, las características requeridas de la experiencia para ser perjudicial, así como las regiones del cerebro implicadas en este fenómeno.

Más aún, dada la participación de hipocampo (Hp) y la corteza prefrontal medial (CPFm) en varias memorias de reconocimiento, evaluamos la participación de estas estructuras en la formación de MLT de ROC mediante la infusión local de muscimol.

Para llevar a cabo estos objetivos, estudiamos los efectos de la interacción entre dos experiencias conductuales sobre la formación de una MLT. En particular, en esta primera parte estudiamos si la memoria de ROC puede ser interferida luego de su adquisición. Entendemos por memoria ROC a la capacidad de reconocer dónde (es decir, en qué contexto) un objeto fue presentado. Para ello, entrenamos ratas para que aprendan a asociar objetos (Obj) en contextos (CTX). Utilizamos un protocolo experimental que consistió de dos ensayos con objetos novedosos en dos contextos familiares diferentes (CTX1 y CTX2). Se expone a las ratas al CTX1 con dos objetos idénticos (Obj1) y a la hora los animales exploran el CTX2 que contiene otro par de objetos idénticos entre sí, pero diferentes a los anteriores (Obj2). La memoria de ROC fue evaluada para cada caso en un testeo realizado 24hs luego del entrenamiento, usando grupos independientes de animales entrenados de igual manera. Durante la sesión de testeo, se les presentó a los animales dos objetos dentro

de uno de los dos CTXs, el par estaba compuesto por un Obj que había sido explorado en ese mismo CTX durante la sesión de entrenamiento (objeto congruente) y otro que había sido explorado en el otro CTX (objeto incongruente). En la figura 1a se observa que el grupo control que fue solo entrenado en el CTX1 con un par de objetos asociados (sin un segundo ensayo) muestra preferencia exploratoria por el Obj que nunca fue presentado antes en ese CTX, es decir es capaz de discernir entre el Obj familiar y el novedoso y por lo tanto expresar MLT de la información adquirida en la sesión de entrenamiento (Grupo Control $t_{(7)}=3.54$, $p=0.009$). Sin embargo, cuando los animales reciben un segundo ensayo una hora luego del primero presentan dificultades para formar la MLT del Obj1 en el CTX1 y lo que se observa es que ambos objetos son explorados por igual. (Figura 1a, Grupo Exp $t_{(13)}=0.19$, $p=0.855$). En otras palabras, cuando sendos objetos fueron testeados en el CTX1, los tiempos de exploración fueron similares (Obj1: $12.0s \pm 1.7$ vs. Obj2 $12.1s \pm 2.1$; $t_{(13)}=0.052$, $p=0.959$) con independencia de si el objeto fue o no asociado a ese CTX durante el entrenamiento. Esto está señalando que existe Interferencia Retroactiva (IR) sobre la MLT del Obj1 en el CTX1, es decir sobre la MLT de ROC del primer ensayo. Interesante es destacar que el grupo de ratas, que de forma paralela fue testado en el CTX2, mostró una MLT del Obj2 en el CTX2 inalterada por el ensayo previo en el CTX1, dado que al momento del testeo los animales pasaron más tiempo explorando el objeto incongruente (Figura 1b Grupo Control $t_{(7)}=4.42$, $p=0.003$, Grupo Exp $t_{(12)}=3.29$, $p=0.006$). Es decir, en este caso, los sujetos exploraron preferencialmente el Obj1 (Obj1: $11.2s \pm 1.3$ vs. Obj2 $8.1s \pm 0.8$; $t_{(12)}= 3.079$, $p=0.0096$).

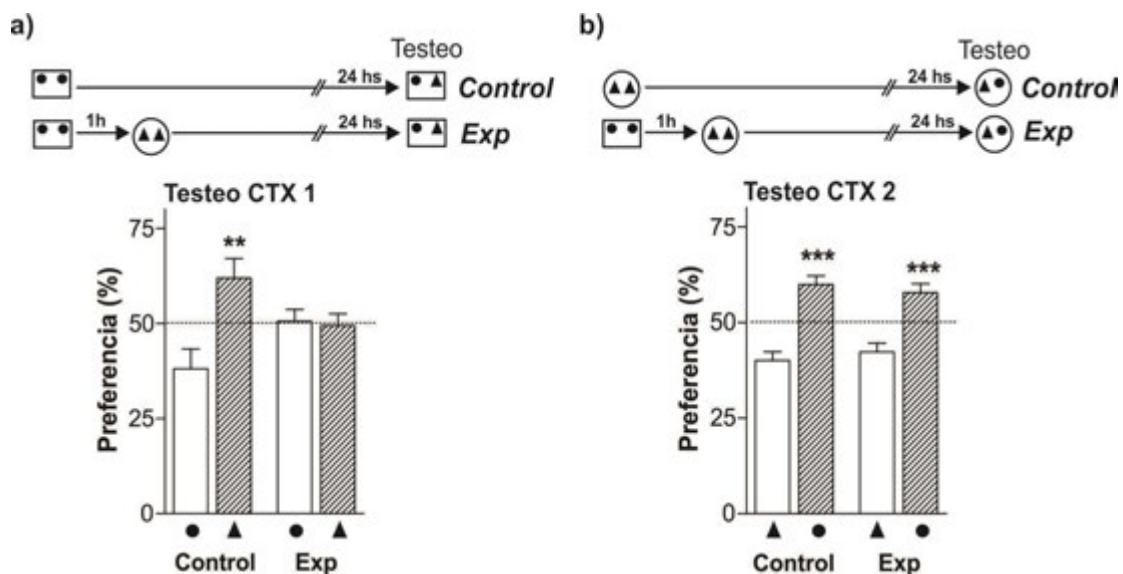


Figura 1) El segundo ensayo de Objeto en Contexto interfiere con la formación de la MLT del primero, cuando el intervalo entre ambos es de 1 hora.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al objeto incongruente y las lisas al objeto congruente. Grupos independientes de animales fueron entrenados con un solo ensayo en uno de los dos CTXs, grupo control, y 24hs más tarde testeados en la misma arena. Los grupos Experimentales (Exp) tuvieron dos ensayos durante el entrenamiento separadas por 1 hora, y la MLT del ROC fue evaluada 24hs más tarde en sólo una de las 2 arenas. En a) se observan los resultados para los animales testados en el CTX1 y en el b) para los animales testados en el CTX2. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. el objeto congruente, Test de T pareado.

Tomados como un todo, estos resultados muestran que cuando dos ensayos diferentes se suceden con un intervalo de una hora, el segundo interfiere con la MLT del Obj1 en el CTX1, pero la MLT del Obj2 en el CTX2 permanece intacta.

A continuación quisimos estudiar si esta IR que observamos a las 24hs del entrenamiento se debía a daños en la adquisición o lo consolidación de la traza. Por esta razón, decidimos evaluar la MCT del Obj1 en Ctx1, es decir la MLT de ROC del primer ensayo.

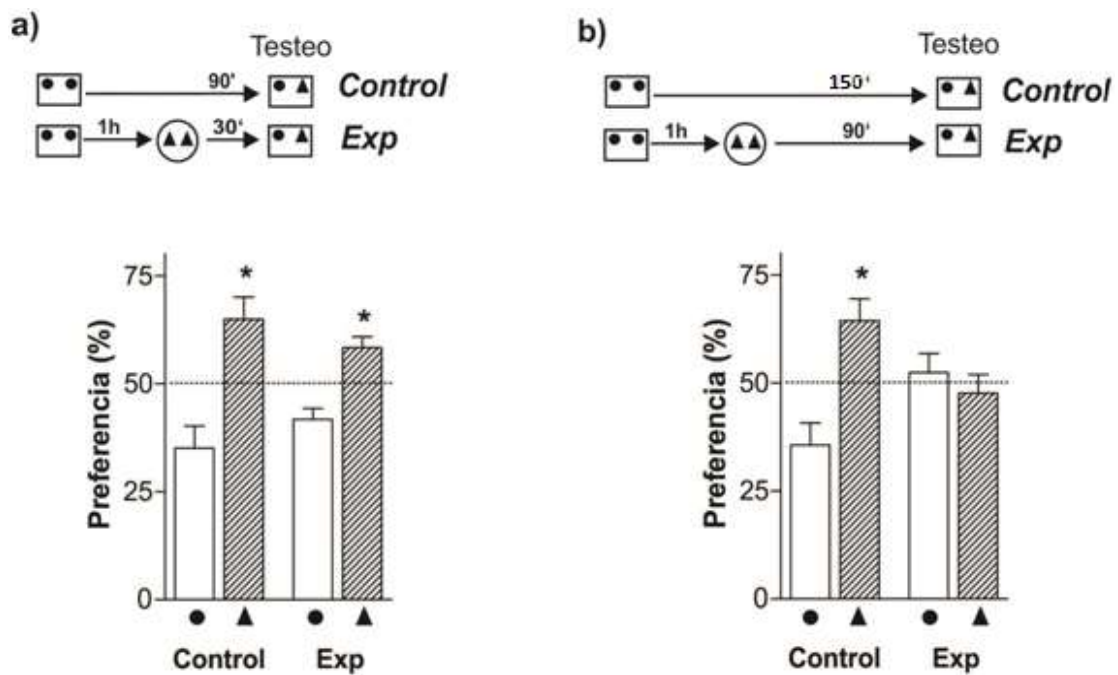


Figura 2) La MCT de ROC del primer ensayo no se ve interferida por el segundo ensayo.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al objeto incongruente y las lisas al objeto congruente. Grupos independientes de animales fueron entrenados con sólo un ensayo, grupo control, o con dos ensayos separados por 1 hora, y la MCT del ROC del primer ensayo fue evaluada o bien, a) a los 90 min del primer ensayo ó b) a los 150 min. * $p < 0.05$ vs. el objeto congruente, Test de T pareado.

En la Figura 2a se muestra que la MCT de ROC del primer ensayo puede ser observada a los 90min, cuando los animales fueron entrenados con un ensayo único,

así como también cuando fueron entrenados con el protocolo de 2 ensayos (Grupo Control $t_{(5)}=2.91$, $p=0.033$; Grupo Exp $t_{(5)}=3.23$, $p=0.023$). En contraste cuando la sesión de testeo es realizada a los 150 min de primer ensayo, la memoria es sólo visible en aquellos animales que no tuvieron un segundo ensayo, no pudiendo observarse en aquellos animales sometidos al protocolo de dos ensayos (Grupo Control $t_{(8)}=2.82$, $p=0.022$; Grupo Exp $t_{(7)}=0.56$, $p=0.595$). Estos resultados sugieren que la información sobre el Obj1 en el CTX1 puede ser efectivamente adquirida y expresada como MCT a los 90 min. pero que es su estabilización la que se ve impedida (ya sea cuando se testea a 150 min o a las 24hs del entrenamiento) si otro aprendizaje tiene lugar en una ventana temporal cercana.

Para permitir que la traza se estabilice, separamos los ensayos por un intervalo temporal más prolongado, con el objetivo de permitir una completa consolidación de la MLT del Obj1 en el CTX1 antes de que tome lugar el procesamiento del segundo ensayo. En la figura 3a se puede observar que existe IR cuando el intervalo temporal entre ensayos fue de 1 hora, pero no cuando se extendió a 4 horas (Grupo Exp. 1h, $t_{(9)}=0.55$; $p=0.593$, Grupo Exp. 4 hs, $t_{(10)}=4.73$, $p<0.001$), Así mismo en la figura 3b podemos ver que la MLT del Obj2 en CTX2 siempre está presente con independencia del intervalo entre ensayos utilizado (Grupo 1 h $t_{(6)}=4.53$, $p=0.004$; Grupo 4 h $t_{(8)}=3.08$, $p=0.015$).

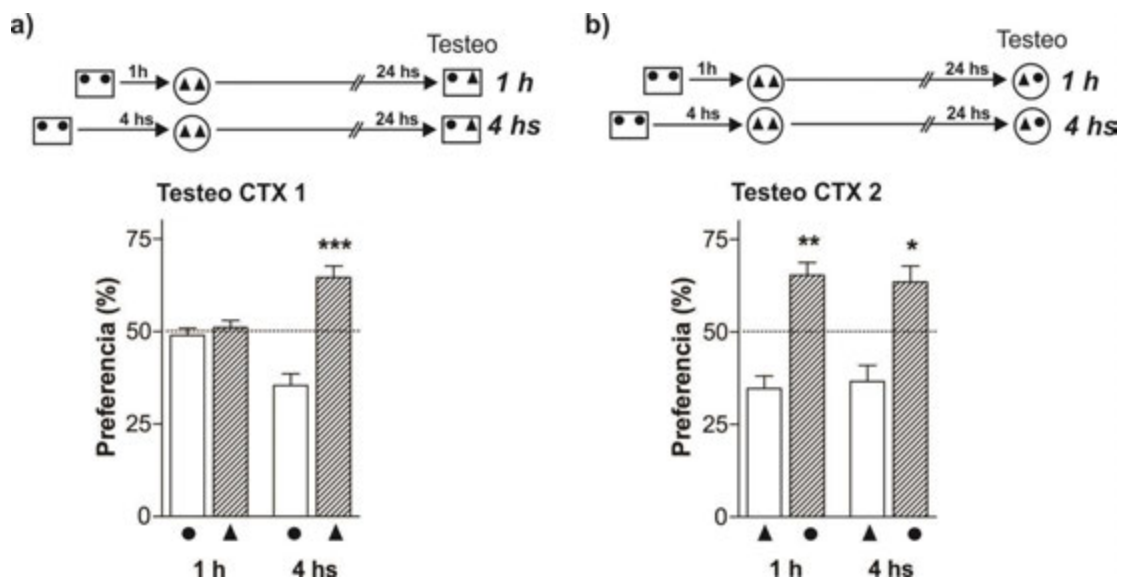


Figura 3) Cuando ambos ensayos son separados por un intervalo de 4hs no se observa la IR.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al objeto incongruente y las lisas al objeto congruente. Grupos independientes de animales fueron entrenados con dos ensayos separados entre sí 1 hora, Grupo Exp 1h, o 4hs, Grupo Exp 4hs. La MLT del ROC fue evaluada 24hs más tarde en sólo una de las 2 arenas. En a) se observan los resultados para los animales testados en el CTX1 y en el b) para los animales testados en el CTX2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. el objeto congruente, Test de T pareado.

Por lo tanto, la MLT para ambos objetos en sus respectivos contextos puede consolidarse cuando los ensayos de adquisición están separados entre sí por un intervalo de 4hs.

A continuación, indagamos sobre el origen de esta interferencia: ¿Cuáles son las características claves de la misma? ¿Cuáles son las condiciones que debe presentar el segundo ensayo para interferir retroactivamente la formación de la MLT del primer Obj en CTX? Con el fin de dilucidar esta cuestión decidimos variar las condiciones del segundo durante el entrenamiento. Es importante recordar que el protocolo experimental utilizado hasta el momento siempre incluyó una sesión de habituación a

los contextos vacíos durante los dos días previos al entrenamiento. Para esta parte, entrenamos a los animales en el CTX1 asociado a los Obj1 y una hora más tarde les presentamos el segundo CTX (CTX2) al que pudieron ser previamente habituadas (Contexto Familiar, Fam), o no (Contexto Novedoso, Nov) con objetos asociados, pudiendo ser estos familiares (Fam) o novedosos (Nov). Los 4 grupos posibles, de acuerdo a estas características del segundo ensayo, se resumen en la tabla que se encuentra en la figura 4b. Todos los grupos formados por las combinaciones posibles para el segundo ensayo inducen IR (Figura 4a, grupo Control $t_{(5)}=2.86$, $p=0.036$; Grupo Exp $t_{(5)}=0.44$ $p=0.676$; Grupo Hab $t_{(6)}=0.66$, $p=0.533$; Grupo Nuevo $t_{(7)}=2.15$, $p=0.075$; Grupo Mix $t_{(8)}=1.13$, $p=0.290$).

Entonces, tanto la adquisición de nueva información en el segundo ensayo, cuando éste es novedoso, como la posible evocación de la memoria cuando éste contiene una situación familiar perjudican la consolidación de la MLT del Obj1 en el CTX1 adquirida una hora antes.

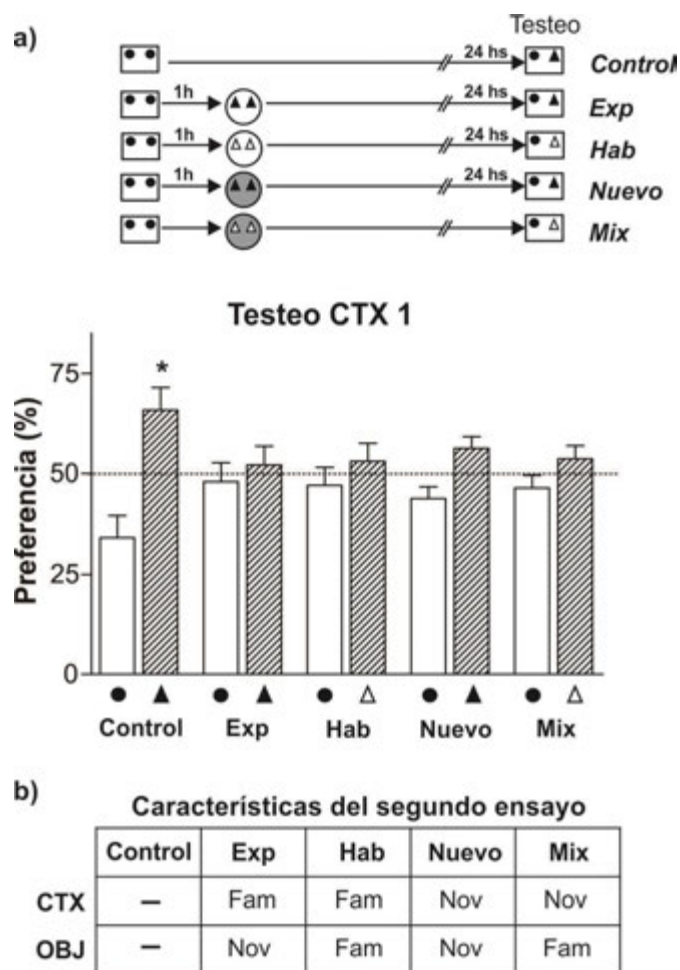


Figura 4) La IR sobre la formación de MLT de ROC depende de diversas características del segundo ensayo.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. a) Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al objeto incongruente y las lisas al objeto congruente. Grupos independientes de animales fueron entrenados con un solo ensayo, Grupo Control, o con dos ensayos separados entre sí 1 hora, cuyo segundo ensayo cumple con los atributos enunciados en la Tabla expuesta en b). Para todos los grupos la MLT del primer ensayo fue testeada a las 24hs del entrenamiento $*p < 0.05$ vs. el objeto congruente, Test de T pareado.

A continuación nos preguntamos si es específicamente la memoria del Obj1 en el CTX1 la que ve se interferida o también se interfiere la memoria del Obj1 como un

ítem independiente del CTX. Con el fin de contestar esta pregunta, estudiamos si es que la MLT del par de objetos presentados en el primer ensayo se establece luego de que ocurre un segundo ensayo una hora más tarde. Para esto realizamos, entre otras cosas, un entrenamiento idéntico al presentado en la figura 1, pero esta vez durante la sesión de testeo en el CTX1 les presentamos a los animales uno de los objetos que había sido asociado a ese contexto y otro completamente novedoso, es decir esta vez, la evaluación de la MLT se determinó por la capacidad de los animales de diferenciar entre objetos familiares versus objetos novedosos. Es decir, estamos ahora analizando una tarea de reconocimiento de objeto novedoso (RON). En todos los casos los animales fueron entrenados con un primer ensayo en un contexto familiar con objetos novedosos (CTX1 con Obj1), las características de los segundos ensayos utilizados se resumen en la tabla de la figura 5b.

Como puede observarse en la Figura 5a tanto el Grupo Control, que tuvo sólo una ensayo durante el entrenamiento, como el Grupo Experimental (Exp) al que se le presentó una hora más tarde en un CTX2 familiar con objetos novedosos, como el grupo Mixto (Mix) con la situación inversa, CTX2 novedoso y objetos familiares muestran MLT de RON, dado que en los 3 casos mostraron preferencia por el objeto novedoso, es decir al momento del testeo los animales pasaron más tiempo explorándolo (Grupo Control $t_{(11)}=5.96$, $P<0.001$, Grupo Exp $t_{(8)}=6.95$, $P<0.001$; Grupo Mix $t_{(9)}=6.46$, $P<0.001$). Este resultado demuestra que la IR actúa específicamente sobre la MLT de ROC, dejando intacta la MLT de RON, es decir, es la información de la asociación entre el objeto y contexto la que está siendo interferida, no la de la identidad *per se* del objeto.

Dado que en este punto del trabajo estábamos evaluando la memoria de RON, nos pareció que era importante determinar si la misma podía ser afectada por la exposición a un Campo Abierto (CA). Con este objetivo, entrenamos animales a un ensayo en el CTX1 con Obj1 y una hora más tarde los expusimos durante 5 min a un CTX2 vacío, novedoso (Grupo CA) o familiar (Grupo Vacío). En la figura 5 se puede observar que la MLT de RON no se vio perjudicada por la exploración al CA o al contexto vacío (Grupo CA $t_{(6)}=4.87$, $P=0.003$; Grupo Vacío $t_{(6)}=4.14$, $P=0.006$).

