



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

El aprendizaje espaciado y los mecanismos que optimizan la persistencia de memorias.

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

en el área de CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Julieta Andrea Correa

Directora de tesis: Dra. Haydée A. M. Viola

Consejero de estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de trabajo: Laboratorio de Memoria. Instituto de Biología Celular y

Neurociencias “Prof. E. De Robertis” (UBA-CONICET). Facultad de Medicina.

Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 23 de agosto de 2024

ÍNDICE

Agradecimientos.....	2-3
Resumen.....	4-6
Abstract.....	7-9
Abreviaturas.....	10
Publicaciones.....	11
Introducción.....	12-33
Objetivos e Hipótesis.....	33-34
Capítulo I: Efectos del aprendizaje espaciado sobre la memoria espacial en roedores	
Materiales y métodos I.....	36-43
Resultados I.....	44-62
Discusión I.....	63-69
Capítulo II: Efectos del aprendizaje espaciado sobre la memoria gráfica en humanos	
Materiales y métodos II.....	70-75
Resultados II.....	76-83
Discusión II.....	84-86
Capítulo III: Efectos del aprendizaje espaciado sobre la memoria gráfica en población adulta	
Materiales y métodos III.....	88-92
Resultados III.....	93-99
Discusión III.....	100-101
Conclusiones generales.....	102-104
Bibliografía.....	105-117
Apéndice.....	118-124

AGRADECIMIENTOS

A Haydée, por abrirme las puertas del Laboratorio de Memoria. Gracias por confiar en mí, por tu guía y apoyo durante estos años tanto en lo laboral como en lo personal. Agradezco tu paciencia, por siempre escuchar mis opiniones, y por todas las enriquecedoras discusiones científicas y sobre la vida. Tu pasión por la ciencia es una fuente constante de inspiración y motivación para todos nosotros, incluso en los momentos más difíciles. Por tu calidez y por preocuparte siempre de nuestras vidas y bienestar. A Jorge, por compartir tus experiencias científicas y de vida. Por el humor y por siempre contarnos “el lado b” de las historias científicas. A Jorge y Haydée, por hacer del laboratorio un espacio de trabajo cálido, donde se promueven el intercambio de ideas, la curiosidad y la comida, logrando que siempre nos sintamos cómodos y bienvenidos. A todos los miembros del laboratorio, por hacer que mi paso por él sea recordado como una gran experiencia de vida.

A mis compañeros del “Grupo Viola”. A Rami por ser mi hermano de doctorado, por el trabajo codo a codo, por todas las horas de experimentos/cirugías y música, por compartir las alegrías y las frustraciones, por los viajes y por hacer que siempre me sienta cómoda. A Pablo, por tu optimismo frente a cualquier situación, por tener el consejo justo, por preocuparte por los demás y siempre transmitir calma. A Rami y a Pablo, por enseñarme el trabajo de laboratorio, por la paciencia, por hacer cada experimento más ameno, por equivocarnos y aprender juntos, por las discusiones interminables de ciencia y de la vida, por las risas y las birras, por los “ya fue”, por la amistad y la confianza de estos años. A Pame, por haber compartido mis inicios de doctorado, por ser siempre una fuente de perseverancia y alegría, por compartir tus consejos y escucharme. A Juan, por acompañarme en la etapa final del doctorado, por tu calma y tu paciencia, por las charlas de política, música y libros, por los mates, por las catarsis, por las risas y la amistad. A Mati, por el buen humor, por compartir las anécdotas y chismes, por los consejos, por soportar mis “retos” y tener siempre ganas de mejorar.

Al grupo de becarios del laboratorio, BULMA. Por cada comida, salida, congreso, cumpleaños, Pinamar y festejos. A Juli, por habernos acompañado desde el primer día del doctorado, por tu precisión y por hacer que de menos vueltas, por las charlas de ciencia y de la vida, y por ser mi compañera de viaje. A Mati, por convertirse en mi compañero de brunchs, por los podcast por whatsapp, por los momentos de quejas y chismes, por los mejores alfajores de maicena, por la sinceridad, las risas y la amistad. A Anita, por tu alegría constante, por tu risa inconfundible, por las charlas, por enseñarme a trabajar en el laboratorio, por tu buena predisposición para todo y por las facturas de las 5. A Magda, por la buena onda, por las charlas de arte, música y Seinfeld, por tu mirada científica y por ayudarme en todo lo que necesite. A Alejo, por ayudarme en mis experimentos en las escuelas, por las charlas de bondi, por tu mirada práctica y optimista, y por el compañerismo. A Cami, por tu bondad, por la alegría y por compartir siempre una recomendación de viaje o salida. A Dani, por la buena energía, por todas las recetas y charlas de feminismo. A Fer, por tu humor, tus anécdotas y por tu gran dedicación al trabajo.

Al grupo de investigadores del laboratorio. Por todos los seminarios, discusiones enriquecedoras y calidez de todos los días. A Diego, por su buen humor, por su ojo crítico, y por ayudarme y guiarme cuando lo necesité. A Cyn, por la buena onda, por tus consejos y explicaciones y por el compañerismo. A Fabri, por tu buena energía constante y tu generosidad. A Vero, por la buena onda, por el compañerismo y apoyo en el último tiempo.

A todos los investigadores y becarios del IBCN, que con su buena onda y alegría ayudaron a que el trabajo sea más fácil. Especialmente a Marian, Mechi y Andrea por el cuidado de todos los días de los animales en el bioterio.

Agradezco a la educación pública. A la Universidad de Buenos Aires por la formación que me ha brindado. A la Agencia y al CONICET por las becas que me han permitido realizar este doctorado y a todos los organismos que prestan subsidios que hacen posible llevar a cabo las investigaciones en el laboratorio.

A mis amigas por su apoyo incondicional. A Flor, por escucharme y entenderme, por el cariño, por alentarme siempre, por ser mi compañera de recitales y por los años de amistad. A Pau, por confiar en mí más que yo, por estar siempre del otro lado, por el cariño y los consejos, y por impulsarme siempre a mejorar. A Car, por los años de amistad, por las charlas y tus consejos, y por estar siempre presente. A Juli, por ser mi primera amiga de la facultad, por tu alegría, por tu mirada práctica de la vida y por llevarme a conocer cosas nuevas. A Tati, por tu paciencia, por tu cariño y amistad, y por confiar siempre en mí. A mis amigos “de la facultad”. A Dani, Naza, Tomi, Ceci y Tati. Por las charlas de descarga de frustraciones científicas, las salidas, las risas y el cariño.

Por último, el agradecimiento más importante es para mi familia. Por el amor, por apoyar siempre mis decisiones, compartir conmigo todos los momentos de mi carrera y alentarme a seguir adelante. Por inculcarme siempre la importancia del esfuerzo y la educación. A mi mamá, por cuidarme, acompañarme y ayudarme en todo. A mi papá, por transmitirme su amor por la música y los libros, y por impulsarme siempre a mejorar. A mis hermanos, Mati y Guada, por ser mi cable a tierra, por reírse, aconsejarme y ayudarme siempre. A mis sobrinos por traer una nueva alegría. A mi tía Vivi, por siempre preocuparse por mí e interesarse en mi trabajo. A mis abuelos, que siempre confiaron en mí y estarían orgullosos de este logro.

RESUMEN

La persistencia de la memoria a largo término (MLT) es un aspecto fundamental de esta función cognitiva y está relacionada con la formación y el mantenimiento de recuerdos que pueden durar días, semanas, meses o incluso años después de adquirir la información. En 2007, postulamos la hipótesis del “Etiquetado conductual” (EC), la cual aporta un enfoque original para comprender el proceso de formación de la MLT. Esta hipótesis propone que cada aprendizaje señala/etiqueta los sitios específicos relacionados con la plasticidad de su memoria. Este proceso resulta fundamental, ya que permite la captura de las proteínas de plasticidad (PRP) necesarias para la consolidación de esa memoria. Este marco conceptual enfatiza que la señalización de los sitios donde se almacenará la información es tan importante como la síntesis de los PRP para lograr el sostenimiento de la traza mnésica.

Existen diversas estrategias para perpetuar la traza de la memoria. Una de estas estrategias implica exponer al animal a una sesión recordatoria, ya sea mediante una evaluación o una segunda experiencia de entrenamiento. No obstante, repetir una experiencia no siempre garantiza una memoria mejorada de la misma. El intervalo de tiempo entre estas experiencias es crucial para promover la formación de una memoria duradera. En este contexto, los entrenamientos espaciados han demostrado tener un efecto positivo en la creación o extensión de la duración de las memorias, ofreciendo ventajas sobre los entrenamientos masivos. En este estudio, el objetivo fue develar los mecanismos subyacentes que nos permitan comprender las bases neurofisiológicas del fenómeno del re-entrenamiento, predecir los intervalos que favorecen la memoria y desarrollar estrategias para mejorar la retención de información.

Inicialmente, para identificar el proceso que promueve la persistencia de la MLT a través del aprendizaje espaciado, se utilizó la tarea de reconocimiento espacial de objetos (REO) en ratas. El protocolo constó de una primera sesión de entrenamiento fuerte que indujo la formación de la MLT (evaluada 1 día después del entrenamiento), pero no de su persistencia (evaluada a los 7 o 14 días posteriores); y una segunda sesión de entrenamiento débil (que solo induce memoria de corto término) que promovió la persistencia de la memoria cuando se aplicó 1 día después del primer entrenamiento, pero no cuando transcurrieron 7 días. No se observó una promoción de la persistencia cuando se utilizó una sesión de evaluación en lugar del re-entrenamiento como segunda sesión. Proponemos que la promoción de la persistencia se basa en el mecanismo del EC que opera cuando se recupera la traza mnésica. Los resultados sugieren que el efecto del re-entrenamiento requiere los mecanismos de expresión de la memoria, pero no los mecanismos de refuerzo o reconsolidación de la

memoria. El efecto promotor del re-entrenamiento involucra la actividad de ERKs1/2, para establecer la etiqueta de aprendizaje, y la disponibilidad de receptores AMPA que contienen GluA2 en el hipocampo dorsal como proteína de plasticidad. Postulamos que durante el re-entrenamiento, los sustratos neurales inicialmente activados por el aprendizaje original serían principalmente re-etiquetados. En estos sitios, se utilizarían las PRP necesarias tanto para la expresión de la memoria como las inducidas por la evocación, lo que permitiría mantener una traza mnésica persistente. Tanto las PRP como el establecimiento de marcas de aprendizaje son procesos clave desencadenados por el re-entrenamiento, que permiten la persistencia de la memoria de REO.

Luego, se buscó extender este modelo al estudio de la memoria en humanos y nos preguntamos si un fenómeno similar al observado en roedores se manifiesta en un entorno educativo, es decir, si el uso de una sesión de re-entrenamiento puede mejorar la retención de la información aprendida en el aula. El objetivo fue investigar los efectos del aprendizaje espaciado en la persistencia de la memoria en estudiantes de primaria (de 8 a 11 años). Se diseñó una tarea que involucra una o dos sesiones de aprendizaje separadas por diferentes intervalos entre sesiones para evaluar la memoria gráfica basada en la figura de Rey Osterrieth. Durante la sesión de entrenamiento, se les pidió a los estudiantes que copiaran una figura, y durante la sesión de evaluación, se les pidió que la dibujaran en ausencia del modelo. El grupo control participó en una sola sesión de copia, el grupo de re-entrenamiento tuvo dos sesiones de copia idénticas, y un grupo de re-evaluación realizó una sesión de copia y una sesión de evaluación como segunda sesión. La MLT evaluada en el grupo control disminuyó significativamente a lo largo de las semanas. La persistencia de la memoria se evaluó 7 días después de la segunda sesión. Se observó una mayor persistencia de la de la MLT en comparación con el grupo control en el grupo de estudiantes que recibió una segunda sesión (ya sea de evaluación o re-entrenamiento) 2 días, 1 o 2 semanas después de la primera. Sin embargo, cuando el intervalo entre sesiones fue más largo (3 o 6 semanas), el re-entrenamiento fue la única forma efectiva de promover la persistencia de la memoria. Los beneficios del re-entrenamiento persistieron durante al menos 8 semanas, lo que indica una mejora sostenida de la memoria. Además, los resultados sugieren que la efectividad de una segunda sesión depende de la memoria remanente después de la primera sesión.

Por último, para ampliar el estudio de este efecto en humanos, se utilizó una tarea de aprendizaje visoespacial (VLST) en una población adulta mayor de 18 años. Esta tarea espacial, realizada mediante una plataforma virtual, consiste en la

localización de símbolos dentro de un tablero. Se realizaron protocolos de dos sesiones, donde la segunda podía ser de entrenamiento o de test experimentadas a diferentes intervalos, registrando la MLT a la semana. Los resultados sugieren que una sesión de test fue efectiva para promover la persistencia de la memoria cuando la expresión de la traza original era elevada. En cambio, una sesión de re-entrenamiento garantiza una retención más sólida del aprendizaje, incluso con un intervalo de hasta 14 días, momento donde la memoria original decayó significativamente.

Nuestros hallazgos aportan nuevos conocimientos sobre el impacto del aprendizaje espaciado en la persistencia de la MLT, tanto en roedores como en humanos, respaldando la hipótesis del EC como mecanismo subyacente a la formación y persistencia de estas memorias. El aprendizaje y la memoria son capacidades cognitivas fundamentales para la educación escolar. Los resultados obtenidos en estudiantes podrían proporcionar a los educadores información valiosa acerca de una herramienta sencilla pero efectiva para mejorar el rendimiento en el aula.

Palabras clave: Memoria de Largo Término, Persistencia, Aprendizaje Espaciado, Etiquetado Conductual, Hipocampo, Ratas, Estudiantes nivel inicial, Adultos.

Spaced learning and the mechanisms that optimize memory persistence

ABSTRACT

Long-term memory (LTM) persistence is a key element of cognitive function and is related to the formation and maintenance of memories that can last for days, weeks, months, or even years after their acquisition. In 2007, our group proposed the "Behavioral Tagging" (BT) hypothesis, which offers an original approach to comprehend the formation of LTM. This hypothesis posits that the learning of a task tags specific sites associated with the plasticity of a given memory. This process is fundamental because it allows for the capture of the plasticity-related proteins (PRPs) necessary for the consolidation of that memory. This conceptual framework emphasizes that the tagging of sites where the information will be stored is as important as the synthesis of PRPs in achieving the sustainability of the mnemonic trace.

There are various strategies to perpetuate memory traces. One of these strategies involves exposing the subject to a reminder session, either through a test or a new training experience. However, repeating an experience does not always guarantee an improved memory of it. The time interval between these experiences is crucial to promote the formation of lasting memories. In this context, spaced training has shown a positive effect on creating or extending the duration of memories, offering advantages over massed training. In this study, our goal was to elucidate the underlying mechanisms that enable us to comprehend the neurophysiological foundations of the retraining phenomenon, anticipate intervals that support memory, and formulate strategies for improving retention.

First, to identify the process that promotes LTM persistence by spaced learning, we used the spatial object recognition (SOR) task in rats. The protocol consisted of a first strong training session that induced LTM formation (tested 1 day after training), but not LTM persistence (tested 7 or 14 days after training); and a second weak training session that promoted memory persistence when applied 1 day, but not 7 days, after the first training. Persistence was not promoted when a test session was employed as the second session instead of retraining. We propose that the promotion of persistence is based on the BT mechanism that operates when the mnemonic trace is retrieved. The results suggest that the retraining effect requires the mechanisms of memory expression but not the mechanisms of memory reinforcement or reconsolidation. The promoting effect of retraining involves ERKs1/2 activity to set the

learning tag and the availability of GluA2-containing AMPA receptors in the dorsal hippocampus as a plasticity protein. We postulate that retraining will mainly retag the sites initially activated by the original learning, where the PRPs needed for memory expression and/or induced by retrieval would be used to maintain a persistent mnemonic trace. Both the synthesis of plasticity-related proteins and the establishment of learning tags are key processes triggered by retraining that allow the persistence of SOR memory.

Next, we aimed to extend this model to the study of memory in humans and wondered if a phenomenon similar to that observed in rodents manifests in an educational setting, particularly, if the use of a retraining session can enhance the retention of information learned in the classroom. The objective was to investigate the effects of spaced learning on memory persistence in elementary-school students (aged 8 to 11 years). We designed a task involving one or two learning sessions separated by different inter-session intervals to evaluate graphic memory based on Rey Osterrieth's figure. During the training session, students were asked to copy a figure, and during the evaluation session, they were asked to draw it from memory in the absence of the model. The control group participated in a single copying session, the retraining group had two identical copying sessions, and a re-test group performed a copying session and a test session as the second session. LTM in the control group decreased significantly over the weeks. Memory persistence was evaluated 7 days after the second session. We found better LTM persistence compared to the control group, in the group of students that received a second session (test or relearning) 2 days, 1, or 2 weeks after the first one. However, when the interval between sessions was longer (3 or 6 weeks), retraining was the only effective way to promote memory persistence. These benefits of retraining persisted for at least 8 weeks, indicating sustained memory improvement over time. Furthermore, the results suggest that the effectiveness of a second session depends on the memory remaining after the first session.

Lastly, to extend the study of this effect in humans, a visuospatial learning task (VLST) was used in an adult population over 18 years old. This spatial task, conducted through a virtual platform, involves locating symbols within a grid. Protocols of two sessions were carried out, where the second session could be either training or testing, experienced at different intervals, and MLT was recorded a week later. The results suggest that a testing session was effective in promoting memory persistence when the expression of the original trace was high. In contrast, a retraining session ensures more robust retention of learning, even with an interval of up to 14 days, at which point the original memory had significantly decayed.