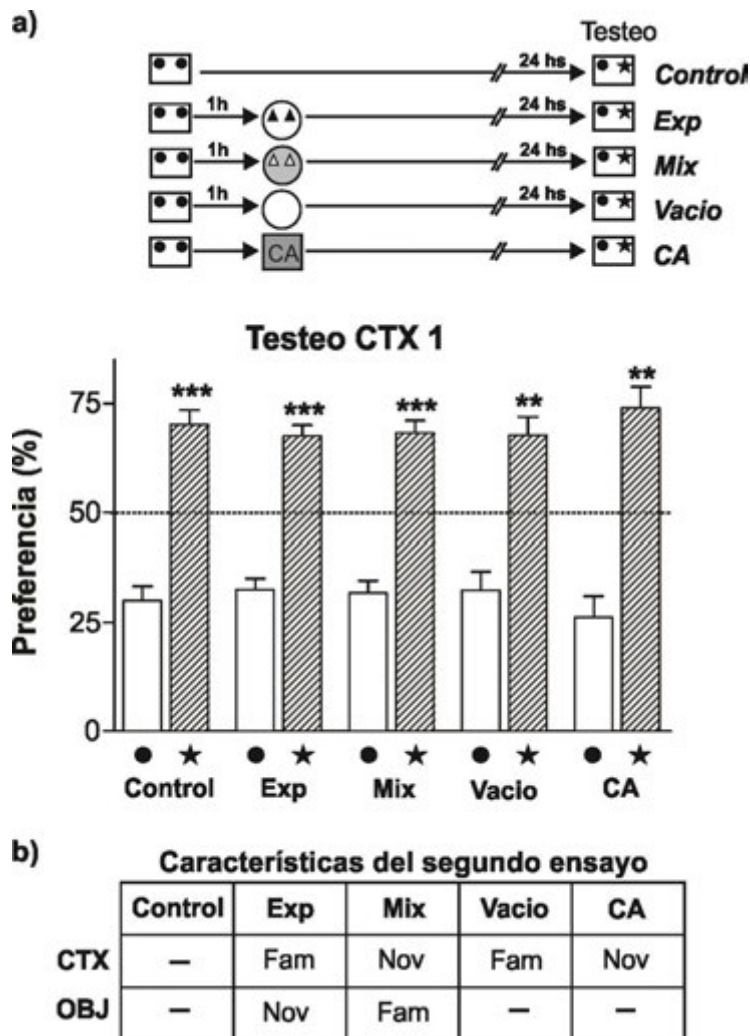


Figura 5) La IR actúa específicamente en la MLT de ROC, permaneciendo intacta la MLT de RON del primer ensayo.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. a) Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj novedoso y las lisas al Obj familiar. Grupos independientes de animales fueron entrenados con un solo ensayo, Grupo Control, o con dos ensayos separados entre sí 1 hora, cuya segundo ensayo cumple con los atributos enunciados en la Tabla expuesta en b). Para todos los grupos la MLT de los objetos presentados en el primer ensayo fue testada a las 24hs del entrenamiento, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. el Obj Familiar, Test de T pareado.

Con el fin de descartar que el primer ensayo de la sesión de entrenamiento estuviese induciendo interferencia anterógrada sobre la segunda traza, testeamos la MLT del CA. Como puede verse en a figura 6, al evaluar los parámetros de habituación al CA (en número de cruces y de elevaciones), se puede observar que la MLT del CA se conserva intacta, ya que no se observan diferencias entre el Grupo Experimental y su respectivo Grupo Control (Cruces $t_{(10)}=0.065$ $P=0.949$; Elevaciones $t_{(10)}=0.460$, $P=0.655$). Es decir que en ambos grupos los animales exploran el CA en menor proporción en el testeo que en la primera sesión. Lo que demuestra que existe MLT de habituación al contexto.

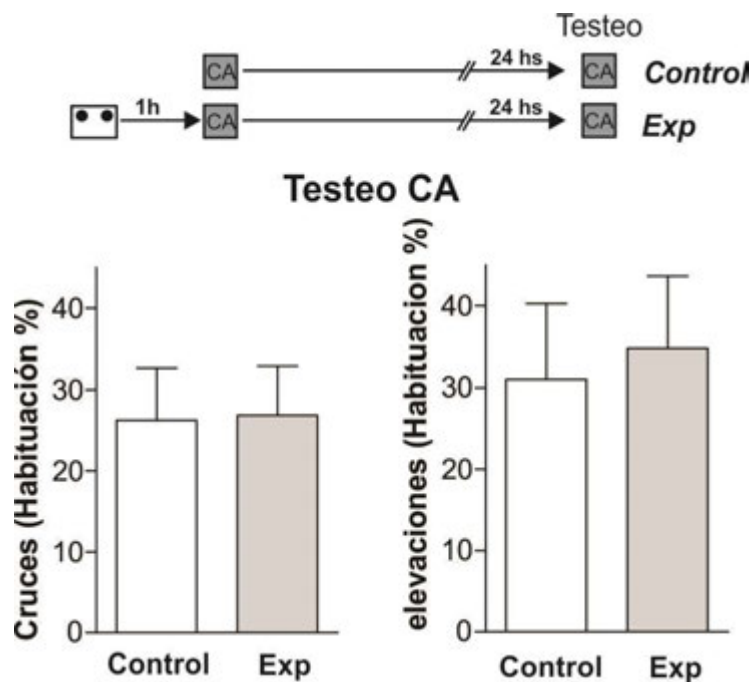


Figura 6) La MLT del CA no se ve afectada por la presencia previa de un ensayo de objeto en contexto.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Evaluación de la actividad exploratoria en el CA. Los animales del Grupo Exp tuvieron un sólo ensayo de reconocimiento de Objetos y una hora después el CA. Se muestra la media (\pm SEM) del porcentaje de habituación de los dos parámetros de actividad exploratoria registrados durante el test, relativos a la sesión de entrenamiento. $p>0.05$ Test de t no pareado

Del mismo modo, decidimos testear la MLT para el RON del segundo ensayo, para los protocolos correspondientes expuestos en la figura 5. Como podemos observar en la Figura 7 todos los grupos presentan MLT para el Obj explorado en el CTX2 durante el entrenamiento (Grupo Control $t_{(6)}=3.94$, $P=0.007$; Grupo Exp $t_{(8)}=3.77$, $P=0.005$; Grupo Mix $t_{(9)}=4.65$, $P=0.001$).

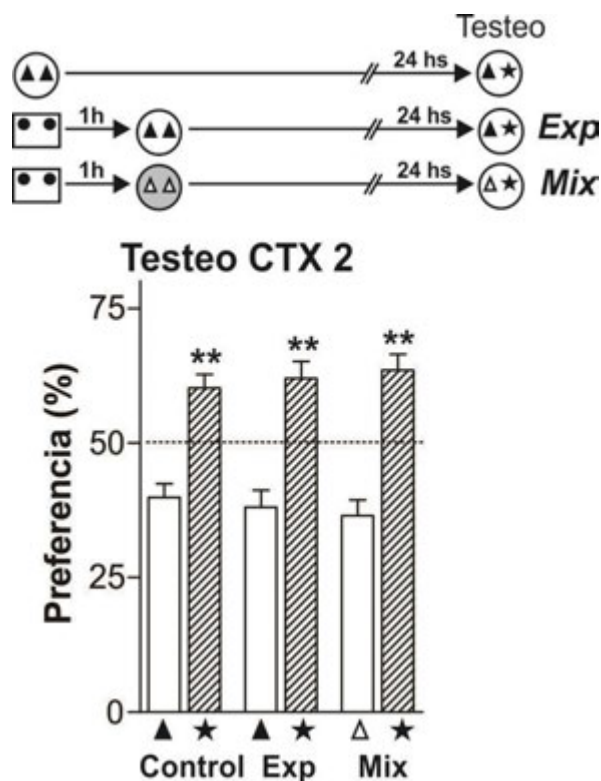


Figura 7) No existe interferencia anterógrada sobre la MLT de RON presentados en el segundo ensayo.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. a) Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj novedoso y las lisas al Obj familiar. Grupos independientes de animales fueron entrenados con un solo ensayo, Grupo Control, o con dos ensayos separados entre sí 1 hora, cuyo segundo ensayo consistió en una exploración a un CTX familiar con objetos novedosos, Grupo Exp, ó una exposición a un CTX novedoso con Objetos familiares dentro, Grupo Mix. La MLT de los objetos presentados en el segundo ensayo fue evaluada a las 24hs del entrenamiento. ** $p < 0.01$ vs. el Obj Familiar, Test de T pareado.

A continuación nos interesó estudiar posibles estructuras cerebrales involucradas en el procesamiento de la MLT de ROC, decidimos evaluar la participación del hipocampo (Hp, particularmente region CA1 dorsal) y la participación de la corteza prefrontal medial dorsal (CPFm), dado que ambas estructuras han sido numerosas veces asociadas con paradigmas de reconocimientos. Para este fin, canulamos animales en el Hp ó en la CPFm, y una vez recuperados de la cirugía, los expusimos al protocolo de IR de la figura 1, sólo que esta vez, decidimos efectuar una inhibición reversible sobre estas áreas de interés. Para ello infundimos en las mimas muscimol (Mus), un reconocido agonista de los receptores GABA_A 15 min antes del segundo ensayo.

Interesantemente, el tratamiento con muscimol en la CA1 del Hp dorsal genera una falta de la MLT del ROC del segundo ensayo, lo que puede observarse por la ausencia de MLT cuando los animales son testeados en el CTX2 (figura 8b, Grupo Veh $t_{(9)}=2.42$, $P=0.039$; Grupo Mus $t_{(11)}=0.14$, $P=0.889$) mientras que se recupera la MLT de ROC de la primera traza. (Figura 8a, Grupo Veh $t_{(11)}=0.72$, $P=0.483$, Grupo Mus $t_{(9)}=5.75$, $P<0.001$).

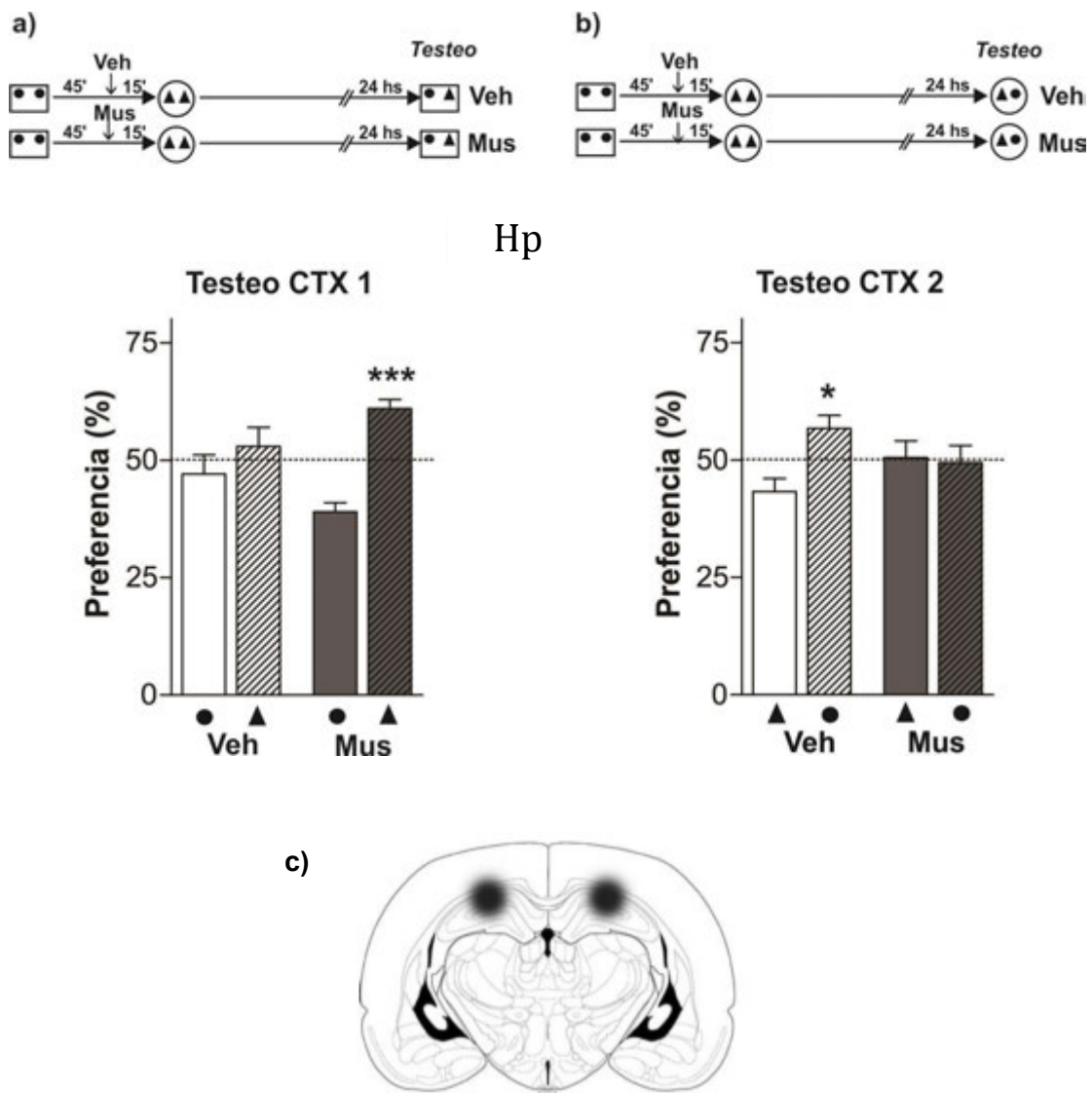


Figura 8) La inactivación local del Hipocampo (Hp) previa al segundo ensayo revierte la IR sobre la formación de MLT de ROC del primer ensayo.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj incongruente y las lisas al Obj congruente. Se evaluó la MLT de ROC. Grupos independientes de animales fueron entrenados con un primer ensayo en un CTX1 y una hora más tarde un segundo ensayo en un CTX2. 15min antes del segundo ensayo los animales recibieron una infusión en la CA1 del Hp dorsal de vehículo (Veh) ó muscimol (Mus). La MLT del ROC fue evaluada 24hs más tarde en sólo una de las 2 arenas, a) los animales testados en el CTX1, b) animales testados en el CTX2. c) esquema del área de infusión * $p < 0.05$, *** < 0.001 vs. el objeto congruente, Test de T pareado.

De manera similar, cuando administramos muscimol en la CPFm, la formación de la MLT de ROC del segundo ensayo se vio perjudicada (Figura 9b, Grupo Veh $t_{(13)}=2.57$, $P=0.023$; Grupo Mus $t_{(12)}=1.59$, $P=0.138$), lo que correlacionó con la consolidación de la MLT de ROC del primer ensayo (Figura 9a, Grupo Veh $t_{(9)}=1.87$, $P=0.094$; Grupo Mus $t_{(11)}=2.80$, $P=0.017$). Estos resultados sugieren que tanto el Hp como la CPFm estarían involucradas en el procesamiento de la tarea de ROC y que silenciando esas regiones se impide la formación de la MLT de la tarea que interfiere, permitiendo que se consolide la primer experiencia. Es decir que estos resultados sugieren una competencia por la actividad de dichas regiones a la hora de formar MLT de ROC.

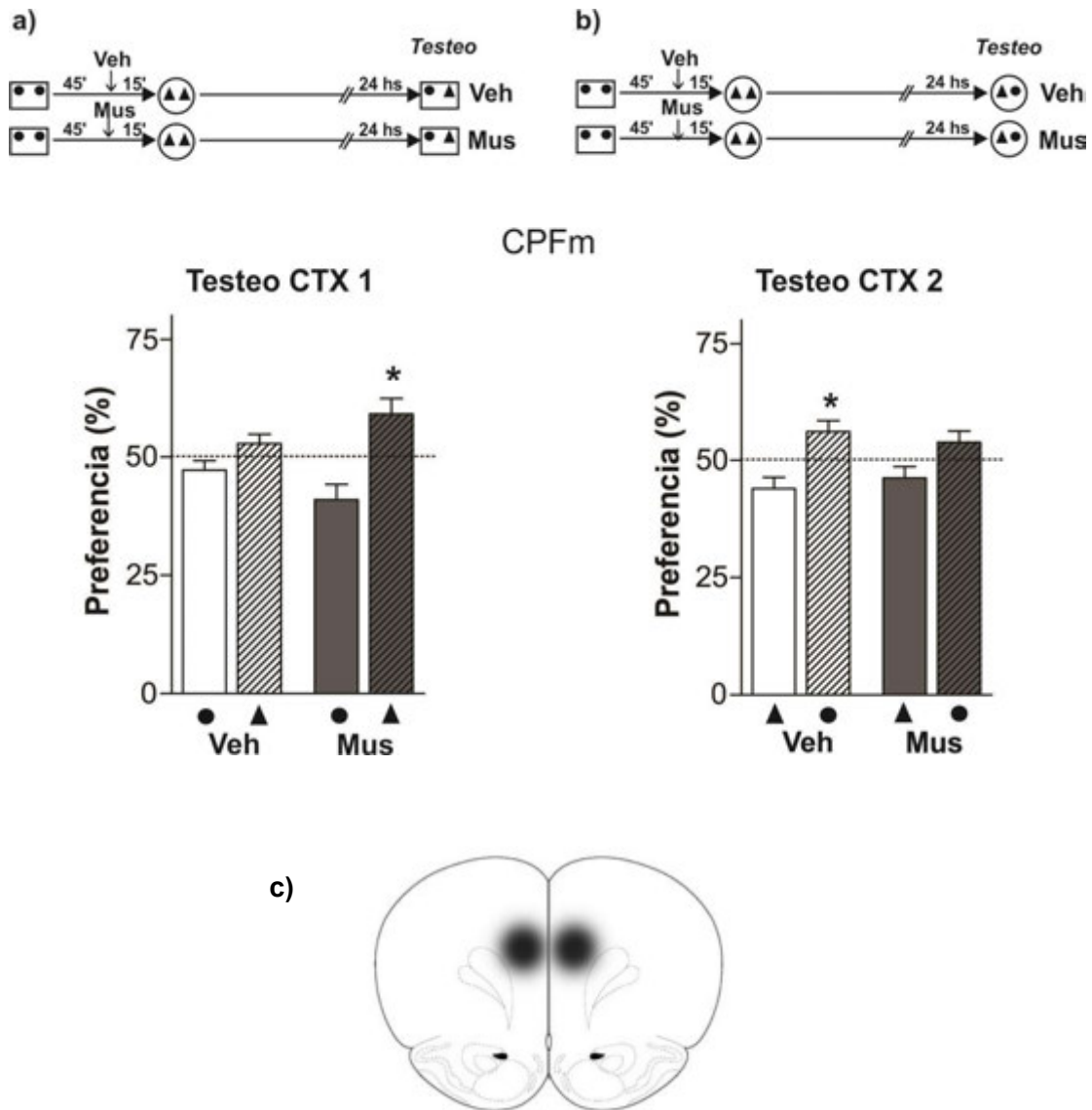


Figura 9) La inactivación local de la Corteza prefrontal medial dorsal (CPFm) previa al segundo ensayo revierte la IR sobre el primer ensayo.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj incongruente y las lisas al Obj congruente. Se evaluó la MLT de ROC. Grupos independientes de animales fueron entrenados con un primer ensayo en un CTX1 y una hora más tarde un segundo ensayo en un CTX2. 15min antes del segundo ensayo los animales recibieron una infusión en la CPFm de vehículo (Veh) ó muscimol (Mus). La MLT del ROC fue evaluada 24hs mas tarde en sólo una de las 2 arenas. a) animales testados en el CTX1, b) animales testados en el CTX2. c) esquema del área de infusión * $p < 0.05$ vs. el Obj congruente, Test de T pareado.

Conclusiones Capítulo 1:

En este capítulo hemos visto que la formación de la MLT de ROC es susceptible de ser interferida por un ensayo de asociación de Obj en CTX subsecuente, diferente, experimentado 1 hora más tarde del primero. Dicha IR actúa sobre la fase de consolidación de la memoria del Obj1 en el CTX1 ya que solamente afecta su MLT, dejando intacta su MCT. Esto se ve apoyado por el hecho de que cuando el segundo ensayo fue separado 4 horas del primero, la IR no tiene lugar. La IR depende de la presentación de un segundo par de Obj en un CTX diferente del primero con independencia de si estos son novedosos o familiares. La interpolación del segundo ensayo impide la consolidación de la MLT de ROC del primer ensayo sin afectar la formación de la memoria del Obj presentado en él (es decir, sin afectar la MLT de RON del Obj1). La Inactivación de la CA1 del Hp Dorsal y la CPFm antes del aprendizaje del segundo ensayo (Obj2 en CTX2) impide la formación de la MLT del segundo par asociado, mientras que se restaura la expresión de la MLT del primero (Obj1 en CTX1).

Discusión Capítulo 1:

El aprendizaje de ROC genera la memoria de asociación de un determinado par de Objetos a un CTX. Consiste en la realización de dos ensayos, cada uno en un CTX diferente, durante los cuales se les presenta un par de objetos idénticos, pero diferentes para cada uno de los CTX. Nuestros resultados muestran que la formación de la MLT de ROC es susceptible de ser interferida de manera retroactiva, dado que la formación de la MLT del primer ensayo de Obj en CTX es abolida mientras que la MLT del segundo es preservada cuando el intervalo entre los ensayos es de 1 hora (figura 1). Los resultados muestran que los animales testeados en el CTX1 exploran ambos objetos por igual por lo que consideramos que ambos objetos son percibidos como incongruentes en ese CTX. Mientras que cuando la MLT fue testada en el CTX2 observamos una menor exploración del Obj2 (con respecto al Obj1) lo que muestra claramente que los animales recuerdan haber explorado esta asociación Obj-CTX durante el entrenamiento realizado el día anterior.

La IR sobre la MLT de ROC del Obj1 en el CTX1 puede deberse a fallas en la codificación, consolidación o evocación de la información de dicha traza. Con el fin de clarificar sobre qué etapa de esta memoria actúa la interferencia decidimos evaluar la MCT del primer ensayo. Los resultados obtenidos en la figura 2 nos indican que no existe IR sobre la MCT. Lo que nos permite concluir que la adquisición de esta traza se realizó correctamente y es probablemente su consolidación la que se ve dañada.

Hace algo más de un siglo, se postuló que la interferencia generada mediante la interpolación de determinados sucesos o tareas podría ser una de las causas “del olvido” de todos los días (Müller & Pilzecker, 1900). A medida que las memorias se

estabilizan, se vuelven menos sensibles a las interferencias. Siguiendo este razonamiento, y con el fin de estudiar más a fondo la posibilidad de que la IR estuviese actuando sobre la fase de la consolidación de la memoria de ROC, decidimos aumentar el intervalo temporal entre los ensayos para darle tiempo a que se consolide la traza antes de interponer otro ensayo. Lo que observamos en este caso es que si el segundo ensayo se separa por 4 h del primero, la IR no se observa (Fig. 3). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la memoria del Obj1 en el CTX1 puede ser adquirida y expresada como MCT, pero es su estabilización la que se ve impedida si otro aprendizaje tiene lugar en una ventana temporal cercana.

En nuestro trabajo, el curso temporal en el que la IR ocurre sugiere fuertemente que el segundo ensayo de aprendizaje afecta la consolidación de la memoria del primero. Hasta donde sabemos, los presentes hallazgos representan la primera evidencia de IR en la formación de MLT una tarea de ROC.

Varios trabajos se centraron en el componente de la adquisición de MCT de la memoria de reconocimiento, midiendo el rendimiento de ratas en un ensayo realizado pocos minutos después de un protocolo de entrenamiento de dos ensayos. Por ejemplo en el trabajo de Good y col. realizaron entrenamientos de dos ensayos de 5 min con 2 min de separación entre sí. En este caso, las ratas mostraron adquisición y MCT para el reconocimiento de objetos y componentes temporales / espaciales de estas tareas (Good et al., 2007). Dichos resultados están de acuerdo con los aquí presentados y apoyan el hecho de que el IR actúa específicamente sobre la formación de MLT sin interferir en los aspectos a corto plazo de la memoria.

Resultó interesante la demostración que la IR de la MTL de ROC se observa si el segundo ensayo ocurre tanto en un CTX novedoso como familiar en presencia de objetos novedosos o familiares. Esto puede interpretarse como que la memoria de ROC puede ser afectada por diversas situaciones que contengan cambios en los componentes del “donde” como del “que” del evento que experimenta el animal. Sin embargo, cuando evaluamos la MLT de RON del Obj1, con independencia de las características del segundo ensayo, llevado a cabo siempre en un CTX2 diferente al del primer ensayo, no observamos IR. Por lo tanto, podemos concluir que el segundo ensayo interpolado interfiere específicamente con la consolidación de la memoria del Obj1 en el CTX1 sin afectar la formación de la memoria de reconocimiento del Obj1 *per se* (Figs. 4 y 5). Nuevas variaciones del segundo ensayo interpolado en la búsqueda de la IR sobre la memoria de RON serán exploradas en el capítulo siguiente.

Wixted (2004) sugiere que la interferencia es un nuevo aprendizaje, que utiliza para sí los recursos disponibles para consolidar la traza inicial. De acuerdo con esta idea, experimentos anteriores de nuestro grupo sugieren que la competencia para la consolidación de dos trazas de memoria (ambas hipocampo dependientes) ocurre cuando los recursos necesarios para la plasticidad se encuentran en cantidades limitadas (Martínez et al., 2012). De este modo, una traza se consolida, pero la otra no, debido a que los recursos no alcanzan para formar ambas. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que en este paradigma de memoria de ROC, el procesamiento del segundo ensayo podría interferir con el procesamiento en curso del primero, al utilizar recursos de plasticidad comunes o desviando la maquinaria de síntesis proteica que tenían como objetivo la consolidación de la MLT del Obj1 en el CTX1. Si ese fuera el

caso, entonces, ¿cuáles son las estructuras del cerebro que están involucradas en la formación de MLT de ROC?

Debido al importante rol del Hp en el procesamiento de la información espacial y contextual (Mumby et al., 2002; Balderas et al., 2008; Komorowski et al., 2009; Barker y Warburton, 2011), razonamos que la formación de la MLT de este tipo de asociación entre los objetos y contextos podría ser dependiente de la actividad de esa región.

Como observamos en la figura 8, al silenciar con muscimol la región CA1 del Hp dorsal antes del aprendizaje del segundo ensayo se deteriora la formación MLT para esta asociación (Obj2 en CTX2), mientras que se permite la restauración de la expresión de la MLT del Obj1 en el CTX1. Resultado que nos indica que el input hipocampal parece ser importante para iniciar la formación de la MLT de ROC. De este modo razonamos que si no hay una segunda traza que se solape a la primera, se evitaría la competencia ya sea por la maquinaria o los futuros recursos necesarios para la consolidación de las memorias.

Nuestros datos acerca de que el Hp juega un rol importante en la consolidación de memoria en este paradigma están de acuerdo con un trabajo previo en el que la infusión de un inhibidor de traducción proteica (anisomicina) en el Hp inmediatamente después del entrenamiento bloquea la MLT pero no la MCT de ROC (Balderas et al., 2008).

El papel de la CPFm en la adquisición y formación de la MCT de reconocimiento está bien caracterizado (Barker et al., 2007; Barker y Warburton, 2013). Sin embargo, pocos trabajos se han enfocado en estudiar el rol de la CPFm en los procesos de

consolidación en general, y menos aun en analizar el rol de esta estructura en las memorias de reconocimiento en particular. Nuestros experimentos muestran que la inactivación por muscimol de la CPFm antes de la adquisición de una tarea de ROC afecta su expresión dejando intacta la expresión de la MLT de los Obj1 en el CTX1 (Figura 9). Estos resultados sugieren que la adquisición de la memoria ROC y su consolidación requieren la activación de CPFm. Además, el procesamiento coincidente de dos ensayos diferentes en la CPFm podría resultar en la competencia de las trazas, dando lugar a la expresión de IR. En concordancia con nuestro trabajo, se ha encontrado recientemente que la inactivación de la CPFm antes de la adquisición de una lista de discriminación de olores (asociado vs no asociado a recompensa), evita la interferencia observada cuando se las somete a un aprendizaje posterior de una segunda asociación de olores con información contradictoria con respecto al primero (Peters et al., 2013). Nuestra interpretación a esos resultados es que esta intervención farmacológica podría bloquear la formación de la primera lista, y reducir la interferencia proactiva, previniendo la competencia entre las diferentes trazas.

Notablemente, el bloqueo de la corteza perirrinal, la corteza insular o la amígdala no afectó la memoria de ROC (Balderas y col., 2008). Por el contrario, nuestros resultados sugieren que el Hp dorsal y la CPFm son fundamentales para la formación de su MLT. Por otra parte, los recientes hallazgos de Bekinschtein y col. (2013) muestran que el bloqueo de los receptores 5HT_{2A} en la CPFm o el Hp dorsal impide el reconocimiento del objeto incongruente en un protocolo donde la memoria es evaluada a corto plazo. Los autores demuestran que la señalización serotoninérgica en la CPFm está acoplada a la actividad del Hp durante la evocación de la tarea ROC. A

pesar de que en nuestro trabajo no se explora la participación de la transmisión serotoninérgica en la formación de la MLT para esta tarea, la inactivación farmacológica con muscimol nos permite plantear la hipótesis de que la interconexión entre estas regiones sería requerida para consolidar la MLT de la tarea de ROC.

Cada vez hay más evidencias de la participación de redes cerebrales solapadas para el procesamiento de los diferentes aspectos tanto de la memoria espacial y como de la memoria de reconocimiento (Warburton y Brown, 2010; Banks et al., 2012; Barbosa et al., 2012; Barker y Warburton, 2013; Rossato et al., 2013a). Nuestra hipótesis es que los procesos que subyacen a la adquisición, consolidación y expresión de memorias de ROC podrían competir dentro de estas redes, lo que resulta en una interferencia visible. En este sentido, se ha reportado en experimentos de *memory allocation* que las neuronas que respondían a un evento tenían niveles elevados del elemento de unión de respuesta a AMPc (CREB1) por un corto período de tiempo, haciéndolas más propensas a ser reclutadas por otro evento que ocurre en una ventana temporal cercana (Zhou et al., 2009). De esta manera podrían solaparse los sustratos neuronales de ambas trazas sobre los que los mecanismos de competencia tienen lugar. De acuerdo con esto, también se registró mediante la combinación de técnicas de genética y genes de expresión temprana (del inglés, IEG) la respuesta de activación neuronal cuando las ratas fueron expuestas a dos entornos diferentes. Lo que se observó fue una activación de poblaciones neuronales distintas en el giro dentado, mientras que en la CA1 se observó un solapamiento parcial (Deng et al., 2013). Por lo tanto, es plausible que un mecanismo de competencia celular en la CA1

del Hp dorsal y la CPFm explique las bases moleculares de la IR en el procesamiento MLT de ROC.

¿Por qué no encontramos IR para la MLT del Obj1? Con este protocolo, hemos observado que el segundo ensayo no interfirió con la consolidación de la MLT para la memoria de RON (Figura 5). Una posible explicación de esto es el enlace entre las representaciones espaciales del Hp y componentes de memoria extra-Hp, que podría reforzar la identidad de los objetos relacionados con diferentes contextos sin resultar en IR (Hardt et al., 2013). Es decir, la memoria de los objetos en sí es robusta y poco vulnerable si el CTX contribuye a su formación. De tal modo que luego, aunque el animal no recuerde en que CTX exploró el Obj, sí recuerda la identidad del mismo. Si bien mostramos la función de la CPFm y del Hp en la memoria de esta tarea de reconocimiento, no podemos descartar la participación de otras cortezas. Se demostró que las ratas con lesiones de la corteza entorrinal lateral no fueron capaces de reconocer las asociaciones de Obj en CTX (Wilson et al., 2013a; b). Si los objetos y los contextos son considerados como una parte de un entorno contextual general, se podría pensar que tanto la corteza entorrinal lateral como la CPFm vinculan los objetos con sus contextos para formar una representación de un nuevo entorno contextualizado. Otra corteza también involucrada en la formación de MLT de reconocimiento es la perirrinal (Seoane et al., 2012; Tinsley et al., 2012; Balderas et al., 2013) y su participación en el RON está bien documentado (Winters et al., 2008, 2011; Albasser et al., 2011).

La conclusión principal de los experimentos presentados en este primer capítulo es que cuando dos trazas de memoria diferentes de ROC se están procesando,

la segunda traza interfiere con la consolidación de la primera en una ventana temporal crítica. Hemos demostrado que la CPFm y la CA1 del Hp dorsal están involucradas en la consolidación de esta tarea. La amnesia observada en la MLT por la IR es probablemente causada por la competencia por los recursos o la maquinaria celular en estas regiones del cerebro cuando se encuentran comprometidos con la formación de la memoria de dichas trazas.

Resultados – Capítulo II

La consolidación y expresión de una memoria de Reconocimiento de objeto novedoso (RON) es susceptible de ser interferida retroactivamente.

Como ya hemos mencionado con anterioridad, *reconocer* es la habilidad de distinguir la ocurrencia de un estímulo que fue previamente presentado de uno que no lo fue (Squire et al., 2007). Los animales pueden formar memorias de reconocimiento de la identidad de objetos, de su ubicación y del momento temporal en el cual ellos fueron presentados (Barker et al., 2007). En este capítulo, nos enfocaremos en la memoria de RON, la cual se basa en la capacidad de los animales de discriminar un nuevo Obj de uno familiar cuando ambos son presentados en una arena familiar. Esta tarea es utilizada para investigar el aspecto del “qué” de las memorias del tipo episódica (Tulving, 2002; Ergorul y Eichenbaum, 2004; Dere et al., 2005).

En el capítulo anterior mostramos que la formación de la MLT de ROC es sensible de IR generada por la exploración de un CTX diferente (familiar y novedoso) con diferentes objetos (familiares o novedosos) en él. Esta interferencia ocurre en una ventana temporal restringida y opera sobre la fase de la consolidación, dejando intacta la expresión de la MCT (Martínez et al., 2014). Sin embargo, la memoria de los objetos en sí presentados en el primer ensayo, es insensible a IR ocasionada por la exploración objetos diferentes en un CTX diferente (Martínez et al., 2014). En otras palabras, los animales pueden recordar el Obj pero no recuerdan en qué CTX fue explorado ese Obj durante el entrenamiento.

Por lo tanto, ¿Es la memoria de RON inmune a la RI? O ¿Es necesario aumentar la complejidad de la tarea para poder observar la interferencia sobre la habilidad de las ratas de recordar la identidad del Obj? Con el fin de resolver este interrogante, en esta parte del trabajo expusimos a las ratas a dos sesiones de exploración de objetos secuenciales, ambas en la misma arena, cambiando la identidad de los objetos colocados en cada ensayo.

El objetivo de este capítulo es por lo tanto investigar si la MLT de RON es susceptible de IR dentro de la ventana de consolidación. Además determinamos que tipo de eventos son capaces de interferir con la memoria de RON y cuáles son las áreas del cerebro que están involucradas en este proceso.

Como los primeros resultados que obtuvimos y mostramos en el capítulo primero, muestran que la MLT de la identidad del Obj no sufre de IR cuando se utilizan contextos diferentes, en este capítulo estudiamos si la MLT de RON era susceptible de IR utilizando condiciones más exigentes en los ensayos. Con este fin, se entrenaron ratas en con dos ensayos en un mismo CTX y en cada uno de estos ensayos se les presentaron dos objetos idénticos entre sí, pero diferentes entre ensayos. Estos ensayos fueron separados por diferentes intervalos temporales (iti): 1h, 3hs, 4hs y 7hs. La MLT para los objetos presentados en el primer ensayo (Obj1) o en el segundo ensayo (Obj2) fue evaluada 24hs luego del entrenamiento, utilizando grupos de animales independientes. Durante la sesión de testeo, realizada en la misma arena que las sesiones de entrenamiento, lo animales exploraron un Obj familiar que había sido presentado durante la sesión de entrenamiento (Obj1 u Obj2), y un Obj novedoso, nunca visto antes. Como se puede observar en la Figura 10a los animales

pertenecientes al grupo control, que tuvieron un solo ensayo de RON durante el entrenamiento, muestran una preferencia exploratoria por el objeto novedoso ($t_{(7)}=3.37$, $p=0.012$). Sin embargo, cuando los animales recibieron un segundo ensayo de RON 1h o 3hs después del primero en el entrenamiento, al momento del testeo ambos objetos fueron explorados igualitariamente, lo que refleja que la MLT del Obj1 se vio perjudicada (Grupo 1h: $t_{(23)}=0.18$, $p=0.856$; Grupo 3hs: $t_{(11)}=1.63$, $p=0.132$).

Por otro lado, el efecto de IR del segundo ensayo de RON sobre el primero estuvo ausente cuando el iti fue de 4 o 7hs (Grupo 4h: $t_{(19)}=2.49$, $p=0.022$; Grupo 7h: $t_{(17)}=5.82$, $p<0.001$), dado que observamos una mayor exploración del Obj novedoso por sobre el Obj1 durante la sesión de testeo. En la Figura 1b se muestra que independientemente del iti utilizado, la MLT del Obj2 se encontró presente en todos los casos aquí estudiados (Grupo Ctrl: $t_{(10)}=4.17$, $p=0.002$; Grupo 1h: $t_{(21)}=2.30$, $p=0.032$; Grupo 3hs: $t_{(12)}=2.83$, $p=0.015$; Grupo 4hs: $t_{(20)}=3.05$, $p=0.006$ y Grupo 7hs: $t_{(13)}=2.52$, $p=0.025$), lo que sugiere que el primer ensayo no causa interferencia anterógrada sobre la MLT del Obj2 presentado en el segundo ensayo.

ensayo durante el entrenamiento (Grupo Ctrl ($t_{(9)}=2.29$, $p=0.047$), así como también en aquellas ratas que durante el entrenamiento tuvieron dos sesiones de RON en el mismo contexto separadas por una hora (Grupo Exp $t_{(8)}=2.85$, $p=0.022$). Asimismo, como era de esperar, también fue observada la MCT del Obj2, tanto en animales sometidos a un sólo ensayo como a dos, cuando fueron testeados a los 3:30hs (figura 11b Grupo Ctrl: $t_{(8)}=3.10$, $p=0.015$; Grupo Exp: $t_{(8)}=3.72$, $p=0.006$). Es decir que la MCT de los Obj1 y del Obj2 se pudo adquirir, formar y expresar 3:30hs luego del entrenamiento, ya sea en presencia o ausencia de un segundo ensayo de RON separada por una hora (que sí produce IR para la MLT del Obj1).

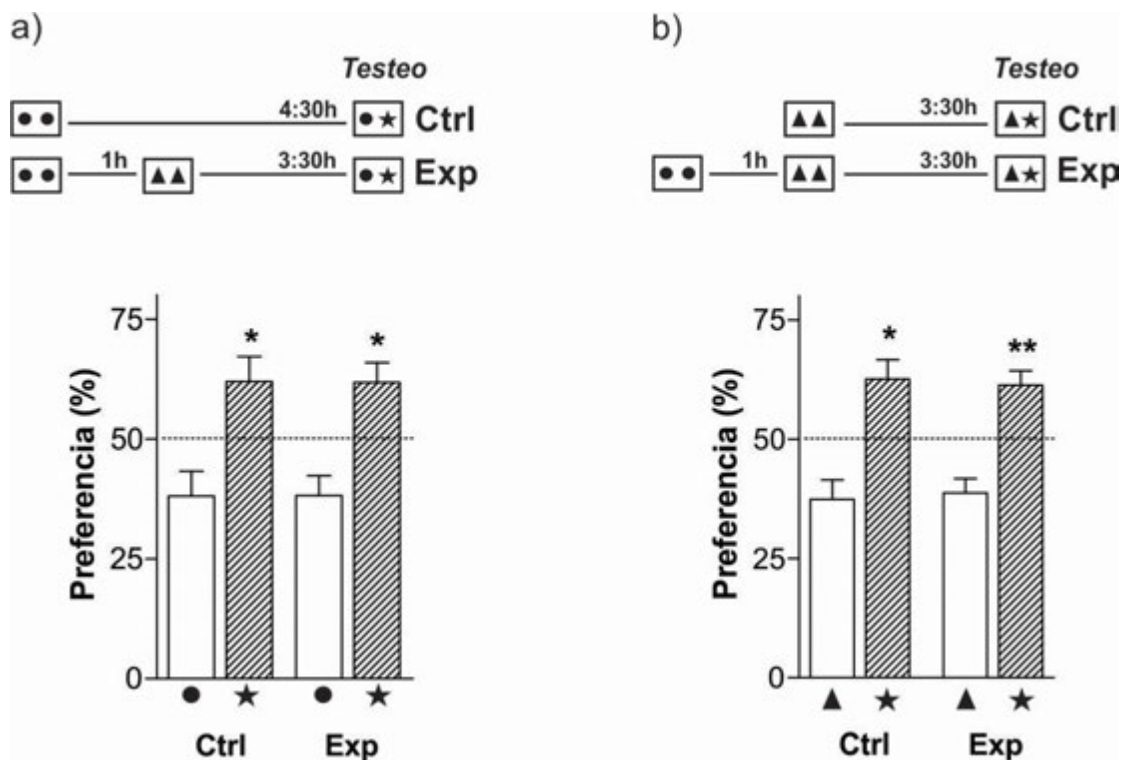


Figura 11) La formación de la MCT de RON no es interferida por la exploración de otro objeto novedoso en la misma arena.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj novedoso y las lisas al Obj familiar. La MCT para el Obj1 no es interferida por la presencia del Obj2 en el mismo contexto. Grupos independientes de animales fueron entrenados con un solo ensayo, grupo control, y testeados en la misma arena 4:30hs o 3:30hs luego del entrenamiento. Los sujetos en el Grupo experimental fueron sometidos a dos ensayos en la sesión de entrenamiento y 3.30hs luego de la misma fueron testados para evaluar la memoria del Obj1 o del Obj2. a) MCT para el Obj presentado en el primer ensayo (Obj1). b) MCT para el objeto presentado en el segundo ensayo (Obj2). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. el Obj familiar, Test de T pareado.

Sin embargo, encontramos que si la exploración del Obj2 ocurría muy cercana al testeo de RON para el Obj1 (30 min antes), entonces la memoria de reconocimiento del Obj1 no se podía evidenciar (Figura 12a). Entonces, nos dedicamos a estudiar si el segundo ensayo de la sesión de entrenamiento era capaz de perjudicar la expresión de la memoria de los objetos presentados en el primero. Con esto en mente, realizamos una serie de experimentos en los cuales entrenamos animales con un solo ensayo de RON (Obj1), y realizamos el segundo ensayo (Obj2) 30 min antes de la sesión de testeo. Nuestro objetivo fue evaluar los efectos de este segundo ensayo sobre la expresión de la MCT así como la MLT del OBJ1. Como puede observarse en la Figura 12a encontramos fallos en la expresión de ambas memorias en los animales pertenecientes al grupo experimental (Grupo Exp MCT: $t_{(14)}=0.07$, $p=0.945$, Grupo Exp MLT: $t_{(9)}=0.43$, $p=0.680$). Los animales en los grupos controles que fueron entrenados en paralelo pero no recibieron un segundo ensayo previo al testeo expresaron

correctamente tanto la MCT (Grupo Ctrl MCT: $t_{(9)}=2.49$, $p=0.034$) como la MLT (Grupo Ctrl LTM: $t_{(13)}=2.26$, $p=0.041$).