Our findings provide new insights into the impact of spaced learning on LTM persistence, in both rodents and humans, supporting the Behavioral Tagging hypothesis as the underlying mechanism for the formation and persistence of these memories. Learning and memory are fundamental cognitive capacities for school education. The results obtained in students could provide valuable information to educators about a simple yet effective tool for improving classroom performance.

Keywords: Long-Term Memory, Persistence, Spaced Learning, Behavioral Tagging, Hippocampus, Rats, Students.

ABREVIATURAS

AMPAR: receptor de Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ARC: proteína inducida por actividad relacionada con el citoesqueleto (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*)

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro (*brain-derived neurotrophic factor*)

CA: campo abierto

CAMKII: proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina II

CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (*cAMP response element binding protein*)

EC: Etiquetado conductual

EI: evitación inhibitoria

ERK 1/2: proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (*extracellular-signal-regulated kinases*)

LTD: depresión de largo plazo (*long-term depression*)

LTP: potenciación de largo plazo (*long-term potentiation*)

MCT: memoria de corto termino

MLT: memoria de largo termino

mTOR: blanco de acción de la rapamicina en mamíferos/ mecanístico, del inglés, *mammalian/ mechanistic target of rapamycin*

NMDAR: receptor de ácido N-metil-D-aspartico

PKA: proteína quinasa A

PKMz: proteína quinasa Mz

PRPs: proteínas relacionadas con la plasticidad

REO: reconocimiento espacial de objetos

REOd: entrenamiento débil en tarea de REO

REOf: entrenamiento fuerte en tarea de REO

VEH: solución vehículo

PUBLICACIONES

Los resultados presentados en este trabajo han sido publicados en los siguientes artículos:

Persistence of Spatial Memory Induced by Spaced Training Involves a Behavioral Tagging Process. **Correa J.**, Tintorelli R., Budriesi P. and Viola H. *Neuroscience*, 2022, 10;497:215-227. doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.02.032.

Enhancing Memory Persistence in Elementary-School Students Through Spaced Learning. **Correa J**, Barbuza A, Riboldi J, Ballarini F and Viola H.
(en evaluación en una revista científica con referato)

Publicaciones afines al tema de estudio:

Spatial-memory formation after spaced learning involves ERKs1/2 activation through a behavioral-tagging process. Tintorelli R., Budriesi P., Villar M. E., Marchal P., Lopes da Cunha P., **Correa J.**, Giurfa M. and Viola H. *Scientific Reports* 10:98, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57007-4>, 2020.

Behavioral Tagging as a mechanism for aversive-memory formation under acute stress. Lopes da Cunha P, Tintorelli R, **Correa J**, Budriesi P and Viola H. *European Journal of Neuroscience* 2021. DOI: 10.1111/ejn.15249.

A behavioral tagging account of kinase contribution to memory formation after spaced aversive training. Budriesi P, Tintorelli R, **Correa J**, Villar ME, Marchal P, Giurfa M and Viola H. *iScience* 2023 Vol. 26 Issue 8 Published online July 4, 2023. doi: 10.1016/j.isci.2023.107278. eCollection 2023.

Arc and BDNF mediated effects of hippocampal astrocytic glutamate uptake blockade on spatial memory stages. Riboldi J.G, **Correa J**, Renfijes M, Tintorelli R, and Viola H. *Communications Biology* 2024. (aceptado)

INTRODUCCIÓN

Aprendizaje y memoria

La memoria es la capacidad de utilizar el pasado al servicio del presente o del futuro. La memoria es fundamental en nuestra vida cotidiana y define quiénes somos. Sin ella, estaríamos condenados a un presente eterno.

El aprendizaje puede describirse como el mecanismo mediante el cual se adquiere nueva información sobre el mundo y la memoria como el mecanismo mediante el cual se retiene ese conocimiento (Lynch, 2004). Esta función cognitiva se encarga de recordar eventos, hechos, situaciones, lugares, objetos y habilidades motoras (Kandel, 2000). El hecho de que la memoria persista después de una experiencia sugiere que una representación interna de dicha experiencia se almacena en el cerebro y que posteriormente esta representación puede ser reconstruida y utilizada (Dudai Y, 2002).

¿Cómo podemos estudiar el aprendizaje y la memoria en un organismo? La evaluación de si se ha adquirido o no la información puede inferirse a través de los cambios en el comportamiento (Cahill y col., 2001). Para comprender los mecanismos involucrados, además de evaluar los cambios en la conducta de un individuo, es necesario identificar los eventos y procesos subyacentes que ocurren en múltiples niveles de complejidad: desde el nivel molecular, sináptico y celular, hasta el conjunto neuronal y el nivel de los sistemas cerebrales (Tonegawa y col., 2003).

Por lo tanto, dada la diversidad de niveles de estudio, el análisis de la memoria y sus mecanismos biológicos se realiza utilizando una amplia gama de modelos animales (desde insectos y crustáceos hasta roedores y primates) y enfoques metodológicos, tales como farmacológico, comportamental, bioquímico, molecular, celular, y electrofisiológico, entre otros.

¿Cómo se guarda la memoria?

La idea de que la memoria se almacena como cambios duraderos en el cerebro se remonta al menos a la época de Platón y Aristóteles, pero su formulación científica surgió en el siglo XX, cuando Richard Semon introdujo el término "engrama" para describir el sustrato neural responsable del almacenamiento y la recuperación de recuerdos (Semon, 2001). Semon sugirió cuatro características que definen un engrama: persistencia, ecforia, contenido y letargo (Josselyn y col., 2015). La persistencia implica la durabilidad del cambio generado en el cerebro. La ecforia establece que el engrama posee un potencial para expresarse en presencia de ciertas claves o señales que

desencadenan la evocación. En cuanto al contenido, Semon se refería a que la información o contenido guardado en el engrama refleja el evento ocurrido en el momento en que se codificó la memoria, y que este contenido predice lo que puede recuperarse en el momento de la evocación. Por último, el letargo implica la permanencia del engrama en un estado latente entre los procesos de codificación y evocación. De esta manera, las neuronas que cumplan con estas cuatro características formarán parte del engrama de la memoria.

En la actualidad uno de los criterios utilizados para estudiar el engrama es que las neuronas que lo componen sean necesarias y suficientes para expresar la memoria (Kim y col., 2016). En resumen, el engrama es el conjunto de neuronas activadas por el aprendizaje que experimentan cambios químicos y físicos persistentes (Poo y col., 2016). En 1949, Hebb propuso que el mecanismo para el almacenamiento de memorias es el ensamblado celular y la variación en la fuerza sináptica. Según Hebb, el ensamblado celular se forma entre células interconectadas que están simultáneamente activas durante una experiencia (Josselyn y Tonegawa, 2020). Además, sugirió que la reverberación en un conjunto de células inicia cambios estructurales en un grupo de sinapsis, y estos cambios constituyen una memoria permanente (Nadel y Maurer, 2020). De acuerdo con esta teoría, el engrama de una memoria está formado por un conjunto de espinas o sinapsis que sufren modificaciones cuando se almacena información específica y se reactivan cuando se evoca esa información. Hoy en día, se considera al engrama como el sustrato físico de la memoria, que posee las características sugeridas por Semon y se conforma por las modificaciones sinápticas (cambios químicos y físicos) propuestas por Hebb (Poo y col., 2016).

Clasificación de las memorias

Existen diversos criterios para clasificar la memoria, y uno de los más utilizados es su duración en el tiempo (Figura I.1). Bajo este criterio, se puede diferenciar entre memoria de corto término (MCT) y memoria de largo término (MLT). La MCT se mantiene por minutos a pocas horas después de adquirida la información, mientras que la memoria se considera MLT cuando perdura por días. Las MLT persistentes pueden durar semanas, meses o incluso toda la vida. La MLT requiere un procesamiento específico conocido como consolidación de la memoria, el cual está asociado a la transcripción y traducción de nuevas proteínas (Alberini y Kandel, 2015; Davis y Squire, 1984; Raven y col., 2021). Este proceso lleva a cambios plásticos en las neuronas y modificaciones en las espinas dendríticas (Amtul y Atta-ur-Rahman, 2015; Kandel, 2001).

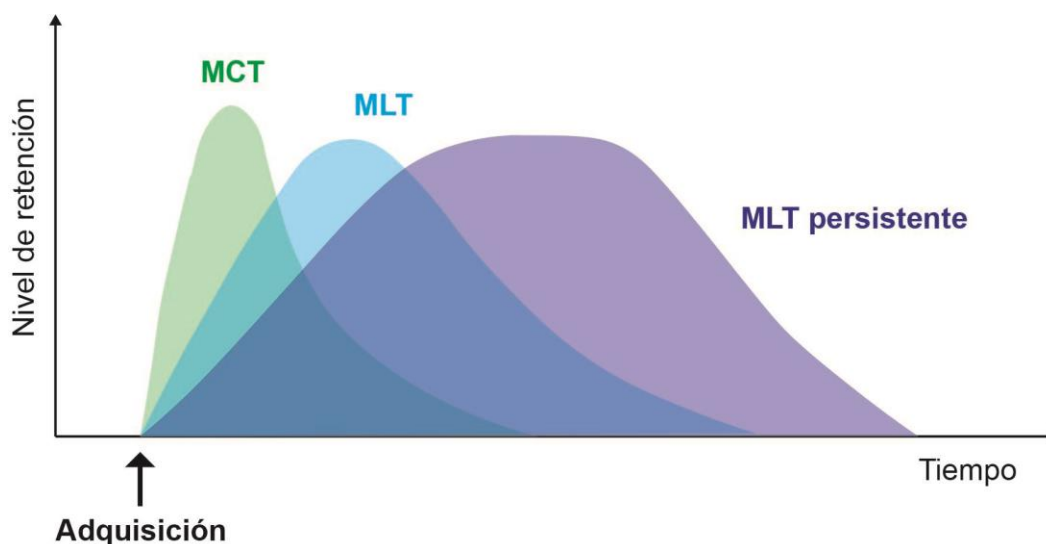


Figura I.1: Curso temporal de las memorias. Desde el momento del aprendizaje, se desencadenan procesos que pueden dar lugar a memorias de corto término (MCT), que duran desde minutos hasta horas, o memorias de largo término (MLT), que se extienden desde varias horas hasta días. Además, existen memorias de largo término persistentes (MLT persistentes), que pueden durar semanas, meses, años o incluso toda la vida. El esquema ilustra el nivel de retención de cada uno de estos tipos de memoria en función del tiempo, representado en una escala logarítmica. Modificado de McGaugh, 2000.

Otra forma de clasificar la memoria se basa en cómo el sujeto almacena y evoca la información aprendida. De esta manera, la memoria puede dividirse en declarativa o explícita y no declarativa, implícita o de procedimiento. La primera incluye hechos y conceptos, depende del lóbulo temporal medial y permite una evocación consciente por parte del individuo, que en los humanos puede expresarse a través del lenguaje (de ahí el término "declarativa"). Las memorias declarativas abarcan tanto el conocimiento general de objetos, palabras, significados, hechos y personas (memorias semánticas), como los recuerdos asociados a eventos específicos ocurridos en un tiempo y lugar determinados (memorias episódicas) (Squire y col., 2004). Por otro lado, las memorias implícitas corresponden a habilidades, aprendizajes motores y asociaciones que dependen de otras estructuras cerebrales y, en general, se adquieren y recuperan de forma inconsciente (Dudai, 2002).

Las memorias episódicas implican la integración de la información del evento vivido por el individuo (qué ocurrió) con la información espacial (dónde ocurrió) y temporal (cuándo ocurrió) relacionada al mismo (Tulving, 2002). Por este motivo, se

plantea que la memoria episódica posee tres componentes: "qué", "dónde" y "cuándo". Dado que las memorias episódicas son declarativas y evocadas de manera consciente, esta definición se aplica sólo a humanos. En el caso de los animales no humanos, no es posible cumplir con estas características. Por lo tanto, al trabajar con animales no humanos se menciona "memorias tipo-episódicas". Esto se debe a su incapacidad de comunicarse verbalmente, lo que impide saber si la evocación de la memoria es realmente consciente o si esta memoria mantiene las mismas características que en los humanos (Dudai Y, 2002). Las tareas de exploración espontánea de objetos, que requieren la vinculación de objetos (qué), con ubicaciones específicas (dónde) y contextos (en qué ocasión), proporcionan un modelo válido de la memoria tipo-episódica en animales. En este sentido, la tarea de reconocimiento espacial de objetos (REO) se basa en la tendencia natural de los roedores por explorar elementos conocidos pero ubicados en sitios novedosos (Dere y col., 2005). El beneficio de utilizar este paradigma es que no está relacionado con una recompensa particular (Kinnavane y col., 2015). El REO es la tarea conductual que seleccionamos para llevar a cabo el estudio de este trabajo de tesis desarrollado en el capítulo 1.

Etapas o fases de la memoria

La formación de la memoria es el resultado de la integración y desarrollo de distintas etapas o fases, con diferentes requerimientos, mecanismos y cinéticas. En base a esto, podemos dividir la memoria en tres etapas principales: adquisición, consolidación y evocación (Figura I.2).

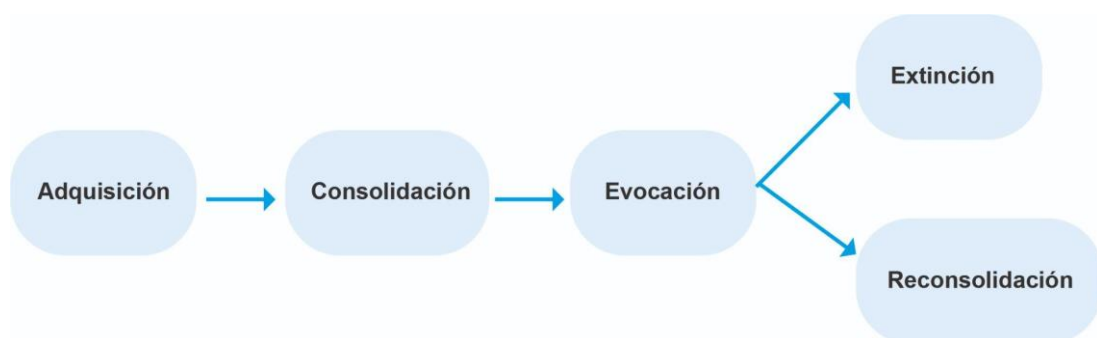


Figura I.2: Etapas en el procesamiento de la memoria. El aprendizaje ocurre durante la fase inicial de adquisición. Posteriormente, la memoria pasa por un período de consolidación, durante el cual la traza mnésica adquirida se estabiliza. La evocación de la memoria se refiere a la activación de la traza mnésica que codifica la memoria adquirida y consolidada. Esta evocación, dependiendo de diversas variables, puede desencadenar la expresión de la memoria y al menos otros dos procesos: la reconsolidación o la extinción.

La adquisición de la memoria ocurre cuando se experimenta un evento o información novedosa. Durante esta etapa, se incorporan datos o información nueva mediante su codificación en circuitos neuronales. Para que la memoria perdure en el tiempo, es necesario que la misma atraviese la etapa de consolidación. En esta fase, la memoria se almacena en los circuitos neuronales a través de modificaciones bioquímicas y morfológicas en la sinapsis en ciertas regiones cerebrales.

En las últimas dos décadas, la idea predominante sobre la estabilización y el mantenimiento de la información contempla dos procesos continuos y dinámicos diferentes: la consolidación sináptica o celular y la consolidación de sistemas. La consolidación sináptica implica eventos moleculares y celulares que ocurren poco después del entrenamiento y que duran varias horas hasta algunos días en regiones cerebrales específicas involucradas en la adquisición (McGaugh, 2000). Durante la misma se produce un aumento en la transcripción génica y la síntesis proteica, llevando finalmente a modificaciones en la sinapsis (Asok y col., 2019). Por otro lado, la consolidación de sistemas es más lenta durando desde semanas hasta meses. Este tipo de consolidación implica una reorganización de las estructuras cerebrales vinculadas a la memoria. La teoría de consolidación de sistemas postula que, en un principio, la memoria episódica depende del hipocampo y la corteza. A medida que transcurre el tiempo se producen cambios que conllevan a la reorganización del sistema e independizan a la memoria del hipocampo (Frankland y Bontempi, 2005).

Finalmente, la evocación es necesaria para poder recordar la información guardada. La presencia de ciertas claves o estímulos que funcionan como recordatorio, producen la reactivación de la traza, lo cual puede expresarse en un comportamiento particular asociado a la memoria (Sara, 2000). Poco se conoce acerca del mecanismo molecular de expresión de la memoria. Se ha descrito que la evocación de la memoria requiere la actividad de la proteína quinasa A (PKA) y la activación de las quinasas reguladas extracelularmente 1/2 (ERK1/2), pero no la de la quinasa de calcio/calmodulina dependiente tipo II (CaMKII) (Szapiro y col., 2000, 2002). Recientemente se ha demostrado que la síntesis en curso de proteínas estaría implicada en el tráfico a la membrana del receptor de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), mediado por la actividad del receptor N-metil-D-aspartico (NMDA), que tiene lugar durante la recuperación de la memoria (Lopez y col., 2015). En concordancia, se ha comprobado que la expresión de la memoria aversiva y espacial está controlada por el complejo de diana de rapamicina en mamíferos complejo 1

(mTORC1), un complejo proteico involucrado en la regulación de la síntesis de proteínas (Pereyra y col., 2018)

La propia evocación de un recuerdo puede producir modificaciones sobre el mismo. Si durante la reactivación de la traza se presenta información adicional o conflictiva con el recuerdo, puede desencadenar la reconsolidación de la memoria. Durante este proceso la traza vuelve a un estado lábil (Bonin y De Koninck, 2015; Nader, 2015) y para fijar la memoria se requiere de transcripción génica (Nader, 2003) y síntesis de proteínas (Nader y col., 2000). Otro fenómeno que puede suceder luego de la evocación de la memoria es la extinción de esta. Durante la extinción se forma una nueva traza, que inhibe gradualmente la expresión de la traza original pero sin borrarla. Esto sucede por la evocación explícita no reforzada, de esta forma se produce un nuevo aprendizaje. Sin embargo, la traza original puede ser recuperada mediante alguna clave recordatoria o recreando la situación del aprendizaje original (Myers y Davis, 2002).