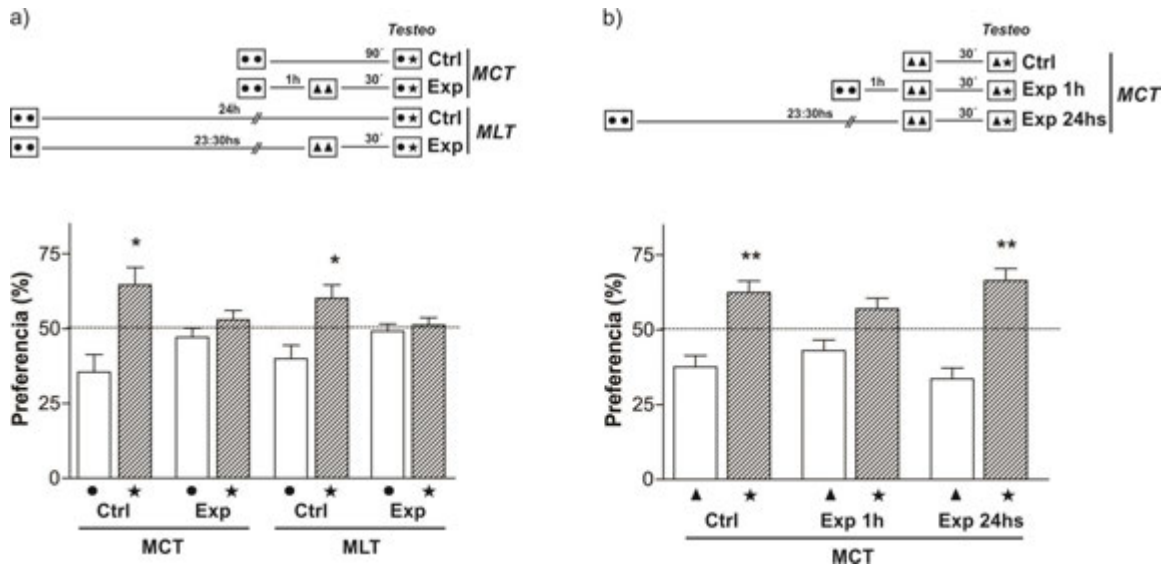


Figura 12) La expresión de la memoria de RON se ve afectada por la exposición a un Obj novedoso cerca del momento del testeo y en la misma arena.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al objeto novedoso y las lisas al objeto familiar.

Los animales en el grupo control fueron entrenados solo con un ensayo y testeados 30min, 90min o 24hs luego. Los animales en los grupos experimentales tuvieron dos ensayos (Obj1 primero y Obj2 segundo) siendo el segundo ensayo 30min antes de la sesión de testeo. La expresión de la MCT se evaluó a los 30min del entrenamiento, y la expresión de la MLT a las 24hs del entrenamiento. a) expresión de la MCT y MLT para el Obj presentado en el primer ensayo (Obj1), b) expresión de la MCT para el Obj presentado en el segundo ensayo (Obj2). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, vs. el Obj Familiar, Test de T pareado.

Estos resultados sugieren que la presencia de un segundo ensayo de entrenamiento cercano a la sesión de testeo perjudica la expresión de tanto la MCT

como la MLT de RON para el Obj1. Más aún, en la figura 12b se puede ver que el primer ensayo de entrenamiento tuvo un efecto negativo sobre la expresión de MCT del Obj2 cuando el Obj1 fue explorado cerca del momento del testeo (Grupo Exp -1h STM: $t_{(15)}=1.17$, $p=0.258$). Sin embargo, cuando el primer ensayo, en el que se exploró el Obj1, ocurrió 24hs antes del testeo, la expresión de la MCT del Obj2 no se ve afectada (Grupo Exp -24h MCT: $t_{(10)}=4.55$, $p=0.001$). Esta MCT observada para el Obj2 fue similar a la encontrada en el grupo control (Grupo Ctrl STM: $t_{(12)}= 3,23$, $p= 0.007$).

Tomados como un todo, estos resultados sugieren que tanto la expresión de la MCT como la expresión de la MLT de RON son afectadas por la exposición a otro objeto novedoso cuando ésta ocurre cercana al momento del testeo.

Luego, decidimos enfocarnos en la IR sobre la formación de la MLT de RON descrita en la figura 10a. Hasta aquí mostramos que ella acontece si el segundo ensayo es presentado 1 o 3 horas más tarde y que ella no impide la formación de la MCT del Obj1. Sin embargo, a pesar de estar muy separada del momento del testeo, sí impidió su expresión a largo término. En su conjunto, estos resultados sugieren que la IR opera sobre la consolidación de la memoria del Obj1. A continuación, nos interesaba estudiar cuáles eran las características del segundo ensayo que son importantes para ejercer el efecto perjudicial sobre la consolidación de la MLT del Obj1. Con este objetivo, los animales exploraron un par de objetos novedosos, Obj1, en un contexto familiar determinado, y una hora más tarde fueron reintroducidos en el mismo CTX, sólo que esta vez sin objetos (grupo Vacío), o con un par de objetos novedosos (grupo Novedoso, Nov) ó un par de objetos diferentes con los que el animal fue previamente familiarizado (Grupo Familiar, Fam). Veinticuatro horas más tarde la

MLT para el Obj1 fue medida, testeando a los animales en el mismo CTX en presencia de una copia del Obj1 y un Obj nunca visto antes. En la Figura 13 se puede observar que tanto la exposición al mismo CTX vacío, como a objetos familiares, no perjudican la consolidación de la MLT de Obj1 (Grupo Vacío: $t_{(15)}=3.64$, $p=0.002$; Grupo Fam: $t_{(15)}=3.64$, $p=0.002$). De la misma manera que observamos en la Fig 10a, la presencia de un par de objetos novedosos en el mismo CTX daña la consolidación de la MLT del Obj1 ($t_{(12)}=0.41$, $p=0.691$).

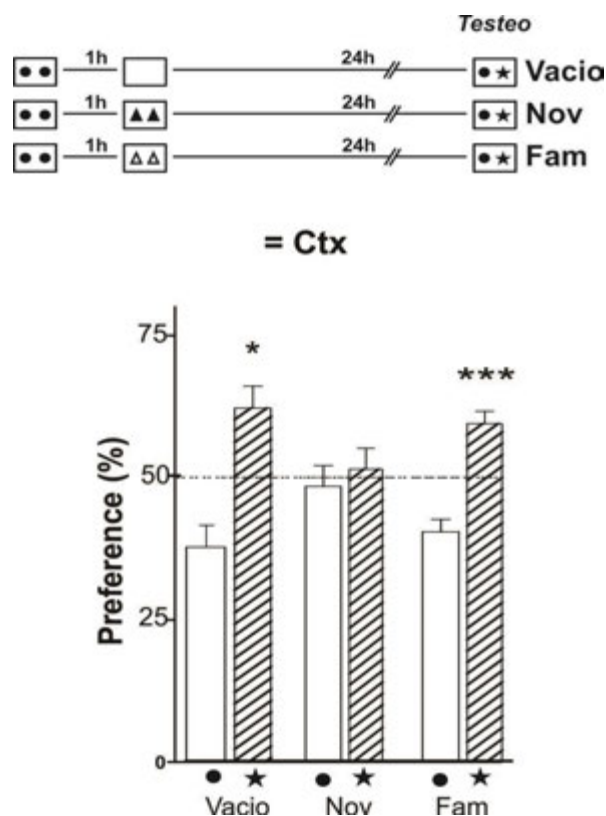


Figura 13) La IR sobre la formación de la MLT del Obj1 requiere la exploración de un par de objetos novedosos, y no familiares en la misma arena.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj novedoso y las lisas al Obj familiar.

Los sujetos experimentales realizaron un primer ensayo en la sesión de entrenamiento en presencia de los Obj1 novedosos y una hora más tarde un segundo ensayo en la misma arena, en ausencia de objetos (grupo Vacio) o en presencia de un par de objetos a los que habían sido previamente habituados (grupo Fam) o en presencia de un par de objetos completamente novedosos (Grupo Nov). Para todos los grupos la MLT fue testada a las 24hs del entrenamiento. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, vs. el Obj Familiar, Test de T pareado.

Siguiendo con el estudio de las características del segundo ensayo necesarias para que haya interferencia, realizamos otra serie de experimentos que se describen a continuación. Una hora luego del primer ensayo de RON en un contexto familiar con

los objetos novedosos (Obj1), se expuso a los animales a un segundo ensayo en un CTX diferente del primero, al cual podían estar previamente familiarizados (CTX diferente familiar) o no (CTX diferente novedoso). Este segundo CTX, al igual que en el caso anterior podía encontrarse vacío, o con un par de objetos familiares (Fam) o novedosos (Nov) dentro. Como puede observarse en la figura 14a cuando el segundo ensayo tiene lugar en un CTX novedoso, independientemente de si está vacío (Grupo Vacío: $t_{(6)}=4.87$, $p=0.003$), con objetos novedosos (Grupo Nov: $t_{(11)}=2.20$, $p=0.05$) u objetos familiares (Grupo Fam: $t_{(9)}=6.46$, $p<0.001$) dentro, la MLT del Obj1 se encuentra preservada y no vemos IR. Resultados similares fueron obtenidos cuando el segundo ensayo ocurrió en un contexto diferente pero con el cual los sujetos experimentales habían sido familiarizados. En todos los casos se observó la MLT del Obj1 (Figura 14b, Grupo Vacío: $t_{(6)}=4.14$, $p=0.006$; Grupo Nov: $t_{(8)}=6.95$, $p<0.001$; Grupo Fam: $t_{(17)}=3.45$, $p=0.003$).

Estos resultados confirman y extienden lo que habíamos reportado en el capítulo 1 y sugieren que la MLT de RON es robusta y sólo puede ser interferida por la presencia objetos novedosos en el mismo CTX.

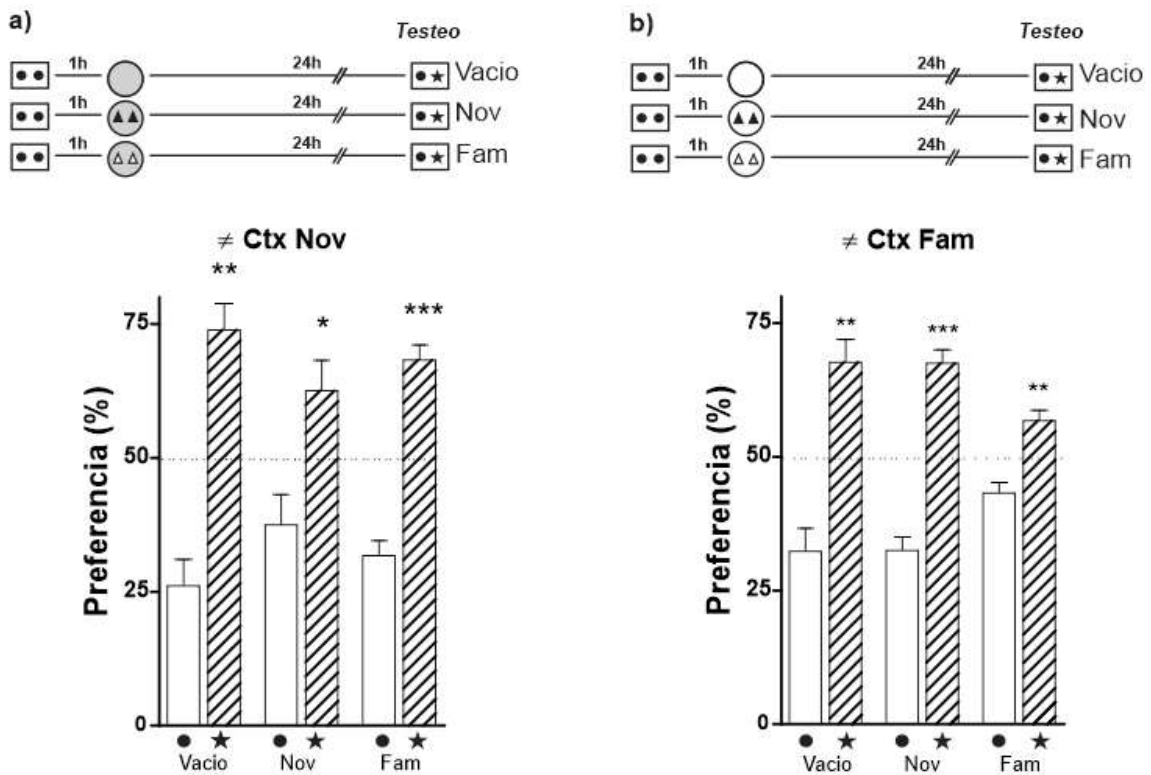


Figura 14) No se observa IR sobre la formación de la MLT del Obj1 cuando la segunda sesión ocurre en un Contexto diferente al de la primera.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj novedoso y las lisas al Obj familiar.

Los sujetos experimentales realizaron un primer ensayo en la sesión de entrenamiento en presencia de los Obj1 novedosos y una hora más tarde un segundo ensayo en una arena diferente en ausencia de objetos (grupo Vacio) o en presencia de un par de objetos a los que habían sido previamente habituados (grupo Fam) o en presencia de un par de objetos completamente novedosos (Grupo Nov). a) El segundo ensayo se realizó en un CTX familiar diferente al primero. b) El segundo ensayo se realizó en un CTX novedoso diferente al primero. Para todos los grupos la MLT del Obj1 fue testeada a las 24hs del entrenamiento en el CTX del primer ensayo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. el Obj familiar, Test de T pareado.

Finalmente, con respecto a las estructuras involucradas en la formación de la MLT de RON, nos interesó estudiar el rol del Hp y de la CPFm, dado que ambas estructuras se encuentran involucradas en diferentes paradigmas de memorias de reconocimiento. Además, nos interesaba comparar la participación de estas estructuras respecto de la memoria de ROC estudiada en el capítulo primero de esta tesis. Para esta serie de experimentos los animales fueron canulados de manera bilateral mediante cirugía estereotáxica o bien en la región CA1 del Hp dorsal o en la CPFm para infundirles muscimol de manera tal de generar una inhibición reversible en estas áreas. Utilizamos un protocolo de IR con un ITI de 1h, similar al descrito en la figura 10a, sólo que esta vez 15 min antes del segundo ensayo los animales recibieron la inyección local de la droga y la MLT del RON fue evaluada al día siguiente.

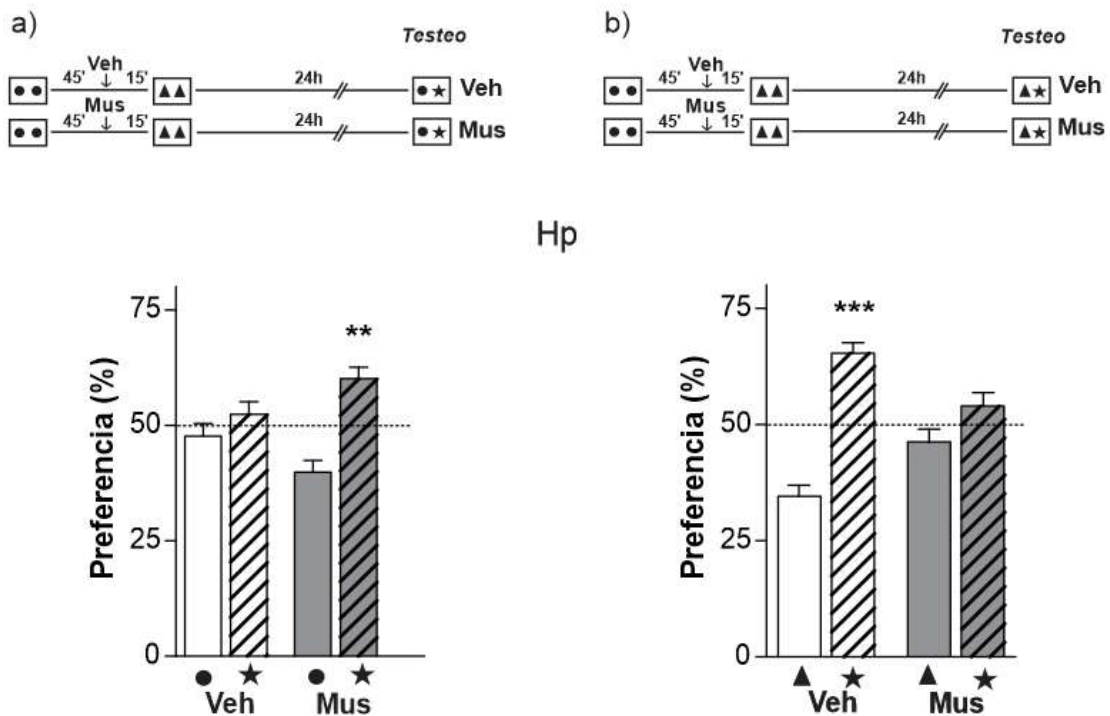


Figura 15) La inactivación local del Hp previa al segundo ensayo perjudica la MLT del Obj2 mientras que restituye la MLT del Obj1.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj novedoso y las lisas al Obj familiar.

Los sujetos realizaron dos ensayos de RON en un mismo CTX separadas por un iti de 1 hora. 15 min previos al segundo ensayo recibieron una infusión local de vehículo (Veh) o muscimol (Mus) en el Hp, la MLT fue evaluada 24hs luego del entrenamiento, a) para evaluar la MLT del Obj1 o b) para evaluar la MLT del Obj2. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. el Obj Familiar, Test de T pareado.

En la Figura 15a puede observarse la reconfirmación del efecto de IR sobre la MLT del Obj1, dado que cuando los animales fueron infundidos con vehículo en la CA1 del hp dorsal no presentaron preferencia por el Obj novedoso al momento del testeo (Grupo Veh: $t_{(14)} = 0.86$, $p = 0.405$). Contrariamente, en los animales pertenecientes al

grupo Mus, la MLT del Obj1 fue restaurada (Fig. 15a, Grupo Mus: $t_{(12)}=4.06$, $p=0.002$). Los animales que fueron testeados en forma paralela para evaluar la MLT del Obj2 se ilustran en la Figura 15b. Allí puede observarse que, como era esperado, los animales pertenecientes al grupo Veh presentan una MLT intacta (Grupo Veh: $t_{(13)}=6.81$, $p<0.001$) mientras que aquellos animales que recibieron la infusión del agonista GABA_A presentan ausencia de la MLT para el Obj2 (Grupo Mus: $t_{(13)}=1.35$, $p=0.200$).

De igual modo, cuando la infusión de Mus se realizó en la CPFm la MLT del Obj2 se vio dañada (Fig. 16b, Grupo Mus: $t_{(7)}=0.390$, $p=0.708$), mientras que cuando se infundió la solución vehículo, dicha MLT pudo evidenciarse (Fig. 16b, Grupo Veh: $t_{(5)}=4.18$, $p=0.009$). De manera similar a lo observado en el Hp, cuando se impide la formación de la MLT del Obj2 ocurre de modo correlativo la consolidación de la MLT del Obj1 (Fig. 16a, Grupo Mus: $t_{(7)}=2.84$, $p=0.025$, Grupo Veh: $t_{(6)}=0.03$, $p=0.974$).

Estos resultados sugieren que tanto la CA1 dorsal del Hp como la CPFm están involucradas en el procesamiento de la MLT de RON. Además sugieren un grado de competencia por la actividad de estas regiones por consolidar la MLT de uno y otro Obj.

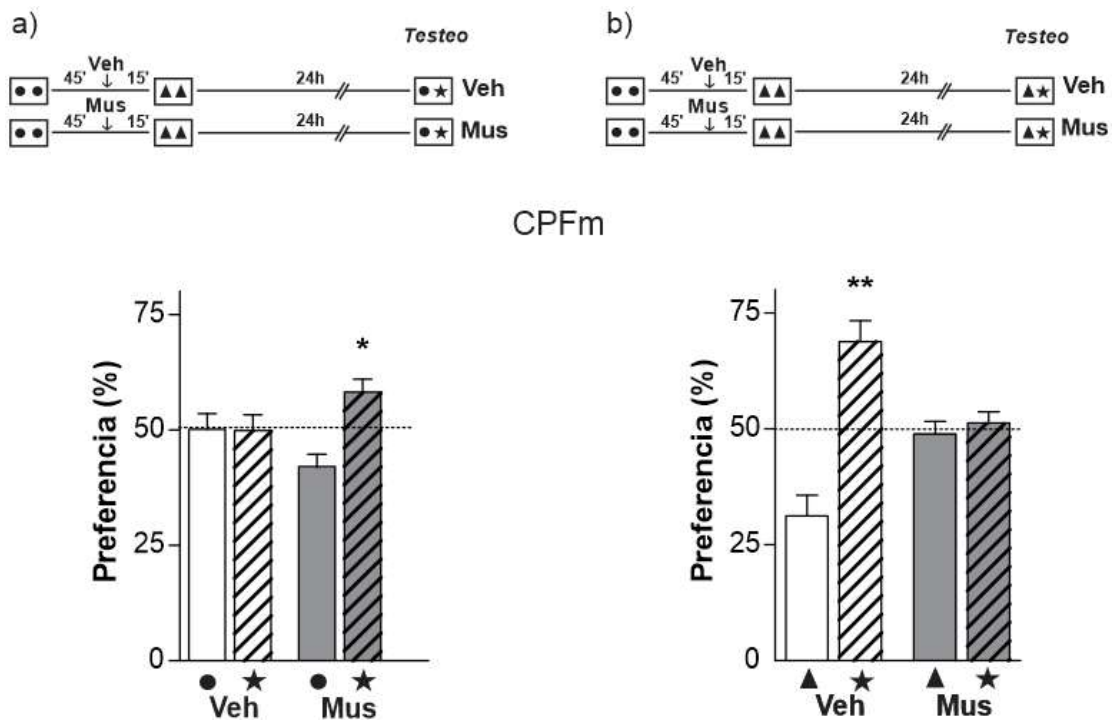


Figura 16) La inactivación local del CPFm previa al segundo ensayo perjudica la MLT del Obj2 mientras que restituye la MLT del Obj1.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj novedoso y las lisas al Obj familiar.

Los sujetos realizaron dos ensayos de RON en un mismo CTX separadas por un iti de 1 hora. 15 min previos al segundo ensayo recibieron una infusión local de vehículo (Veh) o muscimol (Mus) en la CPFm, la MLT fue evaluada 24hs luego del entrenamiento, a) para evaluar la MLT del Obj1 o b) para evaluar la MLT del Obj2. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, vs. El Obj Familiar, Test de T pareado.

Conclusiones - Capítulo II:

En este capítulo hemos visto que la formación de la MLT de RON es susceptible de ser interferida retroactivamente por la presentación subsecuente de un nuevo par de objetos en la misma arena. Observamos que ésta IR depende del intervalo temporal entre las presentaciones, pudiendo ser observada cuando los ensayos fueron separados 1 y 3 horas, pero no cuando esta separación se extendió a 4 y 7 horas. Esta IR opera solamente sobre la MLT de RON dejando intacta su MCT (testada a las 3:30hs). También observamos que la exposición a un par de objetos novedosos presentados en la misma arena cerca del momento del testeo afecta tanto la expresión de la memoria de reconocimiento de corto como la de largo término de un par de objetos presentados previamente. Se determinó que la IR sobre la formación de la MLT de RON es ocasionada solamente por la presentación de un par de objetos novedosos en la misma arena, dado que una segunda presentación con objetos familiares en la misma arena o de un CTX vacío o de un CTX diferente con objetos dentro, fue incapaz de generarla. La inactivación de la CA1 del Hp y CPFm antes del aprendizaje del segundo par de objetos impide formación de la MLT de RON de este par, mientras que se restaura la expresión de la MLT de RON del primer par.

Discusión - Capítulo II

En el capítulo anterior estudiamos el fenómeno de IR sobre la formación de la MLT de ROC. Al evaluar la MLT cuando entrenamos a los animales con dos ensayos de exposición a objetos novedosos en contextos familiares diferentes. Lo que observamos fue que cuando la separación entre ensayos fue de 1 hora, la MLT de la primera traza de ROC no pudo ser observada, sin embargo, la MLT del objeto *per se* se encontraba intacta. Estos resultados nos llevaron a preguntarnos si es que era posible encontrar interferencia sobre la formación de la memoria de RON. Nuestro razonamiento fue que era necesario aumentar la complejidad de la tarea para poder observar la interferencia sobre la MLT del RON. Es por esto que realizamos modificaciones en el protocolo experimental. En este caso los animales fueron, durante el entrenamiento, expuestos a dos ensayos de exploración de objetos novedosos, utilizando siempre el mismo CTX. En este caso, observamos la IR sólo cuando los animales fueron expuestos a un segundo ensayo de exploración de objetos novedosos 1 o 3hs luego del primer ensayo. Intervalos mayores no son efectivos para causar IR, sugiriendo que el período de consolidación celular de esta tarea puede ser mayor a 3 horas. Para ninguno de los intervalos temporales utilizados se observó interferencia anterógrada del primer ensayo sobre el segundo, dado que para todos los casos observamos MLT de RON del Obj2.

Luego de caracterizar el curso temporal de IR en la formación de la MLT de RON (figura 10) nos preguntamos si esta actuaría también sobre la formación de la MCT. Los resultados sugieren que la memoria del Obj1 es capaz de ser adquirida y expresada como MCT. Por lo tanto pensamos que es la estabilización de la memoria

del Obj la que se ve impedida por la interferencia y por lo tanto su MLT no es observada a las 24 hs.

A continuación y de manera análoga a lo que realizamos en el capítulo anterior nos propusimos diseccionar las características del segundo ensayo que son necesarias para generar IR sobre la MLT del primero. Los resultados obtenidos después de un análisis exhaustivo sugieren que sólo la presencia de nuevos objetos en la misma arena de entrenamiento puede inducir la IR sobre la MLT de RON. Cuando se realizó un segundo ensayo en el mismo contexto pero sin objetos o cuando los objetos presentados en el segundo ensayo fueron familiares (Figura 13), no se vio afectado el proceso de consolidación de la memoria de los objetos explorados en el primer ensayo. Es decir que en este caso, la IR no tiene lugar cuando la traza interferente es familiar, probablemente debido a que la MLT del Obj2 ya se consolidó en un procedimiento de familiarización previo y al ser así ya no es capaz de generar IR sobre la MLT de la primera sesión. Hasta aquí evaluamos variaciones del segundo ensayo en las cuales el contexto utilizado era el mismo que el utilizado en el primero. Pero, ¿es posible generar esta interferencia utilizando una segunda exploración en un contexto distinto al primero?

Como vimos en el capítulo anterior, la IR sobre la formación de la MLT de RON no se observa cuando diferentes escenarios fueron combinados con diferentes objetos en los dos ensayos del entrenamiento (figura 5). En este capítulo añadimos que si el ensayo interpuesto se produce en un escenario diferente, sin importar si este era novedoso o familiar para las ratas o incluso sino contenía objetos novedosos o familiares, la IR no es observada. Creemos que los diferentes contextos utilizados en

los dos ensayos contribuyen a la formación de la memoria de la identidad del Obj presentado en cada ensayo. En concordancia con esto, Hardt y col., (2013) postulan que cuando la neocorteza está involucrada, una manera de minimizar la confusión entre recuerdos similares es mediante la vinculación de los contenidos de una memoria episódica específica a su CTX espacio-temporal único. Es decir que el CTX ayuda a formar la memoria de los objetos vistos allí. Entonces, a nivel celular, ¿por qué la presencia de una arena diferente evita la IR sobre la MLT de RON? Nosotros pensamos que es porque cada uno de los contextos activa mayoritariamente a subpoblaciones diferentes de neuronas, mientras que el mismo CTX activa mayoritariamente a la misma población neuronal. Este razonamiento está basado en los trabajos de Guzowski et al. (1999) que describen tal escenario de activación neuronal. Entonces, resulta plausible que si las ratas exploran diferentes objetos dentro de un mismo CTX, una competencia por la consolidación de la memoria de ambos objetos tenga lugar en el Hp y en las regiones con las que esta estructura se conecte.

Además de describir el proceso de IR en la formación de MLT de RON, en este capítulo también mostramos que tanto la expresión de la MCT como la expresión de la MLT son impedidas cuando un ensayo diferente se experimenta 30 minutos antes de la sesión de testeo (Figura 12). Creemos que el proceso neural asociado al ensayo que induce la interferencia involucra la activación de diferentes regiones del cerebro y el uso de varios recursos que también se requieren para la expresión de la memoria relacionada con el Obj. Entonces, cuando estos recursos no están disponibles en el momento de la evocación, la expresión de la traza de memoria se deteriora. Por

ejemplo, el Hp podría ser una de las estructuras cerebrales implicadas en este fenómeno, dado que se ha demostrado que participa tanto en la consolidación como en la evocación de la memoria de RON (Rossato et al., 2007b; Cohen et al., 2013).

Finalmente quisimos evaluar que sustratos neuronales estarían involucrados en el procesamiento de la MLT de RON. La intención final de esta parte del trabajo fue evaluar si la IR podría ser explicada como consecuencia de la utilización y competencia de recursos o de la actividad cerebral en estas áreas. Nuestros resultados sugieren que se requiere la activación de la CA1 del Hp dorsal para la formación de la MLT de RON testeada 24 horas luego de su formación (Figura 15). Otros autores también han encontrado que la infusión de muscimol o lidocaína en el Hp dorsal de roedores en las diferentes etapas de una tarea de RON impide la formación de la memoria no espacial de objetos (Hammond, 2004; de Lima et al., 2006; Cohen et al., 2013). Sin embargo, existen otros reportes que muestran que el Hp no participa e incluso contradicen los resultados a los mencionados anteriormente (Oliveira et al., 2010; Kim et al., 2014). No obstante, el bloqueo de factores de transcripción específicos o tratamientos con inhibidores de la síntesis proteica en el Hp dorsal durante una determinada ventana temporal posterior al entrenamiento dio lugar a deficiencias en la MLT de RON (Rossato et al., 2007b; Zalzman et al., 2015). Además, extensas lesiones en el Hp realizadas varios días después de la sesión de entrenamiento afectan negativamente la expresión de la MLT de RON (Gaskin et al., 2003; Mumby et al., 2005; O'Brien et al., 2006). Como se detalló, a pesar de que hay bibliografía contradictoria sobre el rol del Hp en la formación de RON, muchos son los resultados que avalan su participación.

Nuestros resultados también sugieren que se requiere la activación de la CPFm para formar la MLT de RON (figura 16). Rossato y col. (2013) demostraron que se requiere la activación simultánea de receptores D1 dopaminérgicos en la CPFm y en la amígdala para consolidar la MLT de RON. Además, la infusión de un inhibidor de la síntesis proteica en la corteza prefrontal ventral interrumpe la MLT de RON sin alterar su MCT (Akirav et al., 2006). Estos resultados se suman a otros que muestran el papel del CPFm en tareas de ROC, de posición de objetos y de reconocimiento de orden temporal de objetos (Morici et al., 2015; Warburton y Brown, 2015), destacando la participación de esta región del cerebro en las tareas de reconocimiento.

Hemos demostrado que el Hp dorsal y la CPFm están involucrados en la formación de las MLT de RON y ROC (Figuras 8, 9, 15 y 16). Por otra parte, hemos demostrado que cuando estas regiones fueron inactivadas de forma local mediante el uso de muscimol antes del segundo ensayo durante la sesión de entrenamiento, la MLT del Obj2 estaba ausente el día siguiente mientras que la MLT del Obj1 se encontraba intacta (figura 15 y 16). Estos resultados están de acuerdo con la idea de que ambas regiones están involucradas a la formación de la MLT de RON y, si un procesamiento se encuentra en curso en estas regiones, un requerimiento de actividad adicional de ellas podría poner en peligro la consolidación de la traza. Sin embargo, ¿Es qué estas estructuras están interactuando o actúan de manera independiente? Hasta ahora esta pregunta no ha sido resuelta, pero teniendo en cuenta el reciente descubrimiento de una proyección monosináptica desde la corteza prefrontal al Hp en ratones, es probable que estas regiones estén involucradas en un mismo circuito. Por lo tanto, es plausible pensar que la CPFm podría ejercer control

top - down sobre el Hp en el procesamiento de la memoria RON como ocurre en el caso de una memoria de miedo contextual (Rajasehupathy et al., 2015).

Como ya se discutió anteriormente, los experimentos con muscimol permiten inactivar transitoriamente alguna estructura cerebral. Tanto para el caso de la MLT de ROC como de RON, esto evitó la IR y pensamos que ello se debe a que se deja sin efecto la competencia por la actividad del área. No obstante, ¿qué mecanismo molecular podría explicar tal efecto? Una amplia serie de reportes sugieren fuertemente que la formación de MLT depende de la síntesis de proteínas relacionadas con la plasticidad (PRP) que serán utilizados en sustratos específicos (etiquetas inducidas por las experiencias de aprendizaje) con el fin de establecer la traza de la memoria (Moncada et al., 2015). Por lo tanto, creemos que un evento molecular plausible sería la competencia por las PRPs inducidas para la formación de la MLT del Obj1 y el Obj2. En este sentido, nuestro laboratorio ha informado anteriormente la existencia de competencia por la utilización de la proteína asociada al citoesqueleto y regulada por actividad (ARC), como la causa de IR en otros paradigmas dependientes del Hp (Martínez et al., 2012). Aunque no fue demostrado experimentalmente en esta tesis, el mismo razonamiento podría postularse como causa de la IR en la formación de memoria de RON que se muestra aquí. Incluso la explicación puede aplicarse también a la IR observada en la expresión de MLT, debido a que resultados recientes sugieren que la evocación de la memoria también depende de la síntesis de proteínas (Lopez et al., 2015). Además, el hecho de que la formación de la MCT no fuese vulnerable a la IR está de acuerdo con este mecanismo, ya que ha sido ampliamente postulado que la MCT es independiente de la síntesis proteica (Davis y Squire, 1984; Igaz et al., 2002;

Motanis y Maroun, 2012; Gould et al., 2014), en consecuencia, no se vería afectada por la competencia por los PRPs.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que tanto la consolidación de la memoria RON como su expresión son susceptibles de ser interferidas por la exploración de un nuevo par de objetos presentes en el mismo CTX y que el Hp dorsal y la CPFm son dos de las regiones del cerebro implicadas en este fenómeno.

Lo presentado hasta aquí puso de manifiesto como la presencia de un segundo aprendizaje puede interferir con la formación de la MLT de un aprendizaje previo. En el próximo capítulo, nos proponemos evaluar tareas en las cuales el segundo aprendizaje en lugar de interferir con la memoria del primero, permita su promoción. A pesar de tratarse de dos resultados antagónicos, creemos que los mecanismos celulares que permiten explicarlos son similares. Ambos procesos, los de interferencia como los de promoción, pueden ser discutidos y analizados bajo la óptica de la hipótesis del etiquetado conductual (behavioral tagging en inglés, BT).

Resultados - Capítulo III.

¿Cómo podemos promocionar la memoria?

En los capítulos anteriores realizamos protocolos de interferencia, en los cuales la formación de una MLT para ROC o para RON es impedida al recibir un nuevo aprendizaje. Este nuevo aprendizaje es disruptivo sobre la MLT que se está formando, si ocurre en una ventana temporal próxima a él y si contiene información sobre otros contextos y otros objetos. Nuestros resultados sugieren que la utilización de regiones cerebrales comunes, en la formación de las MLT de experiencias que los animales reciben de modo secuencial, sería un factor limitante. Ello podría deberse a que ambas experiencias requieran de la actividad o de los recursos disponibles en dichas regiones y al competir por ellos una de las MLT se perjudica en beneficio de la otra.

Continuando con esta línea de pensamiento, nos propusimos abordar la contracara de este fenómeno e investigar la situación en la cual una traza débil de memoria podría beneficiarse por un segundo aprendizaje. Antecedentes de nuestro grupo muestran que una segunda experiencia puede promocionar la formación de la MLT de una tarea débil al proveerle las proteínas de plasticidad (PRPs) necesarias para su consolidación. En este caso, también existen requerimientos respecto del curso temporal en el que se experimenta la tarea asociada y se observó que ella debe ser fuerte (inducir PRPs), novedosa y compartir regiones cerebrales de procesamiento respecto de la tarea débil (Ballarini et al., 2009; Martínez et al., 2012). De este modo, en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se demostró que era posible promover la formación de una MLT a partir de entrenamientos débiles incapaces de

generarla por si mismos (Moncada y Viola, 2007; Ballarini et al., 2009; Moncada et al., 2011). Utilizando memorias aversivas, como son el evitamiento inhibitorio y el condicionamiento por miedo al CTX, ambas tareas Hp dependientes, se demostró que es posible generar una MLT utilizando protocolos suaves que sólo generan MCT, si se presenta dentro una ventana temporal determinada un CA novedoso. También se demostró que era posible inducir una MLT mediante una novedad, en una tarea corteza insular dependiente e hipocampo independiente, como es el condicionamiento aversivo al gusto. Sin embargo en este caso, la asociación con un CA no fue exitosa, y fue necesario utilizar una experiencia que fuera también procesada en la corteza insular, como es el consumo de un sabor novedoso (Ballarini et al., 2009). El proceso de promoción de la MLT de la tarea débil requirió de la síntesis de PRPs inducida por la tarea fuerte asociada ya que en todos los casos se observó que bloqueando la traducción proteica el fenómeno desaparece (Moncada y col, 2007; Ballarini y col 2009).

Estas observaciones concuerdan con la idea de que para formar una MLT se requiere del aporte de PRPs. Se conoce que un entrenamiento fuerte induce PRPs que son requeridas para la formación de MLT (Schafe et al., 1999; McGaugh, 2000; Quevedo et al., 2004; Costa-Mattioli y Sonenberg, 2008). Sin embargo, el hallazgo original consistió en demostrar que un entrenamiento débil puede utilizar proteínas inducidas a raíz de una experiencia asociada. Este proceso fue denominado Etiquetado conductual (Behavioral tagging en inglés: BT) y pone en manifiesto la importancia del marcado de los sitios dónde las PRPs son utilizadas. Se postula que el entrenamiento débil etiqueta sitios específicos para la formación de su MLT y allí se utilizan las PRPs

que estén disponibles en el lugar y en el momento indicado (Viola et al., 2014; Moncada et al., 2015). La hipótesis del BT, predice que habrá una interacción entre las etiquetas y PRPs que coexistan espacial y temporalmente (Viola et al., 2014; Moncada et al., 2015). Este marco teórico permite estudiar y explicar fenómenos de promoción de memorias (un aprendizaje que indujo etiqueta pero no PRPs utiliza las PRPs provenientes de otra experiencia), tanto como fenómenos de interferencia (donde las PRPs inducidas por una experiencia son desviadas y utilizadas por etiquetas inducidas por otro evento). En los últimos años se reportan antecedentes de ambos casos, provenientes de nuestro laboratorio y de otros grupos de investigación (Moncada y Viola, 2007; Ballarini et al., 2009, 2013; Wang et al., 2010; Redondo y Morris, 2011; Lu et al., 2011; Moncada et al., 2011; Almaguer-Melian et al., 2012; Dong et al., 2012; Martínez et al., 2012; Cassini et al., 2013; de Carvalho Myskiw et al., 2013; Salvetti et al., 2014; Viola et al., 2014). Considerando estos antecedentes, en el presente capítulo estudiamos si se puede promocionar la formación de la MLT de una experiencia por la repetición de dos ensayos débiles de la misma tarea. A diferencia de los capítulos anteriores, el protocolo que utilizamos aquí evita cualquier situación de competencia entre memorias, debido a que el animal es entrenado dos veces en la misma tarea. Nuestra hipótesis de trabajo postula que un único ensayo de aprendizaje de características débiles no es suficiente para formar una MLT debido a que no es capaz de inducir la síntesis de ciertas proteínas de plasticidad (PRPs) que son necesarias para el establecimiento de la traza. Un segundo ensayo de entrenamiento experimentado en una ventana temporal adecuada contribuirá a la consolidación de la memoria ya que posibilitará la síntesis de las PRPs necesarias.

Postulamos que al re-entrenar a los animales en una misma tarea, se marcarán mayoritariamente los contactos neurales que fueron estimulados en el ensayo previo y que los mecanismos intracelulares gatillados por ambos ensayos podrían sumarse o sinergizarse alcanzando el umbral para la síntesis de proteínas requerida para la consolidación de la traza. Debido a que los procesos de marcado y síntesis/degradación de PRP presentan cinéticas características, postulamos que debe existir una ventana temporal dentro de la cual resulte efectivo el protocolo de re-entrenamiento.

En este trabajo de tesis doctoral utilizamos paradigmas de aprendizaje y memoria basados en la exploración espontánea de los animales hacia objetos. En particular en este capítulo realizamos entrenamientos débiles en la tarea de REO. Antecedentes del grupo demostraron que es posible promocionar una memoria episódica como la de REO mediante la presencia de una CA en tiempos cercanos al entrenamiento (Ballarini y col, 2009).

Al igual que ocurre con las tareas utilizadas en los capítulos I y II, el REO se basa en la tendencia natural de los animales a explorar objetos o lugares que les resultan novedosos (Ennaceur y Delacour, 1988). Al presentársele al animal un par de objetos idénticos en un CTX familiar con claves espaciales, se propicia la formación de una memoria tanto de los objetos como de la ubicación dónde estos se encuentran dentro de este medioambiente espacial, información que es procesada en la formación hipocampal (Clark y Martin, 2005; Dere et al., 2005; Lima et al., 2009; Clarke et al., 2010). Luego, en la sesión de testeo, mientras que uno de los objetos se ubica en la misma posición el otro es desplazado a una posición diferente a la del entrenamiento

y por lo tanto novedosa. Si el animal es capaz de advertir este cambio pasará más tiempo explorando el Obj en la posición novedosa con respecto al que se encuentra en la posición familiar.

El primer paso fue realizar un protocolo de la tarea de REO de manera tal que un solo entrenamiento genere MCT y falle en inducir una MLT.

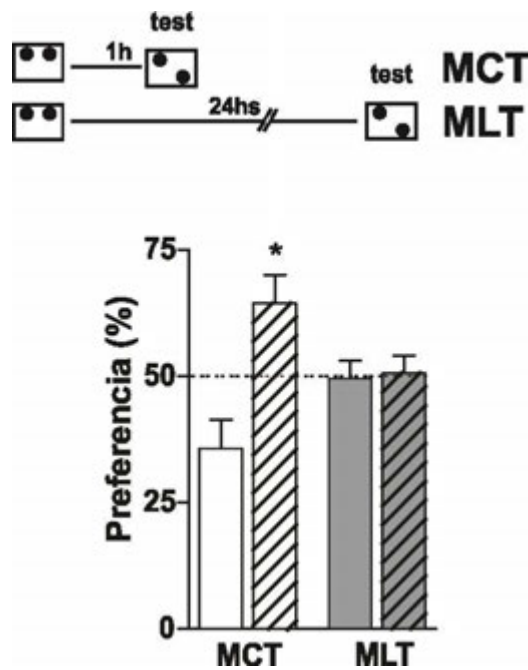


Figura 17) Protocolo débil de REO induce MCT pero no MLT.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental de ratas. Las barras rayadas representan al Obj en la posición novedosa y las lisas el Obj en la posición familiar. Grupos de animales independientes fueron entrenados con un ensayo de REO se evaluó su MCT, 1h post entrenamiento o su MLT 24hs luego del entrenamiento. * $p < 0.05$ vs. la posición familiar, Test de T pareado.

Como se observa en la figura 17, luego de un entrenamiento débil de REO se observa MCT, dado que cuando los animales son testeados a la hora del entrenamiento pasan más tiempos explorando el Obj en la posición novedosa con

respecto al que se encuentra en la posición familiar ($t_{(7)}=2.532$ $p=0,0391$). Mientras que al evaluar la memoria a las 24hs de la sesión de entrenamiento, no se observa MLT dado que ambos objetos son explorados de forma similar (dejando el porcentaje de preferencia cercano al 50%) aun cuando uno ha cambiado su ubicación ($t_{(6)}=0.1494$, $p=0,8861$).