En este trabajo de tesis, nos enfocaremos en estudiar los procesos de expresión de memorias y su influencia en la persistencia de memorias espaciales, evaluadas tanto en roedores como en humanos.

De la plasticidad sináptica a la memoria

Es ampliamente aceptado que la actividad neuronal inducida por el aprendizaje provoca cambios en la fuerza de las conexiones sinápticas dentro del cerebro. Estos cambios se consideran el mecanismo fundamental por el cual se codifican y almacenan las trazas de memoria. Algunos patrones de actividad sináptica en el cerebro producen un aumento o disminución duradero/a en la eficacia sináptica, conocido como potenciación de largo término (LTP) o depresión de largo término (LTD) respectivamente. Estos fenómenos son considerados como un mecanismo neuronal subyacente al almacenamiento de ciertas memorias, ya que existe un gran paralelismo entre los procesos de LTP/LTD y los procesos de formación de una memoria (Izquierdo y col., 2006; Martin y Morris, 2002). Del mismo modo que existen memorias de corto y largo plazo, es posible inducir una potenciación o una depresión de corto plazo o temprana (e-LTP/e-LTD), independiente de transcripción y traducción, y otra de largo plazo o tardía (l-LTP/l-LTD), dependiente de transcripción génica y de síntesis de nuevas proteínas relacionadas con la plasticidad (PRPs) (Malenka y Nicoll, 1999). El hecho de que la plasticidad sináptica y los procesos de memoria comparten gran parte de la mecánica y de que el bloqueo de la maquinaria molecular que impide el establecimiento de cambios plásticos impida el establecimiento de MLT, avala fuertemente la idea de que los cambios plásticos en las sinapsis son el sustrato de

ciertas memorias (Bourtchuladze y col., 1994; Guzowski y McGaugh, 1997; Kandel, 2001; Silva y col., 1998; Taubenfeld y col., 1999).

La “hipótesis de plasticidad sináptica y memoria” sostiene que un cambio plástico dependiente de la actividad se induce en las sinapsis apropiadas durante la formación de la memoria. Estos cambios plásticos deben ocurrir en las áreas del cerebro donde se está procesando la memoria y son tanto necesarios como suficientes para el almacenamiento de la información (Martin y Morris, 2002). Sin embargo, ¿cómo se logra la especificidad sináptica relacionada con una memoria particular?

En 1997 Frey y Morris (U. Frey & Morris, 1997) postularon la hipótesis del “Etiquetado Sináptico y Captura” (STC), proponiendo que los productos de la expresión génica son distribuidos a lo largo de la neurona, pero que su función relacionada con la fuerza sináptica ocurre solamente en aquellas sinapsis “etiquetadas” por una activación previa, debido a alguna estimulación. El rol de esta etiqueta es el de capturar PRPs necesarias para establecer un cambio duradero en la fuerza sináptica. Los primeros experimentos para evaluar esta hipótesis utilizaron rodajas de hipocampo y la estimulación diferencial de dos vías convergentes sobre el mismo sustrato neuronal en la región CA1 hipocampal. De esta manera se evidenció que la vía estimulada débilmente (que induce solo e-LTP) establecía etiquetas que capturaban las PRPs provenientes de la estimulación fuerte recibida desde la otra vía, siendo éste el mecanismo que permitió el establecimiento del LTP.

Es decir, que estímulos suaves pueden inducir cambios duraderos si son combinados con estímulos fuertes, siempre y cuando las etiquetas sinápticas generadas interactúen con las PRPs necesarias para estabilizar dichos cambios. Estos modelos determinan que existe un período de tiempo limitado en el cual un estímulo fuerte sobre una de las vías puede promover la formación de una potenciación duradera en la otra vía. La ventana temporal se debe a la duración de la etiqueta sináptica, a la cinética de la síntesis y distribución de las PRPs, así como a la vida media de éstas en la célula. Además, debe haber una convergencia espacio-temporal entre estos fenómenos y es indistinto el orden en que son desencadenados (U. Frey & Morris, 1998; K. C. Martin & Kosik, 2002).

La visión actual considera la etiqueta como un conjunto de moléculas que tienden a modificar la morfología de la dendrita (S. Frey y Frey, 2008; Redondo y Morris, 2011). Varias proteínas quinasas como PKA, CAMKII α y PKM ζ han sido propuestas como candidatos para la maquinaria de etiquetado (Frey y Frey, 2008; Martin y Kosik, 2002; Moncada y Viola, 2007; Redondo y Morris, 2011). Existen varios criterios que debe cumplir una etiqueta sináptica (Lu y col., 2008, 2011; Martin y Kosik, 2002): activarse mediante una estimulación débil o fuerte; tener vida útil transitoria (menos de 2 horas);

su activación no requiere síntesis de proteínas; se induce de manera específica para un determinado estímulo y es relativamente inmóvil; y finalmente, una etiqueta debe interactuar con (y por lo tanto capturar) PRPs para establecer la I-LTP. Se ha sugerido que varios procesos moleculares que cumplen estos criterios participan en el establecimiento de etiquetas sinápticas (Barco y col., 2008), incluyendo entre otros la activación de proteínas quinasas, la liberación de factores neurotróficos, cambios en los canales iónicos, y cambios estructurales (Fig. I 3).

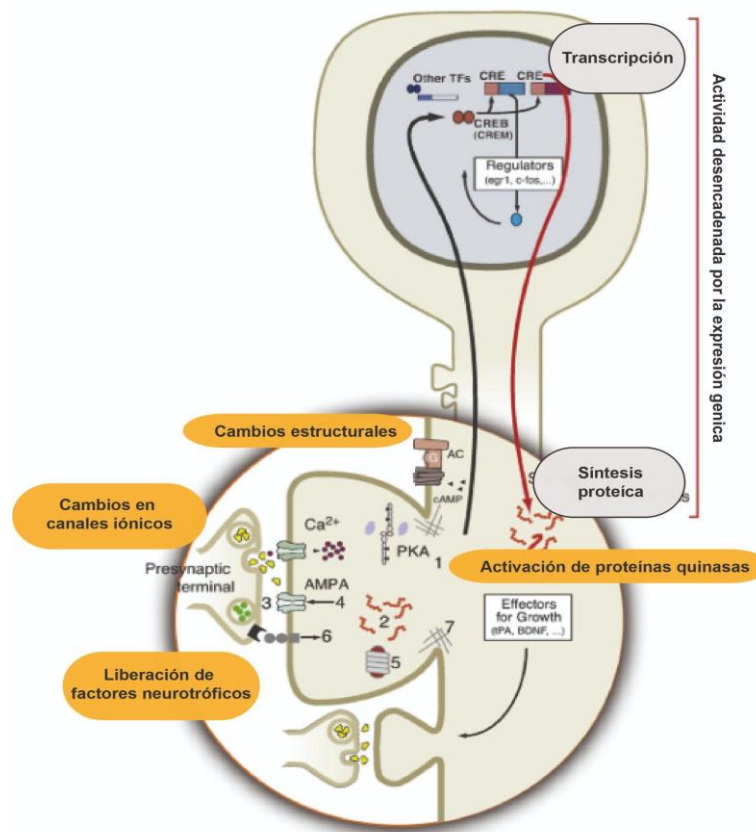


Figura I.3 Redes moleculares subyacentes al etiquetado sináptico. El esquema representa distintos mecanismos moleculares de etiquetado sináptico propuestos en las neuronas sensoriales de *Aplysia* o en las neuronas piramidales CA1 de roedores. Adaptado de (Barco y col., 2008).

Hipótesis del Etiquetado conductual (EC)

Al considerar los mecanismos de etiquetado sináptico y captura, se podría postular que un aprendizaje particular lleva a la activación de conjuntos específicos de sinapsis dentro de la red neuronal. Esta activación, a su vez, podría establecer una

marca (la "etiqueta de aprendizaje") para señalar el lugar donde se requieren las PRPs para consolidar la memoria. Por lo tanto, un aprendizaje que induce MLT debería establecer las etiquetas y sintetizar las PRPs, luego la abolición de alguno de esos procesos debería resultar en un deterioro de la MLT. Esta hipótesis fue probada por nuestro grupo de trabajo mediante la disección de los mecanismos de etiquetado y síntesis de PRPs, a través de la asociación de dos experiencias conductuales distintas. Una de ellas fue una "experiencia de aprendizaje débil", que forma una MCT independiente de la síntesis de proteínas y, que presumiblemente, establece etiquetas de aprendizaje. La otra fue una "experiencia fuerte", que también es capaz de inducir la síntesis de PRPs. Los experimentos seminales demostraron que este aprendizaje débil podría consolidarse en una MLT si, dentro de una ventana temporal crítica en torno al aprendizaje, los animales también experimentaron un evento conductual fuerte y distinto. Este proceso, que depende de la síntesis de proteínas inducida por la experiencia fuerte, sugiere que el entrenamiento débil establece etiquetas de aprendizaje capaces de capturar esas proteínas, facilitando así la formación de una traza mnésica duradera. A su vez, proporcionó la primera evidencia de un proceso de Etiquetado Conductual (EC) subyacente a la formación de memorias duraderas (Moncada y Viola, 2007).

La idea principal que subyace a los procesos de EC es que las PRPs se utilizan para originar cambios duraderos cuando son captados por etiquetas específicas de aprendizaje (Fig. I 5). El fundamento de esta hipótesis se basa en los siguientes principios (Moncada y Viola, 2015):

- El establecimiento de etiquetas capaces de captar las PRP para establecer memorias duraderas. Estas etiquetas indican los sitios activados por el aprendizaje, fijan la especificidad local y definen la información a almacenar.
- La síntesis de las PRP necesarias para consolidar la traza mnémica. Estas proteínas pueden ser suministradas por la misma experiencia de aprendizaje que establece la etiqueta (si es lo suficientemente fuerte) o por otro evento independiente asociado a ella.
- Tanto las etiquetas como las PRP tienen una duración limitada.
- Para que se produzca el proceso de captura, las etiquetas y los PRP deben coexistir en el mismo sustrato neural.
- El proceso presenta simetría; así, la captura de PRPs es posible independientemente que su síntesis se produzca antes o después del establecimiento de la etiqueta.

Luego de 17 años desde la postulación de la hipótesis del EC, Viola y col (2024) compilan la bibliografía sobre sus implicancias en la formación y persistencia de diversos tipos de memorias, y profundizan en los mecanismos asociados al establecimiento de etiquetas y la síntesis de proteínas.

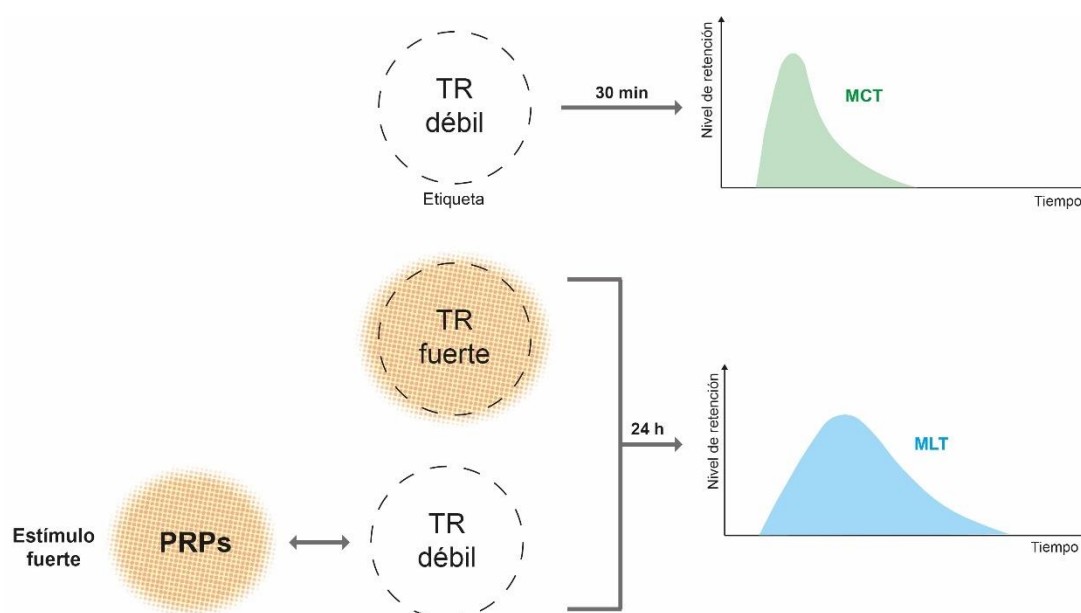


Figura 1.5 Etiketado conductual. Una tarea de aprendizaje débil (TR débil) que solo induce MCT genera una etiqueta (línea punteada). Por otro lado, una tarea de aprendizaje fuerte (TR fuerte) que induce MLT genera una etiqueta y estimula la síntesis de PRPs (sombreado naranja). Al combinar una experiencia de alta saliencia (por ejemplo, una exploración a un campo abierto) que induce la síntesis de proteínas, con un TR débil se promueve la MLT relacionada con dicho TR. Ambas tareas deben ser procesadas en las mismas estructuras cerebrales y dentro de una ventana de tiempo acotada, para que las etiquetas del aprendizaje débil puedan capturar las PRPs y de esta forma consolidar la memoria duradera de esta experiencia. Incluso el orden en que se experimenten puede ser indistinto (indicado por la flecha de doble sentido).

El estudio del EC en memorias de REO

El fenómeno de EC ha sido observado por diversos grupos de investigación en diferentes abordajes de memorias tanto aversivas, como espaciales y apetitivas (Ballarini y col., 2009; Cassini y col., 2013; Dong y col., 2012; Wang y col., 2010). Incluso, esta hipótesis permite explicar diversas características de las memorias como son la formación, persistencia, interferencia retrógrada, reconsolidación o reforzamiento

(Almaguer-Melian y col., 2012; Bae y Richardson, 2018; Budriesi y col., 2023; de Carvalho Myskiw y col., 2014; Dong y col., 2012; Gros y Wang, 2018; Liu y col., 2015; Lu y col., 2011; Martínez y col., 2012; Moncada y col., 2011; Naseem y col., 2019; Schroeder y col., 2023; Tintorelli y col., 2020; Tomaiuolo y col., 2015). En este trabajo de tesis utilizaremos la tarea de REO para identificar el proceso por el cual el aprendizaje espaciado promueve la persistencia de la MLT. Nuestra hipótesis propone que el re-entrenamiento remarcará los sitios inicialmente etiquetados y utilizará PRPs provenientes del proceso de expresión de la memoria para sostener la plasticidad neuronal que sustenta la traza.

En relación con este trabajo de tesis, nos centraremos en describir algunos experimentos realizados en roedores entrenados en REO, discutiendo los resultados en el contexto de la hipótesis del EC. Estas memorias desempeñan un papel central en nuestra vida diaria, ya que codifican una representación espacial interna del mundo, guiando la navegación y el camino para encontrar o evitar lugares o cosas particulares. En este sentido, la región hipocámpal, que incluye las regiones CA, el giro dentado y el complejo subicular, forma parte de un sistema de estructuras anatómicamente relacionadas en el lóbulo temporal medial, que es importante para la memoria en mamíferos (Broadbent y col., 2004; Buzsáki y Moser, 2013). Dentro de este lóbulo, el hipocampo cumple un rol fundamental para relacionar o combinar información de múltiples fuentes, como se requiere en ciertas tareas de memoria espacial (O'Keefe, 1978).

En los primeros experimentos del grupo se observó que un entrenamiento débil (REOd) que solo induce una MCT podía resultar en una memoria duradera cuando se asociaba con la exploración de un campo abierto (CA) novedoso. La sesión en el CA fue capaz de promover la formación de REO-MLT proporcionando PRPs recién sintetizadas. El efecto promotor sobre la MLT dependía de la naturaleza novedosa del CA y estaba restringido a una ventana temporal crítica, que se extiende desde 1 hora antes hasta 2 horas después del REOd (Ballarini y col., 2009).

También demostramos que el estrés puede modular los procesos de memoria de REO. En el trabajo de Lopes da Cunha y col. (2019) se comprobó que las ratas que experimentaron una sesión en una plataforma elevada 1 hora después de un entrenamiento de REOd consolidaron una MLT. El efecto inducido por el estrés dependía de la activación de los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal. Además, el evento de estrés experimentado antes del entrenamiento

inducía una interferencia anterógrada. Dado que en este caso la amnesia no se revirtió con una exposición posterior a un CA, es probable que el estrés pueda afectar el establecimiento de la etiqueta de aprendizaje de REO. Por otro lado, en Tintorelli y col. (2020) observamos la promoción de la MLT en la tarea de REO cuando dos sesiones de entrenamiento débiles e idénticas de REO se separan con un intervalo entre ensayos de 15 minutos a 7 horas. Los resultados sugirieron que el re-entrenamiento principalmente volvería a etiquetar los sitios activados por el aprendizaje y que los mecanismos intracelulares desencadenados por cada sesión se sumarían, alcanzando así el umbral para la síntesis de proteínas requerida para la consolidación de la memoria.

Aquí, develaremos los mecanismos del aprendizaje espaciado de REO requeridos para promover la persistencia de memorias consolidadas, analizando los resultados bajo el marco conceptual del EC.

El estudio del EC en humanos

Hasta la actualidad, existen pruebas consistentes de que las memorias duraderas en roedores dependen de mecanismos de EC. Incluso, investigaciones de nuestro grupo sugieren la existencia de un proceso como éste operando en la formación de MLTs en humanos. Usando aproximaciones conductuales similares a las mencionadas, se analizó la memoria para actividades gráficas o literarias en estudiantes al ser combinadas con experiencias novedosas (Ballarini y col., 2013). Los resultados indicaron que aquellos grupos de estudiantes que asistieron a una lección novedosa sobre ciencia o música presentaron importantes mejoras en la MLT para cualquiera de las actividades. El efecto fue observado cuando la novedad se presentó una sola vez y no en más ocasiones (es decir cuando se tornó familiar). Además, al igual que en los modelos de roedores, el efecto de la novedad fue simétrico y se restringe a una ventana temporal crítica y cercana al entrenamiento. Este trabajo demostró que el uso de experiencias pedagógicas novedosas puede potenciar la memoria de diferentes actividades que los alumnos realizan durante las horas de clase con sus profesores.

En un trabajo posterior se extendieron estos resultados a estudiantes de secundaria, evaluando el contenido acerca de figuras geométricas en una tarea de aprendizaje y memoria visual. Utilizando diferentes experiencias novedosas (ceguera atencional o clase de educación sexual), se demostró que la novedad experimentada 1 h, pero no 4 h, antes o después del aprendizaje en el aula con su profesor, mejoraba

esta memoria a las 24 h y que este efecto permanecía durante al menos 45 días. Además, se observó que si los alumnos asistían a una clase novedosa 11 h, pero no 4, 8 o 24 h, después del aprendizaje, mejoraba la persistencia de la memoria evaluada 7 días después (Ramirez Butavand y col., 2020).

Luego, se realizó una estrategia similar para evaluar el efecto del estrés leve en esta memoria gráfica. Lopes da Cunha y col. (2018) utilizaron los exámenes escolares como estresores leves para los estudiantes, y los asociaron de forma retardada con sesiones de entrenamiento débil o fuerte a una tarea gráfica. Los resultados mostraron un doble efecto de los exámenes sobre la memoria. En el caso del entrenamiento débil, realizar un examen 1 h después del entrenamiento mejoró la memoria 24 h después. Sin embargo, este efecto no se producía cuando el examen se realizaba 1 h antes. En oposición, la asistencia a exámenes dentro de 1 h de una sesión de aprendizaje fuerte deterioró la expresión MLT, independientemente de que ocurriera antes o después del entrenamiento.

Los resultados de Schomaker y col. (2014) utilizando una tarea de aprendizaje de palabras, evidenciaron que cuando las personas atravesaron previamente la exploración virtual de un ambiente novedoso, se mejoró la memoria de las palabras durante la fase de evocación. El trabajo de Dunsmoor y col., (2015), por otro lado, apoya también un mecanismo de EC operando en humanos, al mostrar que una experiencia saliente asociada con un aprendizaje débil mejora la MLT. En este estudio realizado con adultos, los individuos fueron expuestos a imágenes de dos categorías y luego un shock fue pareado con imágenes pertenecientes a una de las categorías en particular; un nuevo set de imágenes fue mostrado y 24 hs después el test reveló una mejor memoria, selectivamente, para las imágenes de la misma categoría que aquellas pareadas con el shock. Mediante este condicionamiento observaron que eventos significativos pueden preservar selectivamente la memoria de información que parecía insignificante en el momento en que se codificó, y que requiere un periodo de consolidación. Por último, un trabajo más reciente de Baumann y col., (2020) evaluó una estrategia de EC utilizando una prueba de memoria de aprendizaje verbal (VLMT) en niños y adolescentes que padecían trastornos por déficit de atención con hiperactividad (TDAH). Combinaron la sesión de entrenamiento con la exploración de un entorno virtual novedoso o familiar en el juego Minecraft (45 minutos después). Los pacientes con TDAH mostraron una desventaja significativa en las pruebas de retención de memoria en comparación con los niños con desarrollo típico. Sin embargo, los pacientes que exploraron el entorno novedoso tuvieron una retención significativamente mejor que aquellos que exploraron

el entorno familiar. Además, los pacientes con TDAH expuestos a la novedad virtual lograron un rendimiento en las pruebas de retención equivalente al de los niños con desarrollo típico, independientemente del tipo de entorno explorado. Al igual que los experimentos realizados por Ballarini y col. (2013) y Dunsmoor y col. (2015), el efecto de la mejora solo fue evidente cuando la retención original era baja. En esos casos, la mejora se produjo en contenidos difíciles de recordar y en personas débilmente entrenadas o en el grupo TDAH.

Como hemos observado en investigaciones tanto de nuestro laboratorio como de otros grupos, el proceso de etiquetado y captura encuentra apoyo en paradigmas de memorias aversivas y no aversivas, condicionamientos clásico y operante, tareas de reconocimiento espacial, así como en memorias dependientes del hipocampo y la corteza. Además, estos estudios no solo se han realizado en modelos murinos, sino también en humanos, lo que sugiere firmemente que el EC es un mecanismo clave en la formación de MLT.

El estudio de los procesos de etiquetado y síntesis de proteínas

De acuerdo con la hipótesis de EC, el establecimiento de una etiqueta de aprendizaje y la síntesis de PRP son necesarios para la consolidación de una memoria duradera. Una maquinaria de receptores, segundos mensajeros y proteínas estructurales apuntan a ser parte de los mecanismos celulares capaces de sostener estos procesos. Como se detalló anteriormente, la etiqueta se considera como un conjunto de procesos y cambios sinápticos locales esenciales para capturar y utilizar las PRPs disponibles, almacenando la información a largo término. Cualquier evento proveedor de PRPs permitirá la formación de la MLT en aquellos lugares donde existan etiquetas, pero si alguna intervención es capaz de interrumpir el establecimiento o mantenimiento de la etiqueta, generará amnesia. Considerando estas premisas, pueden llevarse a cabo diferentes protocolos para evaluar el rol de algunas moléculas ya sea en el establecimiento de la etiqueta y/o en la inducción de la síntesis de PRPs. Por ejemplo, si se combina un entrenamiento débil, capaz de generar una etiqueta del aprendizaje, con eventos lo suficientemente salientes que sintetizan las PRPs, se podrá identificar aquellos mecanismos relacionados con la etiqueta aplicando fármacos en tiempos circundantes al entrenamiento débil; o con los de síntesis de PRPs al aplicar inhibidores de síntesis proteica en momentos cercanos al evento fuerte. Si se genera amnesia por escasez en la síntesis de proteínas, esperaríamos que un segundo evento dador de

PRPs revierta la situación. Por otro lado, la administración de drogas cerca del evento débil puede interferir con la etiqueta y también generar amnesia, y en ese caso la provisión de PRPs no podrá prevenirla ni revertirla. Una alternativa adicional es estudiar situaciones de aprendizaje fuerte, que llevan a la consolidación de una MLT; por lo tanto, no solo establecen la etiqueta sino que disparan las síntesis de PRPs. La infusión de drogas próxima a este momento puede interferir con cualquiera de los dos procesos e impedir la formación de MLT, pero sí un segundo evento es capaz de proveer nuevas PRPs y aún así se observa amnesia, posiblemente el efecto perjudicial afectó a la etiqueta conductual. En este trabajo, se utilizarán protocolos de intervención administrando fármacos previos al re-entrenamiento o al test, para investigar la participación y características de las etiquetas y PRPs. El objetivo es describir los mecanismos involucrados en la persistencia de la MLT tras entrenamientos espaciados.

El enfoque más actual considera la etiqueta como un ensamble de moléculas que tienden a modificar la morfología de la dendrita (Frey y Frey, 2008; Martin y Kosik, 2002; Redondo y Morris, 2011). ¿Cuáles podrían ser los componentes? De acuerdo a experimentos de plasticidad sináptica como de aprendizaje y memoria, dos características resultan importantes de la etiqueta: su establecimiento es independiente de síntesis proteica y su duración es transiente (Frey y Morris, 1997; Moncada y col., 2011; Sajikumar y col., 2007; Viola y col., 2014). Las quinasas son buenos candidatos debido tanto a su rápida activación como su velocidad para modificar la respuesta de receptores y la morfología estructural. Entre estas, α CAMKII, PKA, and ERK 1/2 fueron muy estudiadas en los procesos de formación de MLTs (Izquierdo y col., 2006; McGaugh, 2000; Medina y Viola, 2018). Su rol fue evaluado en la tarea de evitación inhibitoria (EI) y los resultados sugieren que α CAMKII y PKA, junto con PKMz, pero no las ERK 1/2, tienen un rol esencial en el establecimiento de su etiqueta conductual (Moncada y col., 2011). En este sentido, también se observó que las vías de señalización de CaMKs y PKA son necesarias para el proceso de etiquetado en la formación de la EI-MLT a través del aprendizaje espaciado. Mientras que las vías de ERK 1/2 y PKA son necesarias para la síntesis de proteínas en la formación de estas memorias. (Budriesi y col., 2023). Además, se caracterizó que las etiquetas de reconsolidación ya sea de EI- o REO-MLTs, inducidas por sus respectivas sesiones de reactivación, eran dependientes de la activación de PKA (Orlandi y col., 2020).

Por otro lado, y de gran importancia para considerar en este trabajo de tesis, se observó que las quinasas ERKs1/2 desempeñan un papel dual en la formación de la memoria REO-MLT, tanto induciendo la síntesis de proteínas como estableciendo la

etiqueta de aprendizaje REO (Tintorelli y col., 2020). Por el contrario, durante la reconsolidación de esta misma memoria se observó que ERK1/2 desempeñaba un papel en la síntesis de PRPs, mientras que PKA está implicada al menos en el establecimiento de las etiquetas de reconsolidación de REO (Rabinovich Orlandi y col., 2020). Otras evidencias acerca de la maquinaria de etiquetado provienen de experimentos que estudian el papel del receptor de BDNF, TrkB. Ensayos realizados con paradigmas de EI (Lu y col., 2011) lo postulan como un potencial componente de la etiqueta sináptica y del aprendizaje.

En cuanto a las PRPs, una de las candidatas es la proteína asociada al citoesqueleto Arc, cuyo gen se activa luego de la estimulación tanto a nivel de LTP como de muchos tipos de aprendizaje (Barco y col., 2008; Bramham y col., 2010). Ha sido demostrado que participa en la formación y consolidación de diversos tipos de memorias, procesadas en distintas regiones del cerebro y que dependen de estímulos de modalidad variada. Mediante su interacción con las proteínas que modifican la estructura del citoesqueleto en las terminales dendríticas, Arc forma parte de los procesos de plasticidad sináptica (Bramham y col., 2010; Tzingounis y Nicoll, 2006; Wibrand y col., 2012). Un experimento ha permitido observar efectos deletéreos en la promoción de la memoria de EI al limitar con un mRNA antisense la cantidad disponible de Arc, inducida por la exploración a un ambiente novedoso, lo cual sugiere a Arc como una de las PRPs necesarias para promocionar la MLT de EI (Martínez y col., 2012).

Otras proteínas candidatas como PRPs son CREB y BDNF, río abajo de cascadas de señalización que involucran moléculas como PKA (propuesta como parte de la etiqueta), claves en procesos de plasticidad neuronal e involucradas en la consolidación de distintas memorias (Barco y col., 2008; Bekinschtein y col., 2013; Bourtchuladze y col., 1994; Josselyn y coll., 2001). Por otro lado, estudios en los que un evento novedoso genera promoción de MLTs han apoyado la participación de los receptores de dopamina D1/D5 o β -adrenérgicos en la inducción de las PRPs (Moncada, 2016; Moncada y col., 2011). En concordancia, el efecto promotor del CA en la extinción de la memoria CFC también se bloqueó antagonizando las vías β -adrenérgicas en el hipocampo antes de la novedad (Liu y col., 2015). En este sentido, los receptores dopaminérgicos y adrenérgicos desencadenan diferentes cascadas de segundos mensajeros que pueden dar lugar a la expresión de genes. Por lo tanto, es razonable pensar que la novedad podría inducir la síntesis de PRPs a través de la activación de estos tipos de receptores.

Por último, en relación con la hipótesis planteada para el desarrollo del Capítulo 1, que sugiere que el mecanismo asociado a la expresión de la REO-MTL le provee las PRPs a las etiquetas re-establecidas por el re-entrenamiento, y considerando la importancia de las subunidades del receptor AMPA en la expresión de dicha memoria, investigaremos si estas proteínas desempeñan un papel fundamental en el fenómeno de la promoción de la persistencia de la REO-MLT tras re-entrenamientos espaciados.

La persistencia de la memoria

La persistencia es uno de los atributos principales de la MLT y se refiere a su duración pasado el periodo de su formación. ¿Qué se conoce sobre sus mecanismos? Se observó que el hipocampo está involucrado en el procesamiento de la MLT luego de su formación. En este sentido, se ha descubierto que los eventos moleculares que tienen lugar en el hipocampo 12 horas después de la adquisición están involucrados en la persistencia de memorias aversivas o apetitivas. Varios estudios demostraron que la persistencia de la memoria, evaluada siete días después del entrenamiento fuerte de EI dependía de BDNF y de la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal, que se producía en una fase tardía de formación de la memoria, 12 h después del entrenamiento (Bekinschtein y col., 2007, 2008; Kramar y col., 2014; Rossato y col., 2009). Es decir que un modo de mejorar la duración de la memoria es actuar sobre ciertos mecanismos específicos varias horas luego de un aprendizaje. Por el contrario, si se interfiere con estos mecanismos, la memoria se forma pero no persiste, de tal modo que se observa su expresión al día pero no a la semana.

Dentro del marco conceptual del EC, se postuló que existiría un “re-etiquetado” de sitios específicos que se produciría tardíamente tras el entrenamiento; así, esta “etiqueta de mantenimiento” podría permitir la captura de estos PRPs tardíos que conducen a la persistencia de la memoria. Basándose en el efecto promotor de la exploración de un CA novedoso en la formación de la EI-MLT (Moncada y Viola, 2007) y la ventana tardía de síntesis de proteínas después de un entrenamiento fuerte de EI, se investigó si era posible promover una memoria persistente por la exploración de un CA novedoso alrededor de las 11 h después de una sesión moderada de EI. La exposición a la novedad fue eficaz para extender la persistencia de la MTL de EI solo cuando se produjo alrededor de las 11 h después del entrenamiento de EI, y fue ineficaz fuera de esta ventana temporal (Tomaiuolo y col., 2015). Esto sugiere no solo la

importancia del suministro de PRPs, sino del sistema de “re-etiquetado” para utilizar los productos derivados de la experiencia novedosa. Este efecto sobre la persistencia de la memoria requiere la activación de los receptores de dopamina D1/D5 y la expresión de Arc en el hipocampo dorsal en torno a la exploración del CA (Tomaiuolo y col., 2015). Trabajando con otra tarea de aprendizaje aversivo y en línea con estos resultados, se observó que tanto un evento estresante como la administración de corticosterona 12 h después de un condicionamiento contextual de miedo prolonga selectivamente la persistencia de esta MLT (Yang y col., 2013). La existencia de una etiqueta de mantenimiento tardía pero transitoria, abre una ventana de oportunidad tardía para modificar la durabilidad de los recuerdos mediante eventos que ocurren muchas horas después de la experiencia de aprendizaje.

Existen otras estrategias para mantener la traza de la memoria que incluyen exponer al animal a un evento recordatorio, como una sesión de prueba o una sesión de re-entrenamiento. Algunos recordatorios inducen la reconsolidación de la memoria, lo que se refiere al proceso de desestabilización/reestabilización de una memoria después de su activación (Rodríguez-Ortiz y col., 2012). Esto hace que la MLT reactivada sea transitoriamente sensible a agentes amnésicos que son efectivos durante el proceso de consolidación (Haubrich y Nader, 2016). En general, estos recordatorios se realizan un día después del aprendizaje y pueden fortalecer o preservar la traza de la memoria cuando se evalúa 24 horas después de la sesión de reactivación (Tronson y Taylor, 2007). Sin embargo, no hay muchas evidencias sobre si el fenómeno de la reconsolidación de la memoria media la persistencia de la MLT medida varios días después de la reactivación. En este sentido, Orlandi y col. (2020) demostró que un evento recordatorio, que labiliza la traza mnésica, establece una etiqueta neural que permite la reconsolidación de la memoria tras la unión de proteínas proporcionadas por la experiencia original o por una experiencia contigua diferente.

En este trabajo de tesis estudiaremos las condiciones y los mecanismos que permiten promover la persistencia de una MLT, utilizando la estrategia de re-entrenamientos espaciados.

Entrenamiento espaciado

Repetir una dada experiencia no siempre conlleva a formar una mejor memoria de la misma. El tiempo entre las experiencias es crucial para favorecer la formación de una memoria duradera. Sin embargo, es necesario resolver los siguientes tópicos: ¿Cuál es el intervalo de tiempo adecuado para mejorar la memoria inducida por

repetidos aprendizajes? ¿Cuáles son los procesos que se desencadenan y deben “acoplarse” para lograr la efectividad?