Nuestro siguiente experimento consistió en realizar sesiones de re-entrenamiento a la tarea REO débil para estudiar si se podía promocionar la formación de MLT de REO y cuál era el curso temporal crítico para lograr dicho efecto. En este caso los animales fueron expuestos a dos ensayos durante la sesión de entrenamiento, separados entre sí por diferentes iti (30min, 1h, 4hs y 7hs), un grupo entrenado con una solo ensayo fue utilizado como grupo control.

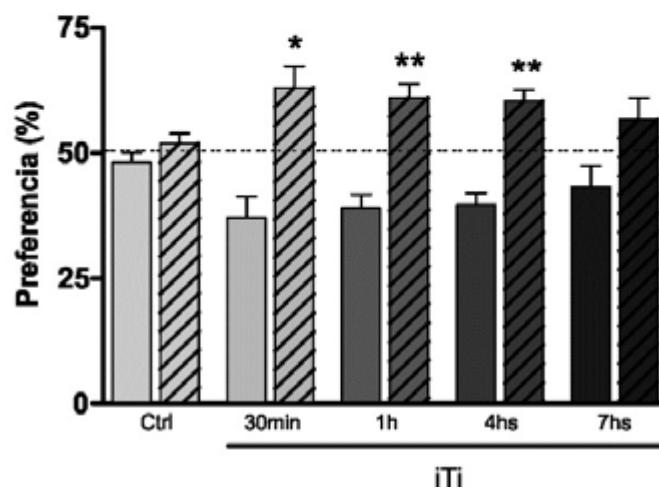
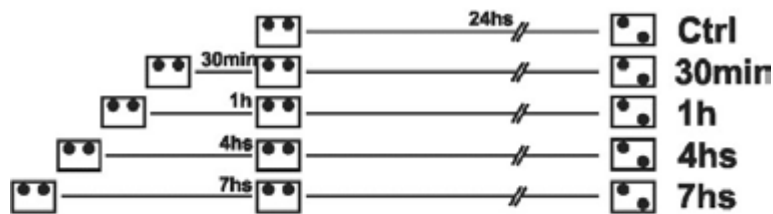


Figura 18) Ventana temporal de promoción por re-entrenamiento de REO débil.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al objeto en la posición novedosa y las lisas el objeto en la posición familiar. Se evaluó la MLT a las 24 hs de la sesión de entrenamiento de REO, en grupos independientes de animales. El grupo control (Ctrl) fue sometido a un único ensayo y los demás grupos a dos ensayos separados entre sí por 30min, 1h, 4hs o 7hs. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. la posición familiar, Test de T pareado.

En la Figura 18 se observa que las ratas del grupo control entrenadas con un solo ensayo, exploraron ambos objetos de manera similar (no hubo discriminación entre posición novedosa y familiar ($t(23)=0.95$, $p=0,353$), sin embargo cuando los animales recibieron un segundo ensayo 30min, 1h o 4hs después del primero, muestran al momento del testeo preferencia por el Obj que se encuentra en la posición novedosa (Grupo 30min $t_{(10)}=3,00$, $p=0,013$; Grupo 1h $t_{(15)}=4.011$, $p=0,001$; Grupo 4hs $t_{(7)}=3,82$, $p=0,007$). Si este intervalo se extiende a 7hs, nuevamente no observamos la MLT dado que al igual que en el caso control, estos animales no muestran preferencia por ninguna posición ($t_{(9)}=1.575$ $p=0,1498$).

Estos resultados nos sugieren que es posible generar una MLT con un protocolo de REO débil, si los dos ensayos se separan con un iti de hasta 4 horas. A continuación nos interesó evaluar si la promoción en la formación de MLT de REO requiere de la síntesis de PRPs inducida por ambos ensayos experimentados en la ventana temporal crítica. Para ello decidimos bloquear la traducción proteica en la región dorsal del Hp de las ratas, debido a que está reportado que el procesamiento de esta tarea involucra a dicha región cerebral (Clark y Martin, 2005; Dere et al., 2005; Lima et al., 2009; Clarke et al., 2010). Los animales fueron canulados en la región CA1 del Hp dorsal y luego de su recuperación fueron entrenados en un protocolo de re-

entrenamiento de REO con un iti de 1h, e inmediatamente después del segundo ensayo, se les infundió anisomicina (Ani), un conocido inhibidor de la síntesis proteica. En la figura 19 se puede observar el efecto amnésico provocado por la infusión intrahipocampal de Ani (Ani 0,8 μ l x lado de 80 μ g/ μ l; $t_{(10)}$ =0.1377, p =0,8932). En contraste, el grupo de animales infundidos con solución vehículo formaron MLT de REO (Grupo Veh $t_{(10)}$ =4.653, p =0,0009). Se realizó un grupo control con animales sujetos a un único ensayo y que recibieron la infusión del vehículo a la hora y cuatro minutos del ensayo. Como era esperado, en esta condición tampoco se observa MLT (Grupo Ctrl $t_{(7)}$ =0.006, p = 0,9956).

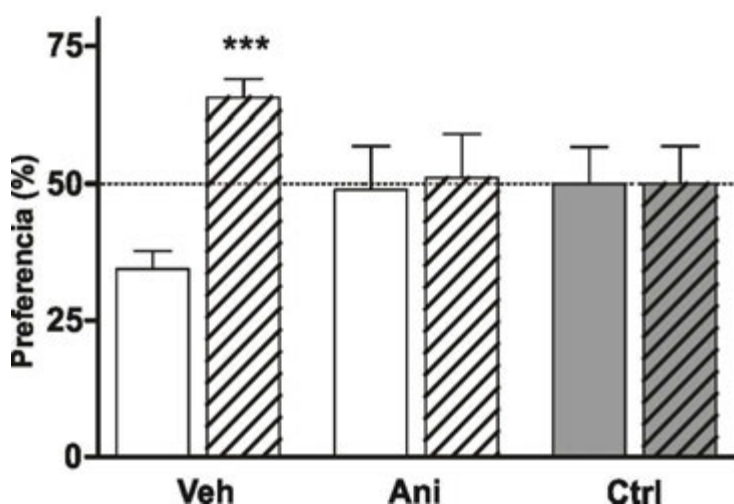
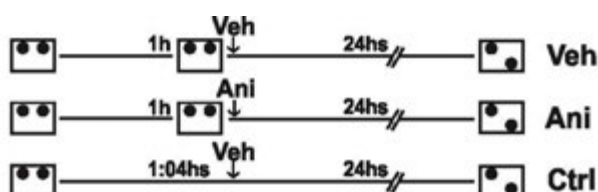


Figura 19) La promoción de la MLT por re-entrenamiento de REO es dependiente de la síntesis proteica.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM). Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj en la posición novedosa y las lisas el Obj en la posición familiar. Se evaluó la MLT a las 24hs de ser entrenados con un ensayo de REO, grupo control (Ctrl), o dos ensayos separados entre sí 1h, inyectados en la CA1 del Hp Dorsal inmediatamente luego del segundo ensayo con anisomicina (Ani) ó Vehículo (Veh). Se utilizaron grupos de animales independientes. *** $p < 0.001$ vs. la posición familiar, Test de T pareado.

La figura anterior demuestra que es necesaria la síntesis proteica luego del segundo ensayo para la formación de la MLT de REO en este protocolo de re-entrenamiento, puesto que el bloqueo con anisomicina impide la formación de la misma.

En los capítulos previos mostramos que la activación del Hp es importante para formar memorias de objetos en CTX o de objetos. Decidimos estudiar dicho requerimiento para la formación de la MLT de REO en un protocolo de re-entrenamiento de dos ensayos débiles de REO. Resultados previos del laboratorio de la Dra. Cynthia Kathe demostraron que al infundir muscimol luego de un entrenamiento fuerte de REO (que induce MLT), se impide la formación de la MLT (comunicación personal). Decidimos estudiar los efectos de este agonista de los receptores GABA_A, al ser infundido en la región CA1 del hipocampo dorsal inmediatamente luego del segundo ensayo. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 20, cuando la solución vehículo es infundida luego del segundo ensayo de REO, se expresa MLT (Grupo Veh $t_{(6)}=3.05$, $p=0,022$); pero cuando se infundió muscimol (0,5 μ l x lado de 0,2 μ g/ μ l) los animales no mostraron preferencia alguna por los objetos de la posición novedosa o familiar (Grupo Mus $t_{(6)}=0,15$, $p=0,885$).

Como era de esperar el grupo que sólo tuvo un ensayo en el entrenamiento no expresa MLT (Ctrl $t_{(9)}=0.19$, $p=0,853$).

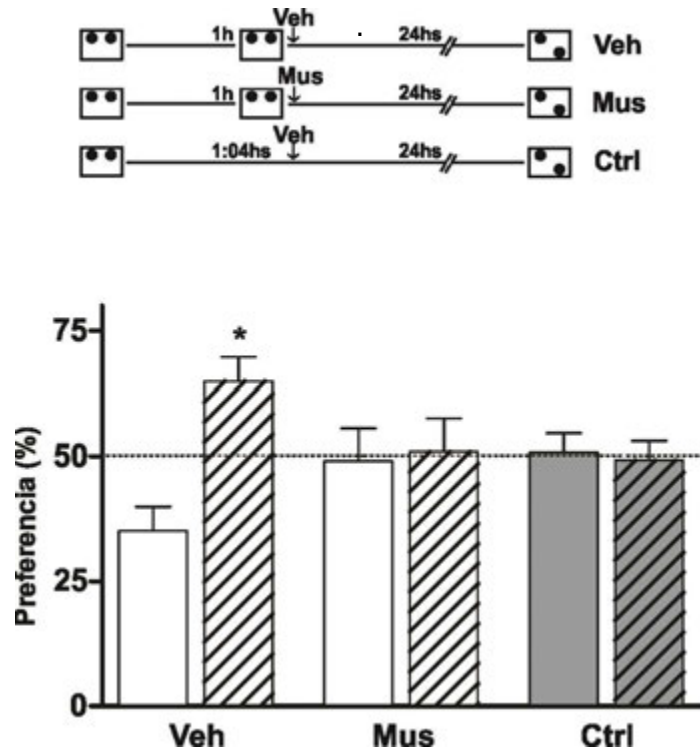


Figura 20) La promoción de la MLT por re-entrenamiento de REO es dependiente de la actividad hipocampal.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM). Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj en la posición novedosa y las lisas el Obj en la posición familiar. Se evaluó la MLT a las 24hs de ser entrenados en grupos independientes de animales entrenados con un ensayo de REO, grupo control (Ctrl), o dos ensayos separados entre sí 1h, inyectados en la CA1 del Hp Dorsal inmediatamente luego del segundo ensayo con Muscimol (Mus) ó Vehículo (Veh) * $p<0.005$ vs. la posición familiar, Test de T pareado.

Por lo presentado hasta el momento podemos concluir que para la formación de una MLT utilizando un protocolo de re-entrenamiento de REO, es necesario que el intervalo entre ensayos sea de hasta 4 hs. Además es necesaria la actividad y síntesis

proteica en el hp, área del cerebro fuertemente involucrada con el procesamiento de esta memoria, luego del segundo ensayo para que la estabilización de esta memoria ocurra y la MLT se forme.

En los capítulos anteriores, hemos analizado cuáles son los factores que forman parte de la experiencia que interfiere y que son importantes para el efecto deletéreo sobre la formación de la MLT. Aquí también nos propusimos estudiar si otros factores experimentados una hora luego del entrenamiento débil de REO, eran efectivos en la promoción de la MLT de REO. Elegimos para ello tareas que involucran al Hp dorsal en su procesado, como la novedad espacial o el estrés (Moncada y Viola, 2006; Cazakoff et al., 2010).

Resultados previos de nuestro laboratorio publicados en el 2009 (Ballarini et al., 2009) se resumen en la figura 21 y son incorporados en esta tesis a modo de comparación con otras tareas utilizadas como segundo ensayo. En la figura podemos observar que es posible promocionar la memoria de REO de un entrenamiento débil si 1 hora luego del mismo se expone a los animales a un CA novedoso (Grupo Ctrl $t_{(8)}= 2.113$, $p= 0,0676$; Grupo CA $t_{(6)}= 3.204$, $p= 0,0185$, figura 21). Esta promoción de la MLT de REO es dependiente de la síntesis proteica gatillada por la exposición al campo abierto, dado que cuando se infunde Ani en el Hp inmediatamente después a la exploración al mismo la MLT no es observada (Grupo Ani $t_{(7)}= 0,3362$, $p=0,7466$ figura 21). En esta experiencia en particular el intervalo utilizado entre el entrenamiento de REO y la exposición al CA fue de sólo 15 min, pero como puede observarse en el grupo Veh, esta distancia temporal es efectiva para promocionar la memoria de REO (Grupo Veh $t_{(7)}= 3.440$, $p= 0,0108$).

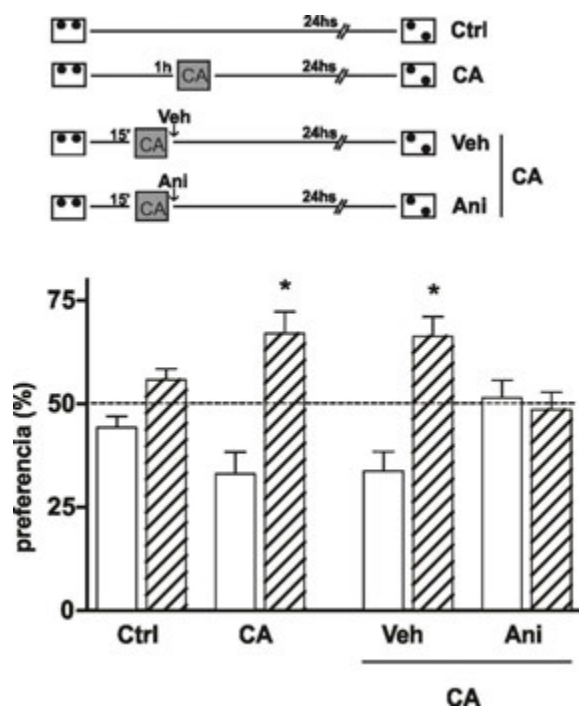


Figura 21) La exposición a un CA promueve la formación de la MLT de un entrenamiento débil de REO. Esta promoción es dependiente de la síntesis de proteínas generada por el CA.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM). Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj en la posición novedosa y las lisas el Obj en la posición familiar. Se evaluó la MLT a las 24hs de ser entrenados en grupos independientes de animales entrenados con un ensayo de REO, grupo control (Ctrl) solo fue entrenado con un ensayo de REO, el grupo campo abierto (CA) fue expuesto a un CA 1h luego del entrenamiento de REO. Los animales en los grupos Vehículo (Veh) y anisomisina (Ani) fueron entrenados con un ensayo de REO y 15 min luego expuestos a un CA recibiendo una infusión en la CA1 del Hp dorsal de Veh o Ani inmediatamente después de este. * $p < 0.005$ vs. la posición familiar, Test de T pareado. Adaptación de los resultados presentados por Ballarini et al. 2009.

Por otra parte, un considerable número de investigaciones han demostrado que la exposición a estrés genera complejos efectos sobre la cognición. El efecto específico del estrés depende de varios factores, que incluyen el tipo de tarea cognitiva empleada, el tipo específico de estresor, el tiempo al que el estresor es

experimentado, su duración, la naturaleza de la tarea a realizar, la valencia de los estímulos evaluados, y las características del sujeto, tales como el sexo y la edad (Joëls et al., 2006; Shors, 2006; Diamond et al., 2007; Sandi y Pinelo-Nava, 2007; Wolf, 2008). Nosotros nos preguntamos si el factor estrés puede ayudar a formar memorias débiles y consolidarlas a MLT.

Para esta parte del estudio, debimos realizar algunas modificaciones a nuestro protocolo experimental utilizado hasta el momento, basándonos en los resultados obtenidos por Maroun y Akirav (2008), donde se observó que la promoción de una memoria de REO por estrés sólo era posible cuando no se habituaba a los animales al CTX donde se realizó el entrenamiento, sugiriendo que el nivel de saliencia o el estrés experimentado por el animal durante el entrenamiento son factores importantes en la determinación de si el estrés mejorará o pondrá en peligro la consolidación de la memoria. Es por todo esto que, para esta parte del trabajo los animales no fueron habituados previamente a la sesión de entrenamiento; además, para garantizar que los tiempos de exploración de los objetos fuesen similares a los utilizados hasta el momento, se le sumo un minuto adicional al entrenamiento, siendo el mismo ahora de 5 min. Una hora luego del ensayo de entrenamiento los animales fueron puestos en una plataforma elevada intensamente iluminada durante 30 min, modelo de estrés agudo que elegimos, dado que se sabe aumenta los niveles plasmáticos de corticosterona un 38% con respecto a ratas naives (Kavushansky and Richter-Levin, 2006).

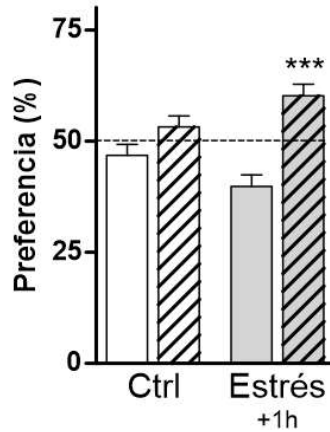
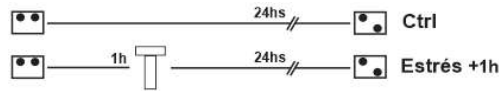


Figura 22) Un evento estresante 1h luego de la sesión de entrenamiento es capaz de promover la MLT de un entrenamiento débil de REO.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj en la posición novedosa y las lisas el Obj en la posición familiar. Se evaluó la MLT a las 24hs de ser entrenados con un ensayo de REO, grupo control (Ctrl), o con estrés (30 min sobre una plataforma elevada) 1h luego del entrenamiento, (estrés +1h). Grupos independientes de animales fueron utilizados. *** $p < 0.001$ vs. la posición familiar, Test de T pareado.

Como se observa en la figura 22, al utilizar el nuevo protocolo experimental de REO, sin habituación y con un ensayo de entrenamiento de 5 minutos, al momento del testeo, 24hs luego del mismo, el grupo control no muestra MLT ya que ambas posiciones son igualmente exploradas (Grupo Ctrl $t_{(22)}=1.294$, $p=0,209$). Sin embargo el grupo de animales que fue expuesto a estrés una hora luego del entrenamiento muestra MLT dado que se observa preferencia por el Obj en la posición novedosa (Grupo Estrés +1h $t_{(20)}=3.941$ $p=0,0008$).

Nuestra propuesta es que el estrés induce la síntesis proteica en regiones como el Hp, que ya sabemos está involucrada en procesar esta memoria. Para poner a prueba esta hipótesis, canulamos animales y los expusimos al mismo protocolo experimental del punto anterior pero esta vez, 15 min antes del evento estresor, se infundió Ani en la CA1 del Hp dorsal. Los resultados obtenidos se observan en la figura 23. Los animales expuestos sólo al entrenamiento débil de REO no presentan MLT (Grupo Ctrl $t_{(13)}=0.55$, $p=0,594$), mientras que en aquellos animales que luego del ensayo de REO se los expuso al estrés, mostraron MLT cuando se infundio Vehículo (Grupo Veh $t_{(12)}=3.861$, $p=0,002$), mientras que aquellos que fueron infundidos con Ani no presentan preferencia por la posición novedosa (Grupo Ani $t_{(11)}=0,41$, $p=0,689$). Este resultado nos permite sugerir que el estrés gatillaría la síntesis proteica necesaria en el Hp para la formación de la MLT de REO.

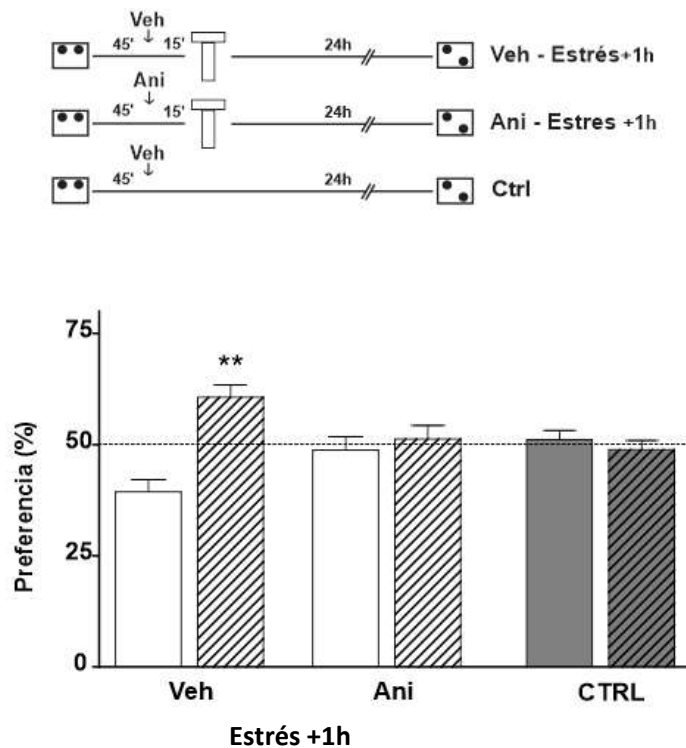


Figura 23) La promoción de la MLT de REO es dependiente de la síntesis de proteínas generada por el estrés.

Representación esquemática del protocolo experimental en la parte superior. Se muestra la media del porcentaje de preferencia (\pm SEM) en la exploración de los objetos. Cada par de barras corresponde a la exploración durante la sesión de testeo de un grupo experimental. Las barras rayadas representan al Obj en la posición novedosa y las lisas el Obj en la posición familiar. Se evaluó la MLT a las 24hs del entrenamiento. Grupos independientes de animales fueron entrenados con un ensayo de REO y 45 min más tarde infundidos con solución Veh, grupo control (Ctrl), o entrenados con un ensayo de REO y una hora más tarde sometidos a estrés, donde 15 min previos a la misma se les infundió Veh ó Ani (grupos Veh estrés +1h y Ani estrés +1h respectivamente) ** $p < 0.01$ vs. la posición familiar, Test de T pareado.