Los primeros reportes acerca de la efectividad en la formación de memoria por el uso de varias sesiones de entrenamiento espaciadas en el tiempo respecto de un protocolo sin intervalos datan de principios del siglo pasado. Los ensayos de Ebbinghaus (2013) en humanos se realizaron testeando la memoria adquirida acerca de una lista de palabras. 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 y col., 2006). Estas observaciones fueron también confirmadas con otros protocolos en modelos animales tan diversos como *Aplysia*, mosca, abeja, roedores y primates no humanos (Beck y col., 2000; Bello-Medina y col., 2013; Menzel y col., 2001; Pagani y col., 2009; Philips y col., 2013; Robbins y Bush, 1973; Smolen y col., 2016). Luego de una centuria de experimentación en esta área, se pueden sacar dos grandes conclusiones: que el fenómeno promnésico inducido por reentrenamientos espaciados está evolutivamente conservado y que no se conocen claramente las bases neurobiológicas de este fenómeno.

Tanto la formación como la persistencia de las memorias pueden ser facilitadas por el entrenamiento espaciado, que involucra largos intervalos entre ensayos (ITI), y ello es superior al entrenamiento masivo, que implica intervalos cortos o nulos. Esta superioridad se ha explicado mediante tres teorías cognitivas basadas en la codificación, el procesamiento o la evocación de la información aprendida (Smolen y col., 2016). En particular, la teoría de evocación de la fase de estudio postula que cada ensayo espaciado provoca la recuperación de una traza de memoria que fue formada por el ensayo anterior y, por lo tanto, la memoria puede ser reforzada. Esta teoría nos llevó a investigar si los mecanismos moleculares de expresión de la memoria desencadenados por la evocación son necesarios para promover la persistencia de la memoria a través del aprendizaje espaciado.

En este trabajo, estudiaremos el fenómeno de los efectos benéficos de entrenamientos espaciados sobre la persistencia en la memoria bajo el marco conceptual de la hipótesis del EC. Para ello, es necesario demostrar que depende de los procesos de marca y síntesis proteica y que bloqueando alguno de ellos, los efectos de los re-entrenamientos desaparecen. Uno de los postulados considerados para este estudio, refiere a que el re-entrenamiento activará o remarcará los sitios inicialmente etiquetados, y que las PRPs existentes serían utilizadas en esos sitios en beneficio de la memoria. Una sesión de test utilizada como segunda sesión presenta diferencias con una de re-entrenamiento, debido a que el animal no recibe la totalidad de los estímulos

experimentados durante su entrenamiento. Por lo tanto, es posible que dicha situación novedosa presente una competencia (que en el caso de reentrenamiento no existiría por tratarse de las mismas marcas y la misma memoria) por el uso de recursos al momento de la expresión.

Un aspecto clave de la naturaleza dinámica de las memorias es que tanto la consolidación, reconsolidación y la extinción de la memoria son procesos sensibles a la inhibición de la síntesis proteica (Berman y Dudai, 2001; Bouton, 2004; Pedreira y Maldonado, 2003; Suzuki y col., 2004; Trent y col., 2015). Es por ello que cuando la memoria es activada en una situación igual o parecida a la que el animal aprendió, procesos de competición o cooperación por los recursos pueden ocurrir en los ensambles neuronales específicos para cada caso. La hipótesis del etiquetado conductual incorpora la figura de la marca o etiqueta dentro de esos ensambles como señalizadores de los sitios específicos donde utilizar esos recursos, y así dirigir la memoria hacia los diferentes destinos.

Estudios de re-entrenamientos en humanos

El aprendizaje y la memoria son funciones cerebrales cognitivas fundamentales en nuestro contexto educativo. Encontrar diferentes estrategias didácticas para mejorar el desempeño de los estudiantes es un tema de gran relevancia en el aula. Una de estas estrategias es repetir instancias de aprendizaje y prueba sobre un tema determinado para recordarlo mejor. Sin embargo, es necesario prestar atención al número y tipo de sesiones de aprendizaje y al espaciamiento entre ellas (ITI), ya que estas variables son cruciales para optimizar la formación y persistencia de la memoria.

La longitud del ISI es un parámetro fundamental que influye en la duración de la memoria. Investigaciones sobre la memoria declarativa demostraron que intervalos más largos entre sesiones conducen a una memoria más duradera (Kapler y col., 2015; Küpper-Tetzel y col., 2014). En este sentido, Cepeda y col. (2008), utilizando un protocolo de dos sesiones de aprendizaje mostraron que, para recordar por más tiempo, la brecha óptima entre las sesiones debía ser mayor.

El aprendizaje puede llevarse a cabo utilizando solo sesiones de re-entrenamientos o bien protocolos que involucren entrenamientos y testeos. Desde Gates (Gates, 1917) se ha observado que la memoria puede ser reforzada por la práctica basada en la recuperación, también conocida como aprendizaje a través de pruebas, cuando el alumno intenta recuperar información presentada previamente en

lugar de que simplemente se le presente una vez más la misma información (Gordon, 2020). En muchos trabajos se aplican sesiones de aprendizaje que incluyen testeos (study-test session) y ellas demuestran ser más efectivas que los diseños de aprendizajes en los que se utilizaron igual cantidad de sesiones de estudio pero sin testeos (Hogan y Kintsch, 1971; Karpicke y Roediger, 2008; Roediger y Karpicke, 2006; Thompson y col., 1978). Los autores sostienen que realizar un test de memoria no sólo evalúa lo que se sabe, sino que también mejora la retención posterior, fenómeno conocido como efecto test (Roediger y Karpicke, 2006). Además, respecto a los intervalos utilizados, las investigaciones actuales proporcionan evidencia de que los principios de la práctica espaciada y basada en la recuperación resultan más eficientes para mejorar la memoria que la práctica masiva basada en la recuperación (Gordon, 2020; Küpper-Tetzel y col., 2014; Miles, 2014; Sobel y col., 2011).

A pesar de que la incorporación de testeos tiene un efecto poderoso sobre la retención a largo plazo, se considera que hay condiciones de contorno para lograr este efecto, que incluye el tiempo en el que se da el test luego del aprendizaje (Roediger y Karpicke, 2006). Es necesario prestar atención a la curva de olvido de la memoria inducida por la sesión inicial de aprendizaje, ya que si dicha memoria no puede ser evocada o su éxito de recuperación es extremadamente bajo se espera que el efecto del test sea bajo (Carpenter, 2017; Smolen y col., 2016; Spitzer, 1939).

En los trabajos citados anteriormente se utilizaron tareas de asociación entre pares de palabras, memoria de reglas ortográficas, vocabulario, contenidos de ciencia, etc. No hemos encontrado en la bibliografía estudios de evaluación de memorias gráficas. En el segundo capítulo de esta tesis, pondremos a prueba la efectividad de sesiones de entrenamiento o de una sesión de entrenamiento seguida por un test, en la eficiencia de la persistencia de una memoria gráfica visual en estudiantes de escuelas primarias. Luego en el último capítulo realizaremos un entrenamiento gráfico con contenido espacial para estudiar el mismo fenómeno en adultos utilizando una plataforma virtual.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El **objetivo general** de esta tesis es estudiar el efecto de entrenamientos espaciados sobre la persistencia de la memoria. Lo analizaremos bajo el marco conceptual del EC para contribuir al conocimiento de las bases de la duración de memorias por la repetición de eventos. El estudio se compone de dos partes: los efectos del aprendizaje espaciado sobre la memoria espacial en roedores; y los efectos del aprendizaje espaciado sobre la memoria gráfica en humanos. Con el fin de alcanzar el objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- Caracterizar la curva temporal de la persistencia de la memoria inducida por una sesión de entrenamiento fuerte en la tarea de reconocimiento espacial de objetos (REO) en roedores.
- Diseñar un protocolo de aprendizaje espaciado en la tarea de REO. Estudiar si una segunda sesión (que consiste en un re-entrenamiento o un test) puede favorecer la persistencia de la MLT inducida por un entrenamiento fuerte. Analizar el efecto del intervalo entre sesiones sobre la persistencia de la memoria. Investigar el curso temporal de efectividad del re-entrenamiento.
- Investigar si los mecanismos moleculares involucrados en la expresión de la memoria pueden afectar a la persistencia de la memoria inducida por el re-entrenamiento.
- Caracterizar el mecanismo molecular responsable de la persistencia de MLT por dos sesiones de entrenamiento: rol de la etiqueta de aprendizaje y de la síntesis de proteínas.
- Realizar actividades en escuelas primarias para caracterizar el tiempo más efectivo para favorecer la persistencia de una memoria gráfica luego de dos sesiones de aprendizaje. Diseñar un protocolo de aprendizaje espaciado en la tarea de la figura de Rey Osterrieth' utilizando una primera sesión de aprendizaje seguida de una sesión de re-entrenamiento o de test.
- Evaluar el efecto del entrenamiento espaciado en población adulta, utilizando un protocolo basado en la tarea del Test de Aprendizaje Visoespacial (VLST). Diseñar y utilizar una aplicación original para dispositivos electrónicos que permita realizar la tarea de VLST de forma virtual.

Se propone como **hipótesis** de trabajo que:

- Un segundo entrenamiento en una **misma tarea** activará mayormente los **mismos sitios** (substratos neuronales) activados por el primero; en cambio si la segunda sesión es un test activará parcialmente los sitios originales. Es por ello que un ensayo de re-entrenamiento es superior a un test para inducir la promoción de la persistencia de la memoria.
- Se utilizarán las **proteínas** necesarias para la **expresión de la memoria** para sostener la plasticidad neuronal que sustenta la traza. Es por ello que la separación temporal efectiva entre el día de aprendizaje y el reentrenamiento se extenderá por el período en que la memoria puede ser expresada. Es decir, cuando lo aprendido no puede expresarse, un reentrenamiento no podrá mejorar la duración de la traza mnésica
- Basados en que muchos mecanismos de formación de MLTs se encuentran evolutivamente conservados, la aplicación de protocolos de re-aprendizaje a tiempos óptimos en el aula, podrá mejorar la persistencia de la memoria en estudiantes de nivel inicial.
- Estos protocolos óptimos de re-aprendizajes podrán mejorar también la persistencia de la memoria en adultos

CAPÍTULO I

EFFECTOS DEL APRENDIZAJE ESPACIADO SOBRE LA MEMORIA ESPACIAL EN ROEDORES

MATERIALES Y MÉTODOS I

Sujetos experimentales

Se utilizaron ratas macho Wistar entre 2-3 meses de edad, con un peso aproximado entre 200-300 g al inicio de los experimentos. Los animales fueron criados en los bioterios de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) y del Instituto de Biología Celular y Neurociencia “Prof E. De Robertis” (IBCN, Facultad de Medicina, UBA-CONICET). Estos fueron mantenidos de a 3 por jaula, con comida y agua ad libitum, bajo un ciclo de luz oscuridad de 12 horas (7 am-7 pm) y a una temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$. Con el fin de reducir el estrés asociado al contacto con el experimentador, los animales fueron manipulados durante 2 minutos los dos días previos al experimento. Para los distintos experimentos diferentes grupos experimentales se encontraron representados en cada una de las jaulas. Todos los experimentos fueron realizados durante el ciclo de luz. Todos los procedimientos cumplieron con la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Publicación nro. 80-23, revisada en 1996) y fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

Cirugía de implantación de cánulas

Los animales utilizados para los experimentos farmacológicos con infusión intracerebral de drogas fueron sometidos a una cirugía para la implantación bilateral de cánulas guía de calibre de 0,7 mm (22G) de 1 cm de longitud. Para el procedimiento quirúrgico las ratas fueron anestesiadas con una combinación de 80 mg/kg de ketamina (Holliday) y 8 mg/kg de xilacina (Konig) intraperitoneal (i.p.). Se colocó a los animales en un marco estereotáxico, se expuso el cráneo y se niveló ubicando los puntos lambda y bregma a la misma altura dorso-ventral (Figura M.1). Las cánulas fueron implantadas bilateralmente en la región CA1 del hipocampo dorsal utilizando las siguientes coordenadas estereotáxicas (con respecto a bregma): anteroposterior (AP): -3,9 mm, lateral (LL): $\pm 3,0$ mm y dorsoventral (DV): -3,0 mm (Paxinos & Watson, 2007) (Fig. M1). Luego fueron fijadas al cráneo con acrílico dental y se colocó una aguja con calibre de 0.3mm (30G) dentro de la cánula para evitar la obstrucción. Durante la cirugía se

suministró de manera subcutánea el analgésico Meloxicam (0.2 mg/kg) para disminuir posibles molestias ocasionadas por el procedimiento. De la misma forma se administró Gentamicina (3 mg/kg), un antibiótico de amplio espectro, desde el día previo a la cirugía. Los animales permanecieron en sus jaulas para su recuperación post-operatoria al menos durante 5 días, antes de comenzar con los experimentos conductuales.



Figura M.1. Cirugía de implantación de cánulas guía. Las cánulas fueron implantadas en la región CA1 del hipocampo dorsal según las coordenadas AP: -3,90 mm, LL: $\pm 3,00$ mm y DV: -3,00 mm dorsoventral. En la fotografía se muestra al animal ubicado en el marco estereotáxico al final de la cirugía.

Infusión de drogas

Las drogas fueron administradas en el hipocampo dorsal mediante una aguja de infusión de 0,3 mm de calibre (30G) y 1,1 cm de longitud. La aguja se insertó en la cánula guía, sobresaliendo su punta 0,1 cm de ésta. Luego fue conectada mediante una manguera de polietileno de 0,015" a una microjeringa Hamilton para infundir los volúmenes correspondientes de cada droga. La manipulación durante la inyección fue realizada delicadamente para disminuir el estrés de los animales (Fig. M.2). El procedimiento de infusión llevó un tiempo total de aproximadamente 3-4 minutos para cada estructura, componiéndose de 30 segundos de infusión en sí misma por lado. Luego de cada infusión se mantuvo un minuto la aguja de infusión dentro de la cánula guía para permitir la correcta difusión de la droga y evitar el reflujo.

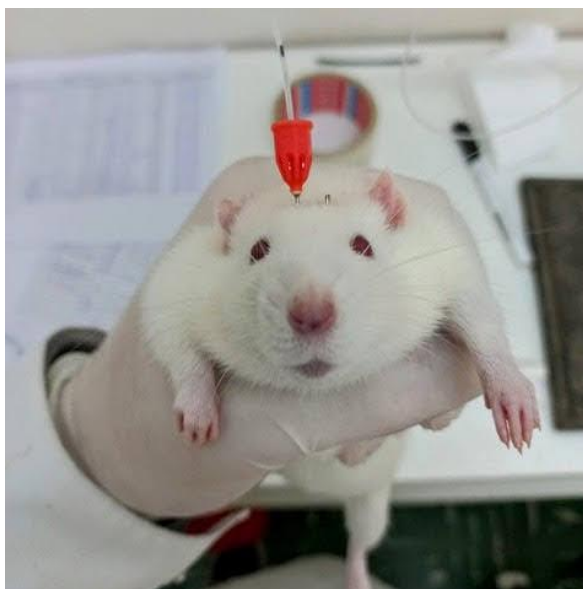


Figura M.2: Infusión de drogas. Durante la realización de los experimentos se administraron drogas colocándose la aguja de infusión, conectada con la microjeringa Hamilton, en una cánula por vez.

Drogas

- Emetina (Eme, 50 µg/lado, Sigma Aldrich). Inhibidor general de la síntesis proteica: ocupa el sitio E del ribosoma 80S impidiendo la elongación del péptido a sintetizar (Arenz y Wilson, 2016). Fue disuelta en solución fisiológica. El volumen de infusión fue de 1 µl por lado.
- Rapamicina (Rapa, 60 nM/lado, Sigma Aldrich). Inhibidor selectivo de mTORC1. La concentración de trabajo fue 120 nM/µl, disuelta en DMSO 0,012% en solución fisiológica. El volumen de infusión fue de 0,5 µl por lado.
- U0126 (0,4 µg/lado, Sigma Aldrich). Inhibidor de la actividad de ERKs1/2 , ya que bloquea la actividad quinasa de MEK1/2 impidiendo así la activación de las MAP quinasas p42 y p44. Fue disuelta en DMSO 10% en solución fisiológica. El volumen de infusión fue de 0,8 µl por lado.
- GluR23γ (15 pmol/lado, Tat-GluR32γ, secuencia de extremo N-terminal a C terminal: H-YGR KKR RQR KEG YNV YG-OH, Eurogentec, Anaspec). Péptido que bloquea selectivamente la endocitosis de los receptores AMPA que contienen la subunidad GluA2 (Lopez y col., 2015; Miguez y col., 2016; Pereyra y col., 2018). La concentración de trabajo fue 15 pmol/µl disuelta en solución fisiológica. El volumen de infusión fue de 1 µl por lado.

- Ácido dihidro kaínico ((DHK, 12,5 nmol/lado). Bloqueador del recaptador de glutamato GLT-1, presente en astrocitos (Anderson & Swanson, 2000). Fue disuelto en solución fisiológica. El volumen de infusión fue de 1 μ l por lado.

Histología

Una vez finalizados los experimentos fármaco-conductuales se infundió desde 0,5 a 1 μ l (dependiendo el volumen de droga infundido previamente) por lado de una solución de azul de metileno 4% disuelto en solución fisiológica (Fig. M.3). Los animales fueron decapitados y sus cerebros removidos y cortados en rodajas para chequear el área de difusión, que se registró en aproximadamente 1.5 mm³. Solamente los datos de los animales con las cánulas correctamente ubicadas en el hipocampo dorsal (95% de los casos) fueron incluidos en los análisis estadísticos.