Conclusiones – Capítulo III

En este capítulo hemos estudiado diferentes modos de promocionar una MLT de un entrenamiento débil de REO. Hemos visto que cuando se somete a los animales a dos ensayos débiles sucesivos de REO es posible formar una MLT si los mismos se encuentran dentro de una determinada ventana temporal (entre 30min y 4hs). Además hemos demostrado que el segundo entrenamiento es necesario para que se active el Hp y se gatille allí la síntesis proteica requerida para la formación de la MLT. Un entrenamiento débil de REO, no sería capaz de generar la síntesis de PRPs necesaria para que su traza se estabilice y pueda expresarse su MLT, sin embargo cuando el mismo entrenamiento se repite dentro de una determinada ventana temporal, estos fenómenos ocurren.

También hemos visto que la formación de la MLT de REO, puede promocionarse por otros factores, aparte del re-entrenamiento, como son la exploración a un CA novedoso o una experiencia estresante. Estos factores funcionan, permitiendo que en el sustrato donde esta memoria es procesada (el Hp) se gatille la síntesis de PRPs requerida para consolidar la traza de REO.

Discusión – Capítulo III:

En este último capítulo nos propusimos indagar acerca del fenómeno de promoción de una MLT de reconocimiento. A diferencia de lo expuesto en los dos capítulos anteriores, en los cuales estudiamos como una traza fuerte puede ejercer interferencia una sobre otra traza fuerte, en esta parte nos propusimos estudiar diferentes estrategias para lograr que una traza débil que sólo genera MCT pueda consolidarse en una MLT, ya sea mediante la repetición de la misma, protocolo de re-entrenamiento o gracias a la presencia de un evento novedoso o estresante. Al igual que como sucede con el fenómeno de interferencia pensamos que, para poder observar la promoción de la MLT, es fundamental que la intervención conductual opere sobre sustratos neuronales compartidos con la traza mnésica de interés

En esta parte del trabajo utilizamos el paradigma de REO, el procesamiento de esta tarea es llevado a cabo, al menos en parte, por el Hp, como dan cuenta numerosos estudios en los cuales se ha bloqueado la MCT como la MLT tanto con lesiones como con manipulaciones farmacológicas en esta área (Mumby et al., 2002; Barker et al., 2007).

Del trabajo de nuestro laboratorio de 2009 (Ballarini y col., 2009) sabíamos que la exploración del CA puede promover la formación de la MLT de REO si es presenciado a entre una hora antes y las dos horas posteriores al entrenamiento débil de REO, que es sólo capaz de inducir MCT de por sí. De este mismo trabajo también concluimos que la síntesis proteica en el Hp inducida por la exploración a un CA es necesaria para que esta promoción ocurra. La explicación de este fenómeno de promoción podemos encontrarla en la hipótesis del BT, que postula que un

entrenamiento débil (el de REO en este caso) genera una etiqueta en aquellas sinapsis que activa donde se utilizarían las PRPs sintetizadas por otra experiencia (exploración a un CA novedoso), permitiendo así la estabilización de la traza mnésica en MLT.

Es sabido que la repetición de un aprendizaje mejora la retención de la memoria (Greene, 2008; Smolen et al., 2016). La MLT pueden formarse usando protocolos de entrenamiento débiles si estos son reiterados dentro de una ventana temporal apropiada. En este trabajo sometimos a los animales a dos ensayos débiles de REO y evaluamos la MLT, encontrando que un iti de hasta 4h es efectivo en promocionar la MLT pero si se extiende a 7hs ya no lo es. Es importante destacar que a diferencia de lo que ocurre con el protocolo de promoción por CA (Ballarini et al., 2009), en el caso de re-entrenamiento, cada ensayo tendría la capacidad de etiquetar los sustratos que activa, y dado que ambos ensayos son iguales, es de esperarse que mayoritariamente se marquen los mismos sustratos neuronales. Probablemente ésta sea la razón por la cual podemos encontrar promoción con intervalos temporales mayores entre los ensayos a los encontrados cuando se utiliza CA. Con el protocolo de promoción por CA, las etiquetas inducidas por el aprendizaje de REO habrían decaído a niveles tales que para cuando las PRPs inducidas por el CA estuvieran disponibles, no podrían ser utilizadas en los sitios específicos en pos de estabilizar la MLT. Mientras que cuando se realizan re-entrenamientos, los sitios son nuevamente marcados, etiquetados, por el segundo ensayo y la promoción puede obtenerse a mayores distancias temporales entre trazas. Esta distancia también posee sus límites, hecho que se pudo observar cuando los ensayos fueron separados por un intervalo de 7 horas, en esta ocasión, el protocolo de re-entrenamiento falla en generar una MLT.

Esto nos estaría hablando de que existe algún cambio provocado por el primer ensayo que debe permanecer remanente al momento de la llegada del segundo ensayo, para que éste sea capaz de sumarse o sinergizarse con los efectos que el siguiente entrenamiento induzca. Lo cierto es que el cambio generado por el primer ensayo presenta un curso temporal más acotado para el decaimiento de la marca, pero más prolongado para otros procesos que podrían contribuir a la síntesis de PRPs.

Con el objetivo de caracterizar un poco más este protocolo de promoción, utilizamos animales canulados en la CA1 del Hp dorsal y los sometimos al protocolo de re-entrenamiento administrando post segundo ensayo muscimol, agonista GABA_A, ó anisomicina, inhibidor de la síntesis proteica. Los resultados de estos experimentos expuestos en la figuras 19 y 20 nos permiten sugerir que luego del segundo ensayo de REO es necesario que se active el Hp y se gatille allí la síntesis proteica para que la MLT pueda expresarse a las 24hs. Estos resultados están en concordancia con la importancia de la región hipocampal en el procesamiento de esta tarea (Clark y Martin, 2005; Dere et al., 2005; Postma et al., 2008; Lima et al., 2009; Clarke et al., 2010). Un entrenamiento débil de REO, no sería capaz de generar la síntesis de PRPs necesaria para que su traza se estabilice y pueda expresarse su MLT, sin embargo, cuando el mismo entrenamiento se repite dentro de una determinada ventana temporal, ahora es capaz de gatillar la síntesis proteica necesaria para la producción de PRPs y formación de la MLT. Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que el entrenamiento débil genere una cantidad de PRPs insuficientes para la formación de la MLT. Estos PRPs podrían permanecer en las áreas activadas durante el primer ensayo cuando el segundo ensayo arriba. Esta segunda experiencia también

produciría PRPs subumbrales para la formación de la MLT, pero dado que ya existen remanentes de la experiencia anterior, se pueden dar efectos sumatorios y se establecen así los contactos necesarios para la formación de la MLT.

En conclusión, hemos dejado aquí planteado un modelo de formación de MLT por re-entrenamiento que consta de solamente dos ensayos, en lugar de ensayos múltiples, lo cual presenta una ventaja gracias a su simpleza a la hora de estudiar los mecanismos subyacentes. La observación que múltiples entrenamientos promocionaban MLT datan de principio del siglo pasado. Los ensayos de Ebbinghaus (1913) en humanos y el testeo de la memoria adquirida para una lista de palabras, es un ejemplo de ello. Hace una década se publicó un meta-análisis de más de trescientos estudios realizados con aprendizajes verbales en humanos, concluyendo que la retención aumenta cuando se incrementa el intervalo entre sesiones (Cepeda et al., 2006). Estas observaciones fueron también confirmadas con otros protocolos en modelos animales tan diversos como *Aplysia*, mosca, abeja, roedores y primates no humanos (Beck et al., 2000; Menzel et al., 2001; Pagani et al., 2009; Bello-Medina et al., 2013; Philips et al., 2013; Smolen et al., 2016). Luego de una centuria de experimentación en este área, se pueden sacar dos grandes conclusiones: primero que el fenómeno promnésico inducido por re-entrenamientos espaciados está evolutivamente conservado y segundo que no se conocen claramente las bases neurobiológicas de este fenómeno. Los experimentos de re-entrenamiento realizados en este capítulo permiten sugerir que el mecanismo básico de acción dependería de los procesos de marca y síntesis proteica. Hemos demostrado que la inhibición de la síntesis proteica impide el efecto del re-entrenamiento sobre la formación de MLT de

REO. Sin embargo resta demostrar que bloqueando la marca los efectos de los re-entrenamientos desaparecen.

La pregunta que queda planteada para los siguientes trabajos, es cuál o cuáles son las señales que deben encontrarse presentes al momento de llegar el segundo ensayo que hacen posible que ahora este entrenamiento débil gatille la síntesis proteica y consiga la consolidación de la traza en MLT. Un candidato tentador a jugar este rol es la actividad de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). La activación de éstas moléculas ha demostrado ser de fundamental importancia en la formación de memorias por re-entrenamiento en modelos de invertebrados (Philips et al., 2007, 2013; Pagani et al., 2009), niveles aumentados de pMAPK/MAPK al momento de la llegada del segundo ensayo parecen ser claves para el éxito de la formación de la MLT. Adicionalmente, ésta molécula está involucrada en los procesos necesarios para que ocurra el fenómeno de LTD (Navakkode, 2005; Brust et al., 2006; Mackley et al., 2015), mecanismo sináptico que estaría involucrado en la formación de memorias de reconocimiento (Goh y Manahan-Vaughan, 2013). Todos estos hechos nos llevan a pensar que la actividad de las MAPK podría ser el elemento clave en la formación de MLT por re-entrenamiento de REO, próximos estudios utilizando nuestro modelo nos permitirán dilucidar esta incógnita.

El otro mecanismo de promoción de la memoria de REO utilizado en esta tesis fue el estrés. Es ampliamente reconocido que el estrés tiene efectos sobre la memoria y el aprendizaje, sin embargo, poco preciso es lo que se sabe sobre cómo el estrés actúa sobre la memoria, existen reportes tanto de efectos dañinos como beneficiosos. Una de las principales consecuencias de la exposición a stress es la activación del eje

Hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y la liberación de hormonas glucocorticoides (cortisol en humanos, y corticosterona en la mayoría de los roedores) de la glándula adrenal así como también la liberación de otros mediadores como las catecolaminas y citoquinas. En el cerebro, estas señales moleculares activan a sus respectivos receptores resultando en una serie de cambios funcionales tales como alteraciones en la actividad sináptica, organización dendrítica, y neurogénesis (de Kloet et al., 2005; Kim et al., 2006; Howland y Wang, 2008; Holmes y Wellman, 2009).

En el presente trabajo evaluamos la capacidad del estrés de promover la MLT de una tarea de REO. Como puede observarse en la figura 22 demostramos que es posible promocionar una MLT de REO si sometemos a los animales a permanecer por 30 minutos en una plataforma elevada bien iluminada (estrés agudo) una hora luego de un entrenamiento débil de REO. Nosotros pensamos que de manera análoga al CA, el estrés actúa en el hipocampo como agente promotor, propiciando que en ésta área donde la memoria es procesada se gatille la síntesis de las PRPs que son requeridas para consolidar la traza de REO. Nuestros resultados obtenidos al administrar un inhibidor de la traducción proteica en el Hp previo al estresor, están en concordancia con esta idea.

¿Cómo el estrés induciría la síntesis proteica? Este hecho se apoya en el conocimiento de que la liberación de glucocorticoides activa receptores de mineralocorticoides (RM) y de glucocorticoides (RG) en el cerebro. Los RM y RG están ubicuamente expresados a lo largo del todo el cerebro tanto en células de la glia como en neuronas, con altos niveles en el Hp (de Kloet et al., 2005; Lupien et al., 2007). Varios estudios han demostrado que luego del entrenamiento los receptores de

glucocorticoides regulan vías de señalización intracelulares que se sabe son requeridas para la consolidación de la memoria (Chen et al., 2012). Estos incluyen las vías activadas por CREB, las MAPK, proteína quinasa dependiente de la calcio/calmodulina II (CamKII), y el Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

Actualmente estamos investigando los actores moleculares de la marca inducida por entrenamientos débiles de REO. La finalidad es luego poder inhibir por vía farmacológica su inducción o establecimiento y estudiar el efecto sobre la MLT. Si nuestra propuesta de BT es aplicable a la formación de MLT inducida por re-entrenamiento, novedad o estrés, en todos estos casos al impedir la marca del aprendizaje de REO, los efectos promotores sobre la formación de su MLT no se evidenciarán.

Discusión

Final

Discusión Final.

En este trabajo hemos visto que luego de someter a los animales a una experiencia de aprendizaje donde son expuestos a un par de Objetos novedosos dentro de un CTX familiar, se forman trazas de memoria acerca de la identidad del Obj y acerca de la contextualización de ese Obj. Estas trazas son diferenciables y tienen características propias de procesamiento.

También hemos demostrado que cuando una segunda experiencia es interpolada, es posible generar IR sobre la consolidación de la MLT de la asociación de los objetos al CTX e incluso sobre la memoria de la identidad de estos objetos. Comparando ambos procesos mnésicos, nuestros resultados sugieren que la memoria de la identidad del Obj puede ser interferida durante su fase de consolidación y de expresión. Su ventana de consolidación parece ser mayor a la de ROC y sólo es afectada por una nueva asociación muy parecida a la anterior. Es por ello que el uso de un CTX específico para cada Obj, preserva la memoria de la identidad de los objetos. En otras palabras, la MLT de RON toma su tiempo para formarse, pero es poco disruptible. Sin embargo, recordar el CTX dónde un Obj fue presentado parece ser una memoria con una ventana de consolidación menor pero con un grado de vulnerabilidad mayor, debido a que puede ser interferida por muy diversas asociaciones.

Nuestra investigación aporta al conocimiento del mecanismo para explicar por qué en algunas circunstancias los animales no pueden recordar dónde vieron un Obj particular, pero sí pueden expresar que recuerdan haber visto el Obj. Estos dos tipos

de memoria necesitan de la activación del Hp dorsal y de la región CPFm para su formación.

En contrapartida, el último capítulo aborda los mecanismos de promoción de la memoria de la localización de los Obj dentro del CTX, y para ello trabajamos con un aprendizaje débil que no induce MLT. Determinamos que es posible promocionar la MLT de ROE si la experiencia de aprendizaje es repetida dentro de una determinada ventana temporal en la sesión de entrenamiento, así como también si es asociada con la exploración a un ambiente novedoso o un evento estresante. La síntesis de proteínas en el Hp dorsal es necesaria para observar el efecto promotor.

La conclusión principal de este trabajo de tesis doctoral es que la consolidación de una traza mnésica depende del estado del sistema encargado de su procesamiento. La consolidación podría ser interferida cuando otra experiencia conductual compite por la actividad o los recursos dentro de ese sistema. Si las estructuras encargadas de procesar los aprendizajes están superpuestas, las PRPs pueden ser compartidas durante la consolidación de las memorias. Esto sucedería de existir sustratos neuronales comunes en el procesamiento de los ensayos experimentados durante los entrenamientos (y en algunos casos incluso durante la evocación). El caso antagónico ocurre cuando, la traza puede ser favorecida gracias a la segunda experiencia que provee o permite la síntesis de los recursos requeridos para la consolidación.

Nuestra hipótesis está fuertemente apoyada por un trabajo recientemente publicado (Nomoto et al., 2016) en el que se demostró, utilizando un protocolo de BT, que existe un aumento en el solapamiento de las neuronas activadas en la CA1 del Hp dorsal cuando una traza débil de RON es promocionada por la presencia de un CA.

Más aún, en este trabajo también demostraron que cuando se silencia optogenéticamente el conjunto de células involucradas en la evocación de la memoria del CTX, la expresión de la MLT de RON es suprimida. Estos resultados están en concordancia con nuestras ideas y denotan la importancia de la activación convergente de sub-poblaciones neuronales durante los ensayos de aprendizaje con el fin de que el fenómeno de BT sea posible.

La hipótesis de BT ofrece un marco conceptual amplio en el cuál la interacción entre la activación específica de sitios neuronales gatillado por las experiencias (etiquetas) y los recursos proteicos necesarios para consolidar las trazas (PRPs) pueden interaccionar positiva o negativamente, si existe convergencia temporal y espacial de las señales.

Referencias bibliográficas

- Aggleton JP, Brown MW. 2006. Interleaving brain systems for episodic and recognition memory. *Trends Cogn. Sci.* 10:455-463.
- Akirav I, Raizel H, Maroun M. 2006. Enhancement of conditioned fear extinction by infusion of the GABA A agonist muscimol into the rat prefrontal cortex and amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 23:758-764.
- Albasser MM, Amin E, Iordanova MD, Brown MW, Pearce JM, Aggleton JP. 2011. Perirhinal cortex lesions uncover subsidiary systems in the rat for the detection of novel and familiar objects. *Eur. J. Neurosci.* 34:331-342.
- Almaguer-Melian W, Bergado-Rosado J, Pavon-Fuentes N, Alberti-Amador E, Merceron-Martinez D, Frey JU. 2012. Novelty exposure overcomes foot shock-induced spatial-memory impairment by processes of synaptic-tagging in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:953-958.
- Balderas I, Moreno-Castilla P, Bermudez-Rattoni F. 2013. Dopamine D1 receptor activity modulates object recognition memory consolidation in the perirhinal cortex but not in the hippocampus. *Hippocampus* 23:873-878.
- Balderas I, Rodriguez-ortiz CJ, Salgado-Tonda P, Chavez-hurtado J, Mcgaugh JL, Bermudez-rattoni F. 2008. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learn. Mem.* 15:618-624.
- Ballarini F, Martinez MC, Diaz Perez M, Moncada D, Viola H. 2013. Memory in Elementary School Children Is Improved by an Unrelated Novel Experience. *PLoS One* 8:e66875.
- Ballarini F, Moncada D, Martinez MC, Alen N, Viola H. 2009. Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:14599-14604.
- Banks PJ, Bashir ZI, Brown MW. 2012. Recognition memory and synaptic plasticity in the perirhinal and prefrontal cortices. *Hippocampus* 22:2012-2031.
- Barbosa FF, de Oliveira Pontes IM, Ribeiro S, Ribeiro AM, Silva RH. 2012. Differential roles of the dorsal hippocampal regions in the acquisition of spatial and temporal aspects of episodic-like memory. *Behav. Brain Res.* 232:269-277.
- Barbosa FF, Santos JR, Meurer YSR, Macêdo PT, Ferreira LMS, Pontes IMO, Ribeiro AM, Silva RH. 2013. Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. *Front. Behav. Neurosci.* 7:112.
- Barker GRI, Bird F, Alexander V, Warburton EC. 2007. Recognition Memory for Objects, Place, and Temporal Order: A Disconnection Analysis of the Role of the Medial Prefrontal Cortex and Perirhinal Cortex. *J. Neurosci.* 27:2948-2957.

- Barker GRI, Warburton EC. 2011. When Is the Hippocampus Involved in Recognition Memory? *J. Neurosci.* 31:10721-10731.
- Barker GRI, Warburton EC. 2013. Object-in-Place Associative Recognition Memory Depends on Glutamate Receptor Neurotransmission Within Two Defined Hippocampal-Cortical Circuits: A Critical Role for AMPA and NMDA Receptors in the Hippocampus, Perirhinal, and Prefrontal Cortices. *Cereb. Cortex* 25:472-481.
- Bear M, Malenka R. 1994. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4:389-99.
- Beck CD, Schroeder B, Davis RL. 2000. Learning performance of normal and mutant *Drosophila* after repeated conditioning trials with discrete stimuli. *J. Neurosci.* 20:2944-2953.
- Bekinschtein P, Katzev C, Slipczuk L, Gonzalez C, Dorman G, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. 2010. Persistence of long-term memory storage: New insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. *Neurotox. Res.* 18:377-385.
- Bello-Medina PC, Sanchez-Carrasco L, Gonzalez-Ornelas NR, Jeffery KJ, Ramirez-Amaya V. 2013. Differential effects of spaced vs. massed training in long-term object-identity and object-location recognition memory. *Behav. Brain Res.* 250:102-113.
- Bliss T V, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bliss T V, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232:331-56.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:14515-20.
- Brown MW, Aggleton JP. 2001. Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat. Rev. Neurosci.* 2:51-61.
- Brust TB, Cayabyab FS, Zhou N, MacVicar BA. 2006. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Contributes to Adenosine A1 Receptor-Mediated Synaptic Depression in Area CA1 of the Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* 26:12427-12438.
- de Carvalho Myskiw J, Benetti F, Izquierdo I. 2013. Behavioral tagging of extinction learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:1071-6.
- de Carvalho Myskiw J, Furini CRG, Benetti F, Izquierdo I. 2014. Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:4572-4577.