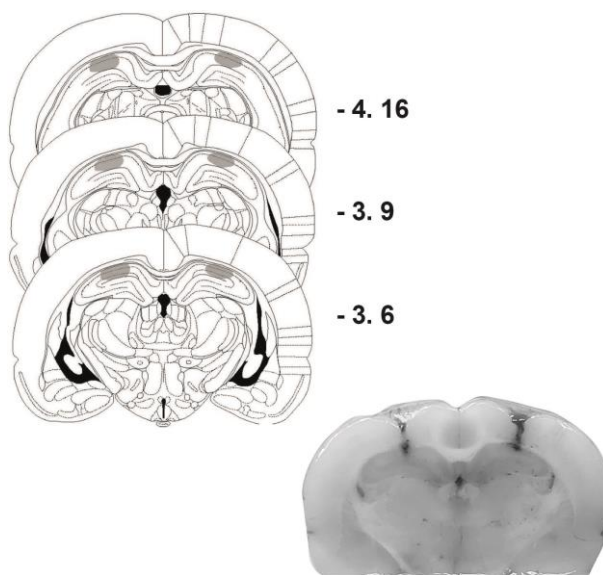


Figura M.3. Representación esquemática de sitios de infusión de las drogas. A la izquierda se muestran tres planos coronales (-3,80 mm, -4,30 mm y -4,80 mm del bregma), con el área aproximada de difusión en la región dorsal del hipocampo resaltada en gris sombreado. Esta representación se adaptó de (Paxinos y Watson, 2007). A la derecha, se presenta un corte coronal del cerebro de la rata, evidenciando el área de infusión tras las pruebas histológicas con azul de metileno.

Ensayos conductuales

Se estudió la memoria de los animales en una tarea de reconocimiento espacial de objetos (REO). En esta tarea se evalúa la habilidad de aprender y detectar el desplazamiento de un objeto familiar a una ubicación novedosa dentro de un contexto. El paradigma se basa en la conducta espontánea de los roedores de explorar objetos en contextos novedosos a los que fueron previamente habituados. Si a una rata se le presentan objetos conocidos en una posición familiar (ya explorada) o novedosa (no utilizada anteriormente), pasará más tiempo explorando el objeto desplazado (nueva posición) en relación con aquel que nunca se movió (Dere y col., 2005). Además, se utilizó la exposición a un campo abierto (CA) como un evento novedoso capaz de inducir la síntesis de PRPs (Moncada y Viola, 2007).

- **Reconocimiento espacial de objetos (REO)**

Para el desarrollo de los experimentos se utilizó un contexto en el cual se presentaron dos objetos idénticos a los roedores modificándose durante la sesión de testeo la localización de uno solo de ellos. Este contexto es una caja de acrílico de 60 cm de ancho, 40 cm de largo y 50 cm de alto. La pared frontal de la caja es transparente y la trasera rayada con líneas blancas y negras, siendo las paredes laterales blancas y con diferentes claves visuales. La habitación donde tuvo lugar el protocolo estuvo débilmente iluminada.

El experimento comienza con la habituación al contexto, en la que todos los sujetos exploraron la caja sin objetos dos días consecutivos antes del día de entrenamiento, durante una sesión diaria de 20 minutos. En la sesión de entrenamiento, se incluyeron dos objetos idénticos de plástico o vidrio en el contexto en dos esquinas adyacentes. Las posiciones utilizadas fueron: P1 y P2 cuando los objetos se ubicaron cerca de la pared trasera, o P3 y P4 cuando estuvieron más próximos a la pared frontal transparente (Fig. M.4). Se permitió a los animales explorar durante 4 minutos en un entrenamiento débil (REOd) u 8 minutos en el caso de un entrenamiento fuerte (REOf). En la sesión de evaluación o test, uno de los objetos se movió a una posición nueva y se permitió a los animales explorar este contexto durante 2 minutos. El tiempo de exploración de cada objeto, definido como olerlo o tocarlo con la nariz o las patas delanteras, se midió utilizando un cronómetro de mano. Se excluyeron de los análisis aquellas ratas que durante el entrenamiento exploraron uno

de los objetos más del 65% del tiempo total de exploración (es decir el dedicado a ambos objetos), ya que es requisito en esta sesión no mostrar preferencias por alguno de los objetos y/o sus localizaciones. También se excluyeron a los animales que no alcanzaron los 10 segundos en el tiempo total de exploración de objetos durante la sesión de evaluación. Los resultados se expresan como un *índice de preferencia*: $[\text{Tiempo de exploración del objeto en una nueva ubicación (Tn)} - \text{Tiempo de exploración del objeto en la ubicación familiar (Tf)}] / [\text{Tn} + \text{Tf}]$. Un índice positivo en la sesión de test, que difiere significativamente de cero, indica memoria. Un promedio representativo \pm SEM del tiempo total de exploración de objetos durante la primera sesión de entrenamiento REOf fue de 131.2 ± 7.8 segundos. Fue de 51.24 ± 3.40 segundos durante la sesión de REOd y de 23.96 ± 1.80 segundos durante la sesión de test. Para cada uno de los sujetos experimentales, las posiciones de los objetos en el entrenamiento y su condición de familiar o novedosa durante el test fue balanceada. La caja y los objetos fueron limpiados entre ensayos.

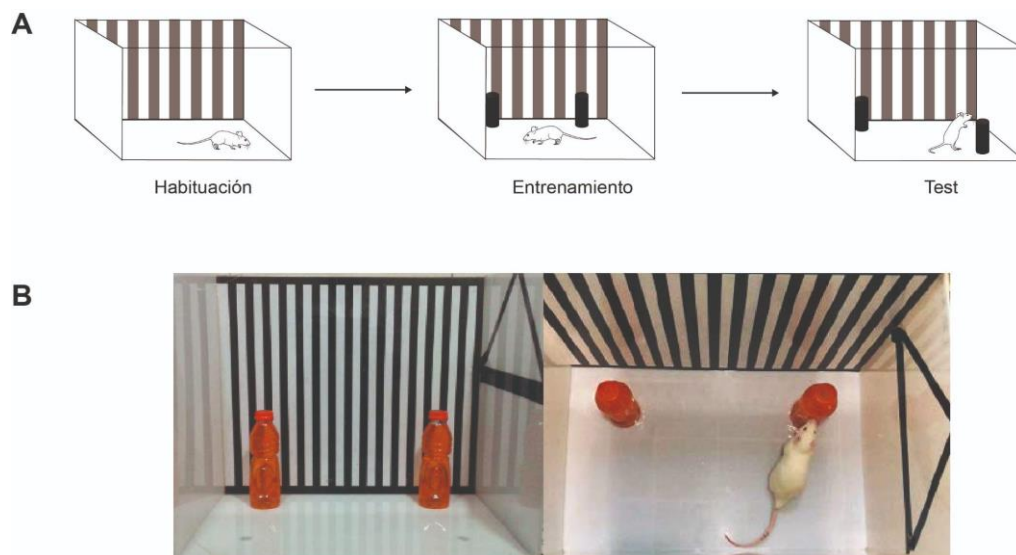


Figura M.4: Reconocimiento espacial de objetos (REO). A) En el esquema se observan las distintas sesiones de la tarea. Primero los animales son habituados al contexto vacío. Luego, los animales son entrenados con dos objetos idénticos. La memoria es evaluada en la sesión de testeo cambiando la posición de uno de los objetos. B) Contexto utilizado en el protocolo conductual. En las fotografías se observa la caja vacía y a un animal explorando los objetos. El tiempo de exploración se mide mediante un cronómetro de forma manual.

- **Campo abierto (CA)**

El dispositivo consiste en una caja cuadrada de madera 50x50 cm, con 40 cm de alto. Las paredes y el piso son negros y éste se encuentra dividido en nueve cuadrantes por líneas blancas Figura M5. Cuando los animales fueron expuestos al CA se les permitió la exploración de la caja durante 5 minutos, bajo condiciones normales de luminosidad (Moncada y Viola, 2007). En este contexto las ratas no mostraron signos de inmovilidad, sino que tuvieron un típico comportamiento exploratorio espontáneo. Al comienzo del ensayo las ratas fueron colocadas en un cuadrante perimetral y se registró la actividad locomotora y exploratoria durante los 5 minutos. El registro consistió en medir la cantidad de veces que un animal cruza los cuadrantes (cruces) y el número de episodios en los que adopta posición vertical, apoyándose en sus patas traseras, para examinar el ambiente (exploraciones aéreas). En promedio y de manera representativa, para un sujeto control la cantidad total de cruces (\pm SEM) durante la exploración fue de 79.69 ± 5.45 y el número de exploraciones aéreas de 41.31 ± 4.86 .

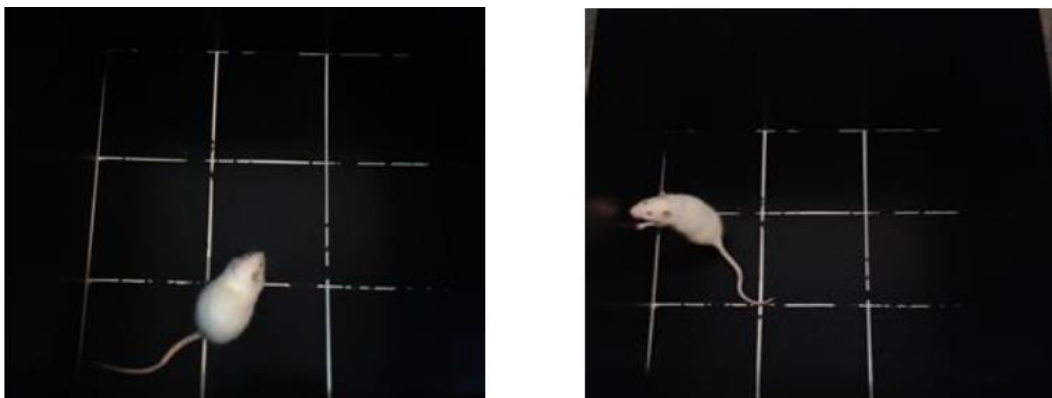


Figura M.5: Caja de campo abierto. La actividad exploratoria del animal se determinó registrando el número de cruces (izquierda) y exploraciones aéreas (derecha) que realizó durante una sesión de 5 minutos.

Diseños experimentales:

Dependiendo del experimento, los animales fueron expuestos a una o dos sesiones de entrenamiento REO separadas por diferentes intervalos de tiempo inter ensayos (ITIs). Los diseños experimentales se presentan en la parte superior de los diagramas de cada figura. Cada figura está compuesta generalmente por dos conjuntos

de experimentos que incluyen todos los grupos/condiciones experimentales. Estos conjuntos de experimentos se llevaron a cabo en la misma temporada del año.

Análisis estadístico:

Los resultados se expresan como el índice de preferencia, representado como la media \pm error estándar de la media (SEM). Los gráficos de barras en las figuras también muestran los datos individuales. Todos los índices fueron comparados mediante un test de Student al valor cero (valor que indica falta de preferencia), para determinar si el grupo expresaba o no memoria. Las diferencias de índice entre grupos se analizaron mediante una prueba t de Student no pareada al comparar dos grupos; y una prueba ANOVA de una vía seguida de un test de Newman-Keuls post hoc al comparar tres o más grupos. Los análisis se realizaron en GraphPad Prism Ò versión 8.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.). Se consideraron efectos significativos cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS I

La persistencia es el principal atributo de las MLT y hace referencia a la duración de las memorias pasado el período de su formación. Existen diferentes estrategias para perpetuar la traza de memoria. Entre ellas se encuentra la exposición del animal a una sesión recordatoria, que puede ser un test o un reentrenamiento. Los entrenamientos espaciados tienen efectos positivos para formar o prolongar la duración de las memorias, presentando ventajas con respecto a los entrenamientos masivos.

El objetivo principal de este capítulo fue identificar el proceso por el cual un protocolo de entrenamiento espaciado promueve la persistencia de la MLT de REO en roedores. Operativamente consideramos que una MLT se expresa al menos hasta un día luego de su adquisición; mientras que una memoria persistente se expresa al menos hasta la semana de la misma. Se utilizaron dos sesiones de entrenamiento para estudiar de forma más limpia el efecto de la repetición de aprendizajes y simplificar el modelo. Inicialmente se estudió si un aprendizaje que induce una MLT de 1 o 2 días de duración, pero no de una semana, puede establecer una memoria más duradera por la repetición de un entrenamiento débil que solo genera MCT. Luego se evaluó su curso temporal de efectividad y se realizó una comparación entre realizar una sesión de evaluación como segunda sesión en lugar de un re-entrenamiento. Por último, dentro del marco del EC, se caracterizaron las proteínas que son relevantes en este mecanismo de acción, como así también el rol de la etiqueta establecida por los aprendizajes.

El re-entrenamiento espaciado con un intervalo de 1 día promueve la persistencia de una memoria de largo término

En la primera parte del trabajo, se caracterizó la curva temporal de la duración de la memoria inducida por una sesión de entrenamiento de 8 minutos (TR) o de 4 minutos (tr) en la tarea de REO. En este paradigma la memoria espacial se evidencia por una mayor tasa de exploración del objeto que se movió a una nueva ubicación durante la sesión de evaluación, expresada como un aumento en el índice de preferencia. En la Figura 1A se observa que el grupo de ratas entrenadas con una sesión de REO de 4 minutos y evaluadas 30 minutos después, mostró una memoria de corto término (MCT-REO) determinada por un índice de preferencia diferente de cero (t_r , $t(7) = 7.74$, $P < 0.001$). Mientras que un grupo paralelo de ratas evaluado 1 día después del entrenamiento no mostró persistencia de la MLT-REO ($t(10) = 0.55$, $P >$

0.05 vs 0). Sin embargo, una sesión de REO de 8 minutos promovió la formación de la MLT evaluada 1 día después (Figura 1B, TR, $t(12) = 7.26$, $P < 0.001$ vs 0), pero no se observó memoria cuando el test se realizó a los 7 ($t(11) = 0.04$, $P > 0.05$ vs 0) o 14 días después del entrenamiento ($t(8) = 0.4$, $P > 0.05$ vs 0) en grupos independientes de ratas. Por lo tanto, se considera a una sesión de REO de 8 minutos como un entrenamiento fuerte (REOf) y a una sesión de REO de 4 minutos como un entrenamiento débil (REOd).

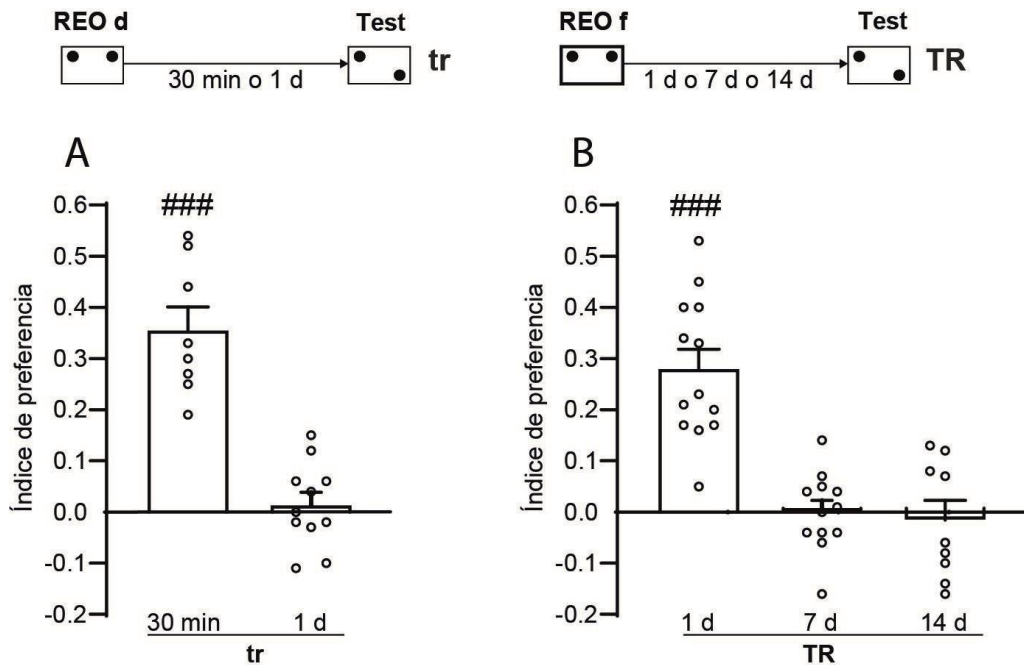


Figura 1: Curso temporal de expresión de la memoria después de un entrenamiento REO débil (REOd) o fuerte (REOf). Arriba: esquema del protocolo experimental. (A) Los animales fueron entrenados durante 4 minutos en la tarea de REO (tr). Grupos independientes de ratas fueron testeados 30 minutos ($n = 8$), o 1 día después ($n = 11$) del entrenamiento para registrar la memoria de corto término (MCT) o de largo término (MLT) respectivamente. (B) Los animales fueron expuestos a una sesión de entrenamiento de 8 minutos de REO (TR). Grupos independientes fueron testeados un día después para registrar la MLT ($n = 13$); o 7 ($n = 12$), o 14 ($n = 9$) días después del entrenamiento para evaluar la persistencia de esta memoria. Los datos son expresados como Índice de exploración (\pm SEM). ### $P < 0.001$ vs 0, One sample t test.

Luego se diseñó un protocolo de re-entrenamientos buscando favorecer la persistencia de la MLT inducida por la sesión de REOf. Este consistió en una sesión de REOf (1° TR), seguida de una sesión de REOd (2° tr) a un intervalo de tiempo determinado después del primer entrenamiento (ITI). En ambas sesiones los objetos se encontraron en la misma posición y los entrenamientos sólo difirieron en su duración. Como se mostró en la Fig 1.A, la segunda sesión de entrenamiento débil no es capaz de inducir la formación de la MLT-REO por sí sola, pero proponemos que reactivará los sitios neurales originalmente activados por la primera sesión de entrenamiento intensa. La sesión de evaluación se realizó 7 días después del segundo entrenamiento para evaluar la duración de la memoria.

En primera instancia se buscó realizar el segundo entrenamiento en una ventana temporal donde los animales expresen memoria de la primera sesión de REOf. Basándonos en los resultados anteriores (Fig. 1.B), se utilizó un intervalo de 1 día entre sesiones. Durante la sesión de evaluación realizada 7 días después del re-entrenamiento (Fig. 2), se observó que la MLT persistía en este grupo (TR-tr, $t(14) = 4.93$, $P < 0.001$ vs 0). Un grupo control de ratas confirmó que una única sesión de entrenamiento de REOf no podía expresar la MLT 8 días después del entrenamiento (TR, $t(7) = 1.24$, $P > 0.05$ vs 0). Un tercer grupo de animales, en lugar de realizar una sesión de re-entrenamiento, completó una sesión de test de 2 minutos 1 día después del entrenamiento de REOf. En esta sesión, uno de los objetos cambió su ubicación con respecto al entrenamiento, y se midió la memoria de la posición original de los objetos una semana después. Se observó que, aunque el índice de preferencia para este grupo fue diferente de cero (TR-Test, $t(11) = 2.60$, $P < 0.05$), no fue diferente al del grupo de control (ANOVA de un solo factor $F(2, 32) = 4.47$, $P < 0.05$, prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls TR-Test vs TR $P > 0.05$), y fue significativamente menor que en el grupo re-entrenado (TR-Test vs TR-tr $P < 0.05$).

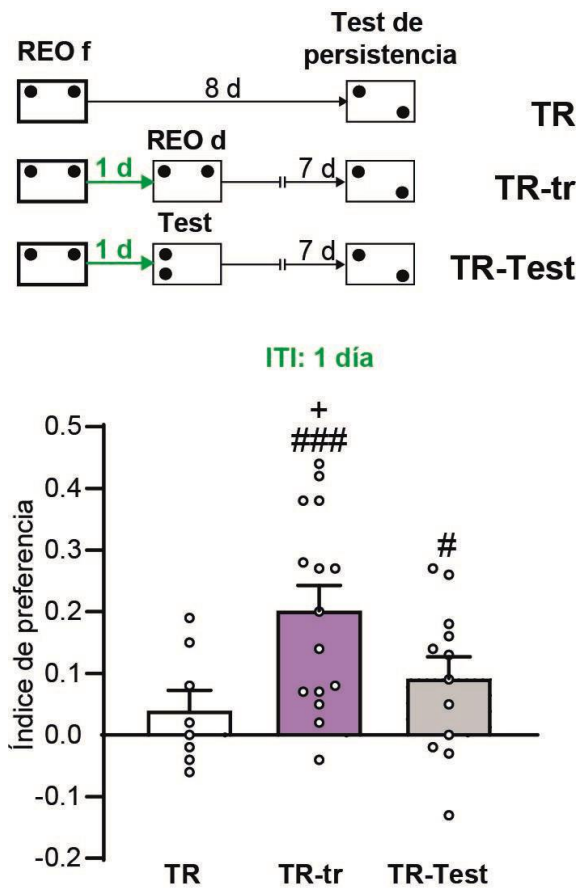


Figura 2: Una sesión de re-entrenamiento de REOd realizada 1 día después de una sesión REOf promueve la persistencia de la memoria de largo término de REO. El diagrama superior muestra el diseño experimental. Los animales del grupo control (TR) recibieron un solo entrenamiento REOf ($n = 8$). Los animales re-entrenados (TR-tr, $n = 15$) recibieron un posterior entrenamiento REOd espaciado de la sesión REOf por un intervalo interensayo (ITI) de 1 día. Los animales en el grupo TR-Test ($n = 12$) fueron expuestos a una sesión de test 1 día después del entrenamiento REOf. La MLT-REO se evaluó 8 días después del entrenamiento REOf. Los datos se expresan como el índice de preferencia media \pm SEM. # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs 0, prueba t de una muestra. + $P < 0.05$ vs todos los grupos, prueba de Newman-Keuls después de un ANOVA de una vía.

Luego se realizó un experimento similar cambiando el ITI a 7 días, tiempo donde la MLT original no se expresa (Fig. 1.B), y midiendo la retención de memoria 7 días después de la segunda sesión (Fig. 3.A). En este caso, ninguno de los tres grupos mostró persistencia de la MLT-REO (Fig. 3.A, TRt(7) = 0,49, $P > 0,05$ vs 0, TR-trt(11) = 1,18, $P > 0,05$ vs 0, TR-test t(10) = 1,21, $P > 0,05$ vs 0). La falta de efecto del re-

entrenamiento podría deberse a que el tiempo elegido para realizar el test fue muy largo (14 días desde el 1°TR). Para descartar esta posibilidad, se realizó el mismo protocolo haciendo la sesión de evaluación 1 día después del REOd (Fig.3.B). Nuevamente, no se observó promoción de la persistencia en ninguno de los grupos (Fig. 3.B, $TR_t(10) = 0,50$, $P > 0,05$ vs 0, $TR-trt(8) = 2,15$, $P > 0,05$ vs 0, $TR-test t(6) = 0,45$, $P > 0,05$ vs 0), lo que sugiere que el ITI es una variable clave del efecto del reentrenamiento.

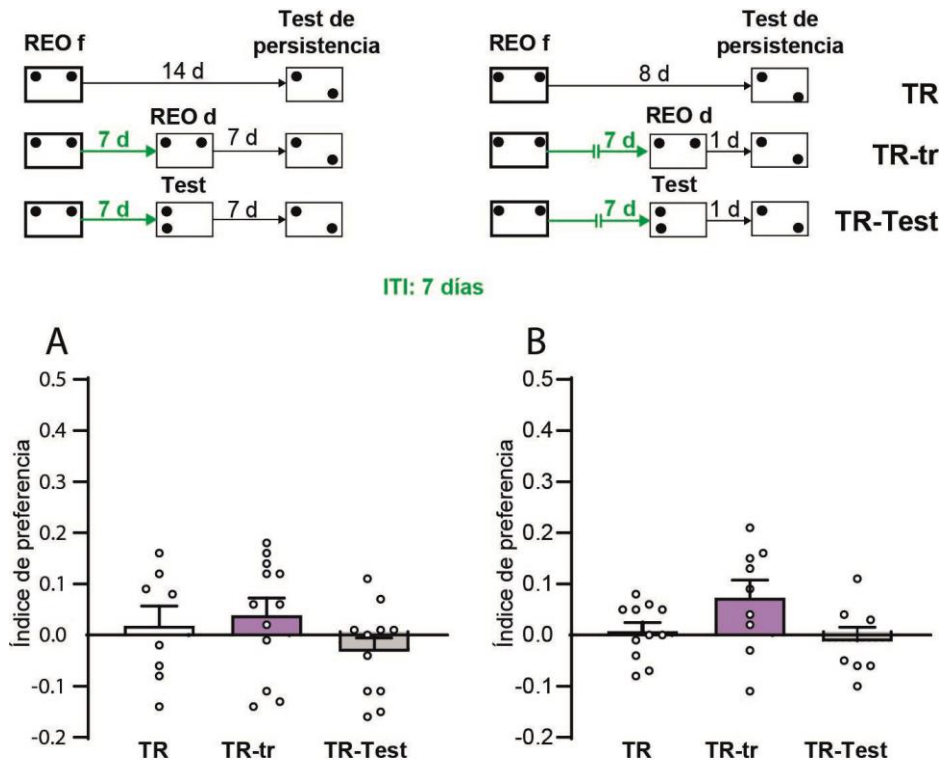


Figura 3: Tanto el REOd como la sesión de test realizada 7 días después del entrenamiento REOf no promueven la persistencia de la memoria de largo término. El diagrama superior muestra el diseño experimental. (A) El ITI entre sesiones fue de 7 días, grupos de animales independientes recibieron un reentrenamiento de REOd (TR-tr, $n = 12$) o una sesión de test (TR-Test, $n = 11$) después de la sesión de entrenamiento REOf. Los animales de control (TR) se entrenaron sólo con una sesión de REOf ($n = 8$). La MLT se evaluó 14 días después del entrenamiento REOf. Los datos se expresan como el índice de preferencia media \pm SEM. $P > 0,05$ ANOVA de una vía. (B) El ITI también fue de 7 días, pero la MLT se evaluó 8 días después del entrenamiento de REOf. Las ratas fueron expuestas o no (TR, $n = 11$) a un reentrenamiento de REOd (TR-tr, $n = 9$) o a una sesión de test (TR-Test, $n = 7$) después de la sesión de entrenamiento del REOf. Los datos se expresan como el índice de preferencia media \pm SEM. $P > 0,05$ ANOVA de una vía.

El efecto sobre la persistencia de la memoria es dependiente del re-entrenamiento.

Luego se estudiaron las características de la segunda sesión, realizada 1 día después de un entrenamiento REOf, necesarias para promover la persistencia de la MLT-REO. La exposición a una sesión de test más larga que la utilizada en los protocolos anteriores (TEST) con una duración de 4 minutos, al igual que una sesión de re-entrenamiento, no tuvo efectos sobre la persistencia de la MLT-REO (Fig. 4A, TEST $t(8) = 0.78$, $P > 0.05$ vs 0). Tampoco se observó ningún efecto con la exposición a una sesión de exploración de campo abierto de 5 min de duración, 1 día después de un entrenamiento REOf (Fig. 4A, CA $t(6) = 1.52$, $P > 0.05$ vs 0). Como control positivo, se observó que la memoria persistía a los 8 días después de la sesión de REOf cuando los animales recibieron una sesión de re-entrenamiento REOd (ANOVA de una vía $F(3, 31) = 15.61$, $P < 0.001$, prueba de comparaciones múltiples de Newman–Keuls TR-tr, $P < 0.001$ vs todos los grupos). Estos resultados sugieren que es necesario repetir la misma experiencia original (ser re-entrenados) para inducir la persistencia de esa memoria, y que una experiencia similar (una sesión de test o una exploración al CA) no es suficiente para lograrlo.

Los resultados obtenidos sugieren que el intervalo efectivo entre aprendizajes depende de la capacidad de expresión de la traza. Después de un entrenamiento, si la memoria se evoca durante una sesión de evaluación, se observará su expresión. Si en lugar de una sesión de test el animal experimenta una situación de re-entrenamiento, a pesar de que las condiciones no permiten la expresión conductual de la memoria, el roedor podrá evocar o recordar lo previamente aprendido y activar un mecanismo molecular que pensamos emula el de la expresión. Para estudiar la hipótesis de que la persistencia luego del re-entrenamiento es dependiente de que la traza sea expresable, se realizó un protocolo donde el segundo entrenamiento ocurre en condiciones de ausencia de dicho proceso (Fig. 4.B). Primero se entrenaron a los animales con una sesión de REOd que no expresa MLT al día. Luego un grupo recibió una segunda sesión de REOd 1 día después del entrenamiento (“tr-tr”) y otro grupo se expuso a una sesión de test (2 min) en lugar de un re-entrenamiento (“tr-Test”). Ninguno de los grupos fue efectivo en promover la persistencia de la MLT-REO cuando el primer entrenamiento fue una sesión de REOd (Fig. 4B, tr-Test $t(6) = 1.60$, $P > 0.05$ vs 0, tr-tr $t(8) = 0.56$, $P > 0.05$ vs 0, tr-TR $t(8) = 1.92$, $P > 0.05$ vs 0). Esto sugiere que la sesión de re-entrenamiento es efectiva durante la ventana de expresión de la

memoria original, y esta condición no se cumple cuando el entrenamiento inicial es débil y el re-entrenamiento se realiza un día después.

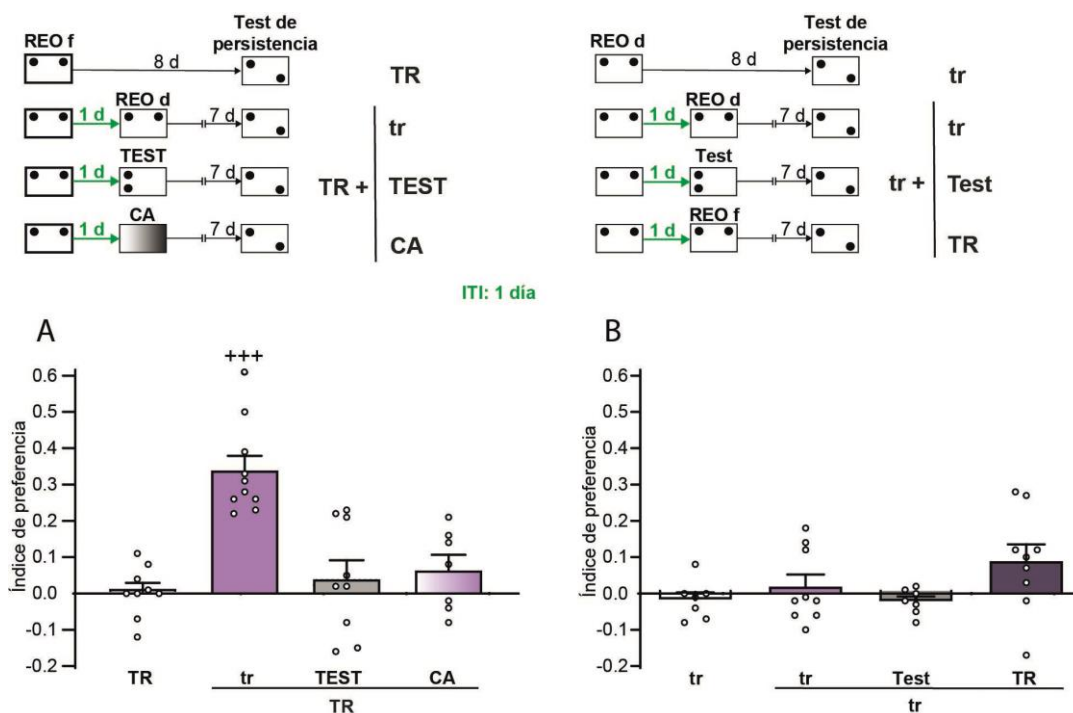


Figura 4: Un segundo entrenamiento de REO específicamente favorece la persistencia de la MLT-REO luego de un entrenamiento de REOf, pero no después de un entrenamiento de REOd. Los diagramas superiores muestran los diseños experimentales. (A) Los animales del grupo control (TR) recibieron una sola sesión de entrenamiento de REOf ($n = 9$). Grupos independientes de ratas fueron expuestos a una sesión de reentrenamiento REOd (TR-tr, $n = 10$), a una sesión de test de 4 minutos (TR + TEST, $n = 9$) o a una sesión novedosa en un campo abierto (CA) (TR + OF, $n = 7$) un día después de un REOf. La MLT fue evaluada 8 días después del primer entrenamiento. Los datos se expresan como el índice de preferencia medio \pm SEM. +++ $P < 0.001$ vs todos los grupos, prueba de Newman-Keuls después de un ANOVA de una vía. (B) Los animales del grupo control (tr) fueron entrenados con una sola sesión de entrenamiento de REOd ($n = 7$). Las ratas re entrenadas recibieron una segunda sesión de REO débil o fuerte 1 día después de un entrenamiento REOd (tr + tr, $n = 9$ o tr + TR, $n = 9$). Los animales en el grupo tr + Test ($n = 7$) fueron expuestos a una sesión de test de 2 minutos 1 día después de un entrenamiento REOd. La MLT fue evaluada 8 días después del primer entrenamiento. Los datos se expresan como el índice de preferencia medio \pm SEM. $P > 0.05$ ANOVA de una vía.

La promoción de la persistencia de la memoria por re-entrenamientos no involucra un proceso de reconsolidación de la memoria

La persistencia de la traza de memoria podría relacionarse con un refuerzo en los mecanismos de formación de la MLT-REO. Es decir que, el protocolo de re-entrenamiento podría inducir una MLT más fuerte en comparación con una sola sesión de REOf, lo que extendería su duración en el tiempo, ofreciendo así una explicación para su persistencia. Para estudiar esta posibilidad, se expuso a las ratas a una sesión de REOd 1 día después de un REOf (TR-tr) y se evaluó la retención de la memoria un día después. Paralelamente, otro grupo de animales fue expuesto a una única sesión de REOf y luego se midió la retención 2 días después del entrenamiento (TR). Ambos grupos expresaron la MLT-REO (Fig. 5. A, $TR-trt(9) = 23.11$, $P < 0.001$ vs 0, $TR t(10) = 8.35$, $P < 0.001$ vs 0), y no se observaron diferencias significativas entre ellos (ANOVA de una vía $F(2, 26) = 30.81$, $P < 0.001$, prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls TR vs TR-tr $P > 0.05$). Este resultado sugiere que la persistencia de la MLT-REO inducida por el aprendizaje espaciado no se basa en un mecanismo de refuerzo de la consolidación de la traza original.