- Cassini LF, Sierra RO, Haubrich J, Crestani AP, Santana F, de Oliveira Alvares L, Quillfeldt JA. 2013. Memory reconsolidation allows the consolidation of a concomitant weak learning through a synaptic tagging and capture mechanism. *Hippocampus* 23:931-941.
- Cazakoff BN, Johnson KJ, Howland JG. 2010. Converging effects of acute stress on spatial and recognition memory in rodents: A review of recent behavioural and pharmacological findings. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 34:733-741.
- Cepeda NJ, Pashler H, Vul E, Wixted JT, Rohrer D. 2006. Distributed practice in verbal recall tasks: A review and quantitative synthesis. *Psychol. Bull.* 132:354-380.
- Chen DY, Bambah-Mukku D, Pollonini G, Alberini CM. 2012. Glucocorticoid receptors recruit the CaMKII α -BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. *Nat. Neurosci.* 15:1707-1714.
- Clark RE. 2013. Recognition memory: an old idea given new life. *Curr. Biol.* [Internet] 23:R725-7.
- Clark RE, Martin SJ. 2005. Interrogating rodents regarding their object and spatial memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15:593-598.
- Clarke JR, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I, Delgado-García JM. 2010. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:2652-7.
- Cohen SJ, Munchow AH, Rios LM, Zhang G, Ásgeirsdóttir HN, Stackman RW. 2013. The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Curr. Biol.* 23:1685-1690.
- Cohen SJ, Stackman RW. 2015. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav. Brain Res.* 285:105-117.
- Costa-Mattioli M, Sonenberg N. 2008. Translational control of gene expression: a molecular switch for memory storage. *Prog. Brain Res.* 169:81-95.
- Davis HP, Squire LR. 1984. Protein synthesis and memory: A review. *Psychol. Bull.* 96:518-559.
- Deng W, Mayford M, Gage FH. 2013. Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice. *Elife* 2013:1-21.
- Dere E, Huston JP, De Souza Silva M a. 2005. Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 84:214-221.
- Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. 2007. The pharmacology, neuroanatomy and

- neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31:673-704.
- Diamond DM, Campbell AM, Park CR, Halonen J, Zoladz PR. 2007. The Temporal Dynamics Model of Emotional Memory Processing: A Synthesis on the Neurobiological Basis of Stress-Induced Amnesia, Flashbulb and Traumatic Memories, and the Yerkes-Dodson Law. *Neural Plast.* 2007:1-33.
- Dix SL, Aggleton JP. 1999. Extending the spontaneous preference test of recognition: Evidence of object-location and object-context recognition. *Behav. Brain Res.* 99:191-200.
- Dong Z, Gong B, Li H, Bai Y, Wu X, Huang Y, He W, Li T, Wang YT. 2012. Mechanisms of Hippocampal Long-Term Depression Are Required for Memory Enhancement by Novelty Exploration. *J. Neurosci.* 32:11980-11990.
- Dudai Y. 1996. Consolidation: Fragility on the road to the engram. *Neuron* 17:367-370.
- Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55:51-86.
- Dudai Y, Eisenberg M. 2004. Rites of passage of the engram: Reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44:93-100.
- Dudai Y, Morris RGM. 2000. To consolidate or not to consolidate: what are the questions? En: J B, editor. In *brain, perception, and memory. Advances in cognitive sciences. Vol. 1.* Oxford, UK. p 149-162.
- Dunn JC. 2004. Remember-know: a matter of confidence. *Psychol. Rev.* 111:524-542.
- Dunsmoor JE, Murty VP, Davachi L, Phelps EA. 2015. Emotional learning selectively and retroactively strengthens memories for related events. *Nature* 520:345-348.
- Ebbinghaus H. 1913. *Memory : A Contribution to Experimental Psychology.* University Microfilms.
- Ennaceur A, Delacour J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31:47-59.
- Ergorul C, Eichenbaum H. 2004. The hippocampus and memory for «what,» «where,» and «when». *Learn Mem* 11:397-405.
- Frankland PW, Bontempi B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:119-30.
- Frey U, Krug M, Reymann KG, Matthies H. 1988. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res.* 452:57-65.
- Frey U, Morris RGM. 1997. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature*

385:533-536.

- Frey U, Morris RGM. 1998. Weak before strong: Dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP. *Neuropharmacology* 37:545-552.
- Gaskin S, Tremblay A, Mumby DG. 2003. Retrograde and anterograde object recognition in rats with hippocampal lesions. *Hippocampus* 13:962-969.
- Goebel P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER. 1986. The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322:419-422.
- Goh JJ, Manahan-Vaughan D. 2013. Spatial object recognition enables endogenous LTD that curtails LTP in the mouse hippocampus. *Cereb. Cortex* 23:1118-1125.
- Gonzalez C, Kramar C, Garagoli F, Rossato JI, Weisstaub N, Cammarota M, Medina JH. 2013. Medial prefrontal cortex is a crucial node of a rapid learning system that retrieves recent and remote memories. *Neurobiol. Learn. Mem.* 103:19-25.
- Good M a, Barnes P, Staal V, McGregor a, Honey RC. 2007. Context- but not familiarity-dependent forms of object recognition are impaired following excitotoxic hippocampal lesions in rats. *Behav. Neurosci.* 121:218-223.
- Gould TJ, Wilkinson DS, Yildirim E, Poole RLF, Leach PT, Simmons SJ. 2014. Nicotine shifts the temporal activation of hippocampal protein kinase A and extracellular signal-regulated kinase 1/2 to enhance long-term, but not short-term, hippocampus-dependent memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 109:151-159.
- Greene RL. 2008. Repetition and Spacing Effects. En: *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*. Vol. 2. Elsevier. p 65-78.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. 1999. Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat. Neurosci.* 2:1120-1124.
- Hammond R. 2004. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82:26-34.
- Han J-H, Kushner S a, Yiu AP, Cole CJ, Matynia A, Brown R a, Neve RL, Guzowski JF, Silva AJ, et al. 2007. Neuronal Competition and Selection During Memory Formation. *Science*. 316:457-460.
- Han J-H, Kushner SA, Yiu AP, Hsiang H-L, Buch T, Waisman A, Bontempi B, Neve RL, Frankland PW, et al. 2009. Selective Erasure of a Fear Memory. *Science*.
- Hardt O, Nader K, Nadel L. 2013. Decay happens: The role of active forgetting in memory. *Trends Cogn. Sci.* 17:111-120.
- Héctor Maldonado. 2008. La memoria animal (Nº 32) Adquisición, persistencia y olvido. EUDEBA.

- Holmes A, Wellman CL. 2009. Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33:773-783.
- Howland JG, Wang YT. 2008. Chapter 8 Synaptic plasticity in learning and memory: Stress effects in the hippocampus. *Prog. Brain Res.* 169:145-158.
- Hsiang H-L, Epp JR, van den Oever MC, Yan C, Rashid AJ, Insel N, Ye L, Niibori Y, Deisseroth K, et al. 2014. Manipulating a «Cocaine Engram» in Mice. *J. Neurosci.* 34:14115-14127.
- Igaz LM, Vianna MRM, Medina JH, Izquierdo I. 2002. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J. Neurosci.* 22:6781-9.
- Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. 2006. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci.* 29:496-505.
- Izquierdo I, Vianna MRM, Izquierdo LA., Barros DM, Szapiro G, Coitinho AS, Muller L, Cammarota M, Bevilaqua LRM, et al. 2002a. Memory retrieval and its lasting consequences. *Neurotox. Res.* 4:573-593.
- Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MRM, Coitinho A, De Silva TD, Choi H, Moletta B, Medina JH, Izquierdo I. 2002b. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22:269-287.
- Joëls M, Pu Z, Wiegert O, Oitzl MS, Krugers HJ. 2006. Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn. Sci.* 10:152-158.
- Josselyn SA, Köhler S, Frankland PW. 2015. Finding the engram. *Nat. Rev. Neurosci.* 16:521-534.
- Kandel ER, Squire LR. 2000. Neuroscience: Breaking Down Scientific Barriers to the Study of Brain and Mind. *Science.* 290:1113-1120.
- Kim JJ, Song EY, Kim JJ, Song EY, Kosten T a. 2006. Stress effects in the hippocampus: Synaptic plasticity and memory. *Stress* 9:1-11.
- Kim JM, Kim DH, Lee Y, Park SJ, Ryu JH. 2014. Distinct roles of the hippocampus and perirhinal cortex in GABAA receptor blockade-induced enhancement of object recognition memory. *Brain Res.* 1552:17-25.
- de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:463-475.
- Komorowski RW, Manns JR, Eichenbaum H. 2009. Robust Conjunctive Item-Place Coding by Hippocampal Neurons Parallels Learning What Happens Where. *J. Neurosci.* 29:9918-9929.
- Lechner HA, Squire LR, Byrne JH. 1999. Remembering Mu. *Neurobiol. Learn. Mem.:*77-

87.

Ledoux JE. 2001. *Synaptic Self*. New York: Viking.

de Lima MN, Luft T, Roesler R, Schröder N. 2006. Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neurosci. Lett.* 405:142-146.

Lima RH, Rossato JI, Furini CR, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Cammarota M. 2009. Infusion of protein synthesis inhibitors in the entorhinal cortex blocks consolidation but not reconsolidation of object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91:466-472.

Lisberger SG. 1998. Cerebellar LTD: A molecular mechanism of behavioral learning? *Cell* 92:701-704.

Lopez J, Gamache K, Schneider R, Nader K. 2015. Memory Retrieval Requires Ongoing Protein Synthesis and NMDA Receptor Activity-Mediated AMPA Receptor Trafficking. *J. Neurosci.* 35:2465-2475.

Lu Y, Ji Y, Ganesan S, Schloesser R, Martinowich K, Sun M, Mei F, Chao M V, Lu B. 2011. TrkB as a Potential Synaptic and Behavioral Tag. *J. Neurosci.* 31:11762-11771.

Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, Schramek TE. 2007. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn.* 65:209-237.

Mackley T, Hogg EL, Collingridge GL, Corrêa SAL. 2015. Title: Hippocampal mGluR-LTD in health and disease: focus on the p38 MAPK and ERK1/2 pathways. :1-15.

Maroun M, Akirav I. 2008. Arousal and Stress Effects on Consolidation and Reconsolidation of Recognition Memory. *Neuropsychopharmacology* 33:394-405.

Martin SJ, Grimwood PD, Morris RGM. 2000. Synaptic plasticity and memory: An Evaluation of the Hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.*:649-711.

Martin SJ, Morris RGM. 2002. New life in an old idea: The synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12:609-636.

Martínez MC, Alen N, Ballarini F, Moncada D, Viola H. 2012. Memory traces compete under regimes of limited Arc protein synthesis: Implications for memory interference. *Neurobiol. Learn. Mem.* 98:165-173.

Martínez MC, Villar ME, Ballarini F, Viola H. 2014. Retroactive interference of object-in-context long-term memory: Role of dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. *Hippocampus* 24:1482-1492.

McGaugh JL. 2000. Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-51.

Menzel R, Manz G, Menzel R, Greggers U. 2001. Massed and Spaced Learning in

- Honeybees: The Role of CS, US, the Intertrial Interval, and the Test Interval. *Learn. Mem.* 8:198-208.
- Merhav M, Rosenblum K. 2008. Facilitation of taste memory acquisition by experiencing previous novel taste is protein-synthesis dependent. *Learn Mem* 15:501-507.
- Moncada D, Ballarini F, Martinez MC, Frey JU, Viola H. 2011. Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:12931-12936.
- Moncada D, Ballarini F, Viola H. 2015. Behavioral tagging; a translation of the synaptic tagging and capture hypothesis. *Neural Plast.* 2015.
- Moncada D, Viola H. 2006. Phosphorylation state of CREB in the rat hippocampus: A molecular switch between spatial novelty and spatial familiarity? *Neurobiol. Learn. Mem.* 86:9-18.
- Moncada D, Viola H. 2007. Induction of Long-Term Memory by Exposure to Novelty Requires Protein Synthesis: Evidence for a Behavioral Tagging. *J. Neurosci.* 27:7476-7481.
- Morici JF, Bekinschtein P, Weisstaub N V. 2015. Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. *Behav. Brain Res.* 292:241-51.
- Motanis H, Maroun M. 2012. Differential involvement of protein synthesis and actin rearrangement in the reacquisition of contextual fear conditioning. *Hippocampus* 22:494-500.
- Müller, G. E. & Pilzecker AZP. 1900. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z. Psychol.* 300:1-300.
- Mumby DG, Gaskin S, Glenn MJ, Schramek TE, Lehmann H. 2002. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learn. Mem.* 9:49-57.
- Mumby DG, Tremblay A, Lecluse V, Lehmann H. 2005. Hippocampal damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. *Hippocampus* 15:1050-1056.
- Navakkode S. 2005. Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated Reinforcement of Hippocampal Early Long-Term Depression by the Type IV-Specific Phosphodiesterase Inhibitor Rolipram and Its Effect on Synaptic Tagging. *J. Neurosci.* 25:10664-10670.
- Nicoll RA, Malenka RC. 1999. Expression Mechanisms Underlying NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868:515-525.
- Nomoto M, Ohkawa N, Nishizono H, Yokose J, Suzuki A, Matsuo M, Tsujimura S,

- Takahashi Y, Nagase M, et al. 2016. Cellular tagging as a neural network mechanism for behavioural tagging. *Nat. Commun.* 7:10-12.
- O'Brien N, Lehmann H, Lecluse V, Mumby DG. 2006. Enhanced context-dependency of object recognition in rats with hippocampal lesions. *Behav. Brain Res.* 170:156-162.
- Oliveira AMM, Hawk JD, Abel T, Havekes R. 2010. Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learn. Mem.* 17:155-160.
- Pagani MR, Oishi K, Gelb BD, Zhong Y. 2009. The Phosphatase SHP2 Regulates the Spacing Effect for Long-Term Memory Induction. *Cell* 139:186-198.
- Peters GJ, David CN, Marcus MD, Smith DM. 2013. The medial prefrontal cortex is critical for memory retrieval and resolving interference. *Learn. Mem.* 20:201-9.
- Pezze MA, Marshall HJ, Fone KCF, Cassaday HJ. 2015. Dopamine D1 receptor stimulation modulates the formation and retrieval of novel object recognition memory: Role of the prelimbic cortex. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25:2145-2156.
- Philips GT, Tzvetkova EI, Carew TJ. 2007. Transient Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Is Confined to a Narrow Temporal Window Required for the Induction of Two-Trial Long-Term Memory in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 27:13701-13705.
- Philips GT, Ye X, Kopec AM, Carew TJ. 2013. MAPK establishes a molecular context that defines effective training patterns for long-term memory formation. *J. Neurosci.* 33:7565-7573.
- Postma A, Kessels R, Vanasselen M. 2008. How the brain remembers and forgets where things are: The neurocognition of object–location memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32:1339-1345.
- Quevedo J, Vianna MRM, Martins MR, Barichello T, Medina JH, Roesler R, Izquierdo I. 2004. Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behav. Brain Res.* 154:339-343.
- Rajasethupathy P, Sankaran S, Marshel JH, Kim CK, Ferenczi E, Lee SY, Berndt A, Ramakrishnan C, Jaffe A, et al. 2015. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature* 526:653-659.
- Redondo RL, Morris RGM. 2011. Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 12:17-30.
- Rogerson T, Cai DJ, Frank A, Sano Y, Shobe J, Lopez-Aranda MF, Silva AJ. 2014. Synaptic tagging during memory allocation. *Nat. Rev. Neurosci.* 15:157-69.
- Rossato JI, Bevilaqua LR, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2007a. On

- the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn. Mem.* 14:36-46.
- Rossato JI, Bevilaqua LR, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2007b. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 14:36-46.
- Rossato JI, Bevilaqua LRM, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M. 2009. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science.* 325:1017-1020.
- Rossato JI, Köhler CA, Radiske A, Lima RH, Bevilaqua LRM, Cammarota M. 2015. State-dependent effect of dopamine D1/D5 receptors inactivation on memory destabilization and reconsolidation. *Behav. Brain Res.* 285:194-199.
- Rossato JI, Radiske A, Kohler CA, Gonzalez C, Bevilaqua LR, Medina JH, Cammarota M. 2013a. Consolidation of object recognition memory requires simultaneous activation of dopamine D1/D5 receptors in the amygdala and medial prefrontal cortex but not in the hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 106:66-70.
- Rossato JI, Radiske A, Kohler CA, Gonzalez C, Bevilaqua LR, Medina JH, Cammarota M. 2013b. Consolidation of object recognition memory requires simultaneous activation of dopamine D1/D5 receptors in the amygdala and medial prefrontal cortex but not in the hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 106:66-70.
- Rugg MD, Yonelinas AP. 2003. Human recognition memory: A cognitive neuroscience perspective. *Trends Cogn. Sci.* 7:313-319.
- Salvetti B, Morris RGM, Wang S-H. 2014. The role of rewarding and novel events in facilitating memory persistence in a separate spatial memory task. *Learn. Mem.* 21:61-72.
- Sandi C, Pinelo-Nava MT. 2007. Stress and Memory: Behavioral Effects and Neurobiological Mechanisms. *Neural Plast.* 2007:1-20.
- Sano Y, Shobe JL, Zhou M, Huang S, Shuman T, Cai DJ, Golshani P, Kamata M, Silva AJ. 2014. CREB Regulates Memory Allocation in the Insular Cortex. *Curr. Biol.* 24:2833-2837.
- Sara SJ, Hars B. 2006. In memory of consolidation. *Learn. Mem.* 13:515-521.
- Schacter D.L. 2001. *Forgotten ideas, neglected pioneers: Richard Semon and the story of memory.* Philadelphia: Psychology Press.
- Schafe GE, Nadel N V., Sullivan GM, Harris A, LeDoux JE. 1999. Memory Consolidation for Contextual and Auditory Fear Conditioning Is Dependent on Protein Synthesis, PKA, and MAP Kinase. *Learn. Mem.* 6:97-110.
- Sekeres MJ, Mercaldo V, Richards B, Sargin D, Mahadevan V, Woodin M a, Frankland PW, Josselyn S a. 2012. Increasing CRTC1 Function in the Dentate Gyrus during

Memory Formation or Reactivation Increases Memory Strength without Compromising Memory Quality. *J. Neurosci.* 32:17857-17868.

Semon R. 1921. *The Mneme*. (G. Allen & Unwin).

Semon R. 1923. *Mnemic Psychology*. (G. Allen & Unwin)

Seoane A, Tinsley CJ, Brown MW. 2012. Interfering with Fos expression in rat perirhinal cortex impairs recognition memory. *Hippocampus* 22:2101-2113.

Shors TJ. 2006. Stressful Experience and Learning Across the Lifespan. *Annu. Rev. Psychol.* 57:55-85.

Silva AJ, Giese KP, Fedorov NB, Frankland PW, Kogan JH. 1998. Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70:44-61.

Silva AJ, Zhou Y, Rogerson T, Shobe J, Balaji J. 2009. Molecular and cellular approaches to memory allocation in neural circuits. *Science.* 326:391-395.

Smolen P, Zhang Y, Byrne JH. 2016. The right time to learn: mechanisms and optimization of spaced learning. *Nat. Rev. Neurosci.* 17:77-88.

Squire LR, Kandel ER. 1999. *Memory: From Mind to Molecules*. New York: W. H. Freedman & Co.

Squire LR, Stark CELL, Clark RE. 2004. the Medial Temporal Lobe. *Annu. Rev. Neurosci.* 27:279-306.

Squire LR, Wixted JT, Clark RE. 2007. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:872-883.

Stanton PK, Sarvey JM. 1984. Blockade of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region by inhibitors of protein synthesis. *J. Neurosci.* 4:3080-3088.

Tinsley CJ, Narduzzo KE, Brown MW, Warburton EC. 2012. A role for the CAMKK pathway in visual object recognition memory. *Hippocampus* 22:466-476.

Tulving E. 2002. EPISODIC MEMORY: From Mind to Brain. *Annu. Rev. Psychol.* 53:1-25.

Vianna MR, Izquierdo L a, Barros DM, Walz R, Medina JH, Izquierdo I. 2000a. Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *An. Acad. Bras. Cienc.* 72:353-64.

Vianna MRM, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. 2000b. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn. Mem.* 7:333-40.

Viola H, Ballarini F, Martínez MC, Moncada D. 2014. The tagging and capture

hypothesis from synapse to memory.

Vnek N, Rothblat L a. 1996. The hippocampus and long-term object memory in the rat. *J. Neurosci.* 16:2780-2787.

Wang S-H, Redondo RL, Morris RGM. 2010. Relevance of synaptic tagging and capture to the persistence of long-term potentiation and everyday spatial memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:19537-19542.

Warburton EC, Brown MW. 2010. Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia* 48:2262-2272.

Warburton EC, Brown MW. 2015. Neural circuitry for rat recognition memory. *Behav. Brain Res.* 285:131-139.

Wilson DIG, Langston RF, Schlesiger MI, Wagner M, Watanabe S, Ainge JA. 2013a. Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. *Hippocampus* 23:352-366.

Wilson DIG, Watanabe S, Milner H, Ainge JA. 2013b. Lateral entorhinal cortex is necessary for associative but not nonassociative recognition memory. *Hippocampus* 23:1280-1290.

Winters BD. 2004. Double Dissociation between the Effects of Peri-Postrhinal Cortex and Hippocampal Lesions on Tests of Object Recognition and Spatial Memory: Heterogeneity of Function within the Temporal Lobe. *J. Neurosci.* 24:5901-5908.

Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. 2008. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32:1055-1070.

Winters BD, Tucci MC, Jacklin DL, Reid JM, Newsome J. 2011. On the Dynamic Nature of the Engram: Evidence for Circuit-Level Reorganization of Object Memory Traces following Reactivation. *J. Neurosci.* 31:17719-17728.

Wixted JT. 2004. On Common Ground: Jost's (1897) Law of Forgetting and Ribot's (1881) Law of Retrograde Amnesia. *Psychol. Rev.* 111:864-879.

Wolf OT. 2008. The influence of stress hormones on emotional memory: Relevance for psychopathology. *Acta Psychol.* 127:513-531.

Yiu AP, Mercaldo V, Yan C, Richards B, Rashid AJ, Hsiang HLL, Pressey J, Mahadevan V, Tran MM, et al. 2014. Neurons Are Recruited to a Memory Trace Based on Relative Neuronal Excitability Immediately before Training. *Neuron* 83:722-735.

Yonelinas a. 2002. The nature of recollection and familiarity: A review of 30 years of research. *J. Mem. Lang.* 46:441-517.

Zalcman G, Federman N, de la Fuente V, Romano A. 2015. Nuclear factor kappa B-

dependent Zif268 expression in hippocampus is required for recognition memory in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 119:10-17.

Zhou Y, Won J, Karlsson MG, Zhou M, Rogerson T, Balaji J, Neve R, Poirazi P, Silva AJ. 2009. CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. *Nat. Neurosci.* 12:1438-1443.