Por otro lado, se investigó si para promocionar la persistencia de la traza luego de un re-entrenamiento es necesario activar el mecanismo de la reconsolidación de la memoria. Este mecanismo se refiere al proceso de desestabilización / re estabilización de la memoria tras su activación, que hace que sea transitoriamente sensible a los agentes amnésicos (Rodríguez-Ortiz y col., 2012; Santoyo-Zedillo y col., 2014). En general, dichos recordatorios se realizan un día después del aprendizaje y pueden reforzar o preservar la traza que se testea al día siguiente de la reactivación. Para esto, se entrenaron a los animales con una sesión de REOf y 1 día después se los expuso a una sesión de REOd. Estas ratas recibieron una infusión en la región del hipocampo dorsal, inmediatamente después del segundo entrenamiento, ya sea con una solución de vehículo (Veh) o con emetina (EME), un inhibidor general de la síntesis de proteínas capaz de impedir la reconsolidación de la traza si el reentrenamiento pudiera labilizarla. Se incluyó un grupo de control de ratas infundidas con EME 1 día después de una única sesión de REOf (TR). No se observaron diferencias significativas entre estos tres grupos cuando se evaluó la MLT-REO 2 días después del REOf (Fig. 5B, ANOVA de una vía $F(2,25) = 2.10$, $P > 0.05$). Se obtuvo un resultado similar con la administración intra-hipocampal de rapamicina (RAPA), un inhibidor selectivo de mTORC1 y por consecuencia de la síntesis local de proteínas (Fig. 5C, ANOVA de una vía $F(2, 17) =$

0.49, $P > 0.05$). Estos resultados sugieren que el protocolo de entrenamientos espaciados que se utilizó no labiliza la memoria, ya que no se observa amnesia en los grupos infundidos con los inhibidores de síntesis proteica. Por lo tanto, el proceso de reconsolidación no estaría involucrado en la persistencia de la memoria por re-entrenamientos.

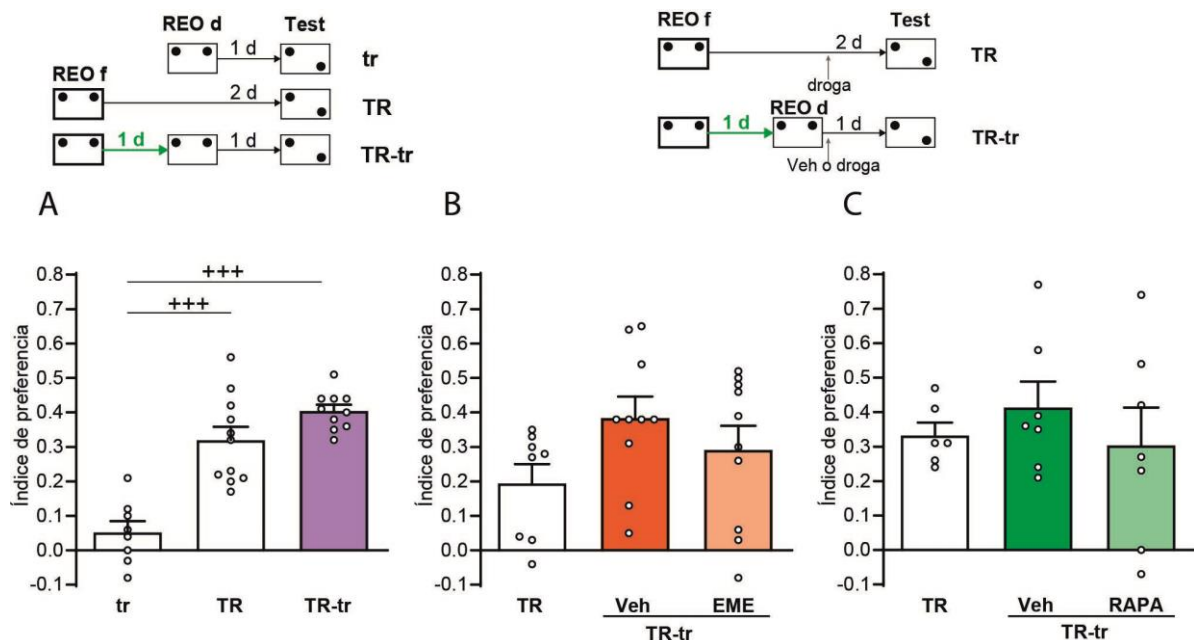


Figura 5: El protocolo de re-entrenamiento que induce la persistencia de la MLT-REO no refuerza la consolidación ni induce la labilización de la traza de memoria de REO original. Los diagramas superiores muestran los diseños experimentales. (A) Grupos de animales independientes fueron expuestos a una sola sesión de entrenamiento de REOd (tr, $n = 8$) o REOf (TR, $n = 11$) y la MLT fue evaluada 1 o 2 días después, respectivamente. Los animales re entrenados (TR-tr, $n = 10$) recibieron a una segunda sesión de entrenamiento REOd 1 día después de un entrenamiento REOf, y la MLT-REO fue evaluada 1 día después de la segunda sesión. Los datos se expresan como el índice de preferencia media \pm SEM. $+++P < 0.001$, prueba de Newman-Keuls después de un ANOVA de una vía. (B) El protocolo experimental es similar a (A), excepto que los animales re entrenados (TR-tr) recibieron infusiones intra-hipocampales de vehículo (Veh, $n = 10$) o emetina (EME, $n = 10$) inmediatamente después del segundo entrenamiento y la MLT fue evaluada 1 día después del reentrenamiento. Los animales de control (TR, $n = 8$) recibieron una infusión intra-hipocampal de EME 1 día después de un entrenamiento REOf y fueron testeados al día siguiente. Los datos se expresan como el índice de preferencia media \pm SEM. $P > 0.05$ ANOVA de una vía. (C) Las ratas

recibieron una infusión intra-hipocampal de rapamicina 1 día después de un entrenamiento de REOf (TR, n = 6) y la MLT fue medida al día siguiente. Los animales re entrenados (TR-tr) recibieron infusiones intra-hipocampales de vehículo (Veh, n = 7) o rapamicina (RAPA, n = 7) inmediatamente después del reentrenamiento de REOd. La MLT-REO fue evaluada 1 día después de la segunda sesión. Los datos se expresan como el índice de preferencia media \pm SEM. $P > 0.05$ ANOVA de una vía.

La persistencia de la memoria inducida por re-entrenamientos depende de los mecanismos involucrados en la expresión de la memoria.

Los resultados presentados descartan procesos de refuerzo o reconsolidación de la traza de memoria desencadenados por el re-entrenamiento. Por otro lado, estos sugieren que la persistencia de la memoria de REO requiere que los mecanismos de expresión de la memoria estén disponibles al momento del re-entrenamiento. Se ha reportado que este mecanismo depende de la actividad de NMDAR, mTOR y de la síntesis de proteínas (Lopez y col., 2015; Pereyra y col., 2018). En este trabajo, se infundieron bloqueantes del mecanismo de la expresión previo a la sesión de re-entrenamiento utilizando fármacos con eficacia comprobada (Lopez y col., 2015; Pereyra y col., 2018; Zamorano y col., 2018; Zhang y col., 2004).

Las ratas fueron entrenadas con una sesión de REOf y la memoria fue evaluada al día siguiente. Como se esperaba, la administración intra-hipocampal de EME (Fig. 6A), RAPA (Fig. 6B) o U0126 (inhibidor de MEK, Fig. 6C) 15 minutos antes de la sesión de evaluación indujo amnesia en los tres grupos (EME $t(6) = 0.35$, $P > 0.05$ vs 0, RAPA $t(4) = 0.45$, $P > 0.05$ vs 0, U0126 $t(12) = 2.16$, $P > 0.05$ vs 0), en contraste con los animales que recibieron una infusión de vehículo, quienes expresaron MLT-REO (Veh vs EME $t(11) = 6.49$, $P < 0.001$, Veh vs RAPA $t(8) = 3.32$, $P < 0.05$, Veh vs U0126 $t(22) = 3.13$, $P < 0.01$).

A continuación, se realizó el protocolo de re-entrenamiento con un ITI de 1 día entre sesiones, administrando estos fármacos 15 minutos antes de la sesión de REOd. De esta manera se buscó que los mecanismos de expresión de la memoria no estuvieran disponibles en el momento del re-entrenamiento. La Figura 6. E–G muestra que estas tres drogas afectan la persistencia de la MLT-REO evaluada una semana después del re-entrenamiento (EME $t(8) = 0.08$, $P > 0.05$ vs 0, RAPA $t(12) = 0.61$, $P > 0.05$ vs 0, U0126 $t(5) = 0.25$, $P > 0.05$ vs 0). Los grupos que recibieron la infusión de vehículo mostraron el efecto positivo esperado sobre la persistencia de la traza (Fig. 6E

ANOVA de una vía $F(2, 21) = 5.48$, $P < 0.05$, prueba de comparaciones múltiples de Newman–Keuls Veh vs EME y TR $P < 0.05$. Fig. 6F ANOVA de una vía $F(2, 29) = 22.13$, $P < 0.001$, prueba de comparaciones múltiples de Newman–Keuls Veh vs RAPA y TR $P < 0.001$. Fig. 6G ANOVA de una vía $F(2, 15) = 5.48$, $P < 0.05$, prueba de comparaciones múltiples de Newman–Keuls Veh vs U0126 y TR $P < 0.05$).

También se analizó el efecto del ácido dihidrokainico (DHK) sobre estos procesos. Esta droga es un bloqueador del recaptador de glutamato GLT-1 presente mayoritariamente en los astrocitos en hipocampo y corteza (Chaudhry y col., 1995; Furuta y col., 1997; Lehre y col., 1995; Rothstein y col., 1994; Schmitt y col., 1997). Existen antecedentes que muestran que la infusión intra-cerebroventricular de DHK bloquea la expresión de la memoria de reconocimiento de objetos novedosos (Tian y col., 2019); así como la expresión de la MLT evaluado en el laberinto acuático de Morris (Bechtholt-Gompf y col., 2010). La administración de esta droga en la región del hipocampo dorsal, 15 minutos antes de una sesión de evaluación realizada 1 día después de un REOf (Fig. 6. D) bloqueó la expresión de la memoria (DHK $t(6) = 2,10$, $P > 0.05$ vs 0), en comparación a aquellos infundidos con Veh que mostraron una MLT-REO (Veh vs DHK $t(17) = 3.5$, $P < 0.01$). Además la administración de DHK 15 minutos antes de la sesión de re-entrenamiento de REOd evitó la persistencia de la traza de memoria (Fig. 6H ANOVA de una vía $F(2, 25) = 10.78$, $P < 0.05$, prueba de comparaciones múltiples de Newman–Keuls Veh vs DHK $P < 0.001$, Veh vs TR $P < 0.01$). Lo observado también sugiere el rol de los astrocitos y de la recaptación de glutamato en estos mecanismos.

En conjunto estos resultados demuestran que un único entrenamiento de REOf es capaz de expresar MLT 1 día después, y que la evocación de esta memoria puede bloquearse con fármacos específicos. Además, comprobamos que el mecanismo involucrado en la expresión de la memoria debe estar activo en el momento del re-entrenamiento para prolongar la durabilidad de la traza.

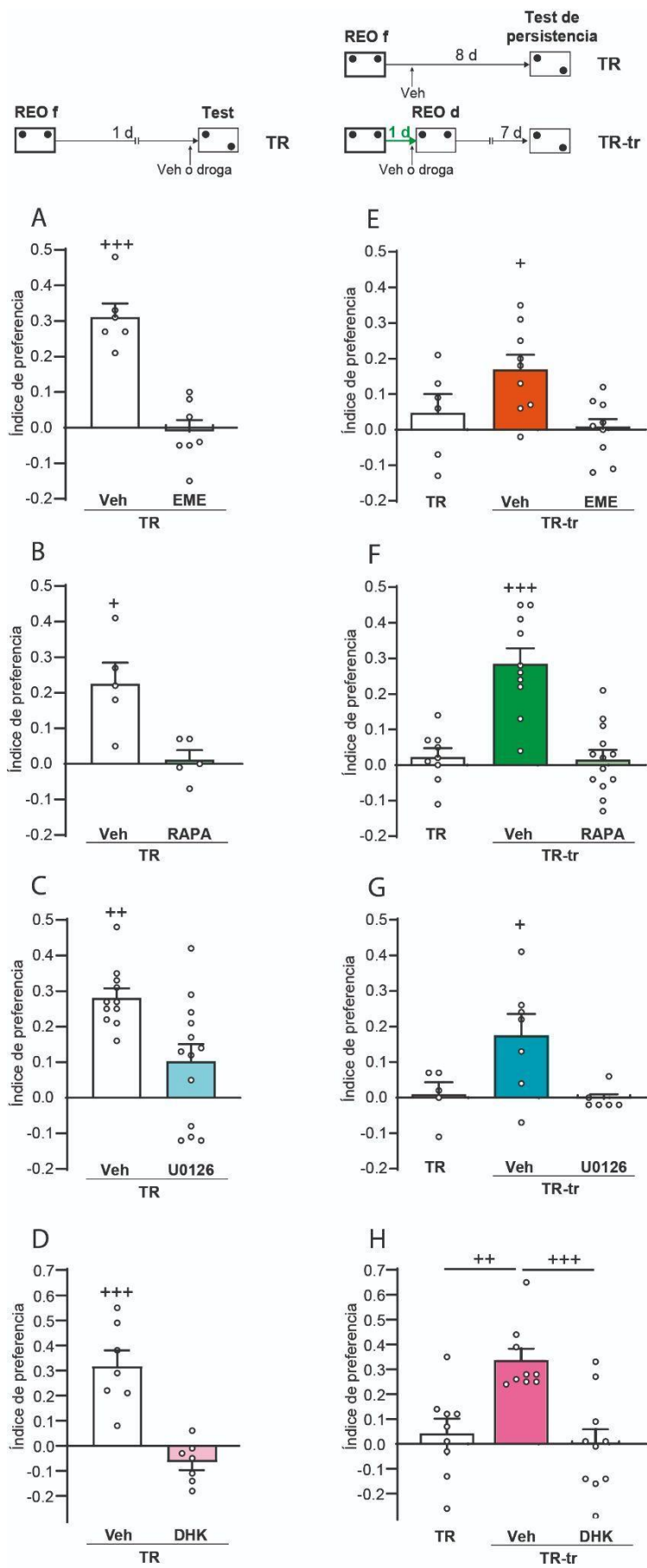


Figura 6: La inhibición de la síntesis de proteínas y la actividad de ERKs1/2 afecta la expresión de la MLT-REO y la persistencia de la MLT-REO inducida por re-entrenamiento. Los diagramas superiores muestran los diseños experimentales. (A–D) La inhibición de la síntesis de proteínas, la actividad de ERKs1/2 y la recaptación de astrogial de glutamato afecta la expresión de la memoria REO. Las ratas fueron entrenadas con una sesión de REOf y recibieron una infusión intra-hipocampal dorsal de (A) vehículo (Veh, $n = 6$) o emetina (EME, $n = 7$), (B) Veh ($n = 5$) o rapamicina (RAPA, $n = 5$), (C) Veh ($n = 11$) o U0126 ($n = 13$), (D) Veh ($n = 7$) o ácido dihidrokainico (DHK, $n = 7$) 15 minutos antes del test de MLT, realizado 1 día después del entrenamiento. Los datos se expresan como índice de preferencia media \pm SEM. $+P < 0,05$, $++P < 0,01$, $+++P < 0,001$ Prueba t de Student. (E–H) Las ratas fueron sometidas a una sesión de re-entrenamiento REOd 1 día después de un entrenamiento REOf (TR-tr), y recibieron infusiones intra-hipocampales dorsales de (E) Veh ($n = 9$) o EME ($n = 9$), o (F) Veh ($n = 10$) o RAPA ($n = 13$), o (G) Veh ($n = 7$) o U0126 ($n = 6$), o (H) Veh ($n = 9$) o EME ($n = 10$) 15 minutos antes del segundo entrenamiento. Los animales expuestos a una sola sesión de entrenamiento REOf (TR, $n = 5–9$) recibieron una infusión de Veh 1 día después. La MLT se evaluó 8 días después del entrenamiento REOf. Los datos se expresan como índice de preferencia media \pm SEM. $+P < 0.05$, $++P < 0.01$, $+++P < 0.001$ frente a todos los grupos, prueba de Newman–Keuls después de un ANOVA de una vía.

La actividad de ERKs1/2 es necesaria para el establecimiento de la etiqueta de aprendizaje durante la sesión de re-entrenamiento

Como se ha descrito anteriormente, hay evidencias que demuestran que la evocación de la memoria requiere de síntesis de proteínas en curso (Lopez y col., 2015; Pereyra y col., 2018). En nuestro protocolo se utilizó una sesión de REOd como re-entrenamiento, la cual no induce suficiente síntesis de proteínas para desencadenar la formación de la MLT por sí misma. Por lo tanto, las proteínas derivadas del proceso de expresión de la memoria adquieren un papel relevante en el mantenimiento de la traza inducida por re-entrenamiento. Trabajos previos del laboratorio han demostrado que la provisión de PRPs inducida por una exposición novedosa al CA genera efectos promnésicos si ella converge temporal y espacialmente con la etiqueta de aprendizaje establecida durante una sesión de REOd, aspecto fundamental en el proceso de EC

(Ballarini y col., 2009). Dentro del marco conceptual del EC, se estudió si la amnesia inducida por EME y U0126 (Fig. 6 E y G) se debía a un efecto sobre la etiqueta o sobre la síntesis proteica. Por este motivo se sumó una sesión de CA al protocolo con la finalidad de suministrar PRP. En el caso de que estas drogas afecten la etiqueta, aun disponiendo de proteínas se observaría el efecto amnésico, debido a que las PRPs no serían utilizadas en los sitios específicos por no estar etiquetados. Por el contrario, si las drogas solo afectasen la síntesis proteica, la exploración al CA debería rescatar la memoria.

Para esto, los animales fueron entrenados con una sesión de REOf y, un día después, se los expuso a una sesión de REOd con una infusión local previa de Veh o EME (Figura 7.A TR-tr). La persistencia de la MLT-REO se evaluó una semana después. Como se observó previamente, la EME impidió la persistencia de la MLT-REO observada en los animales infundidos con vehículo (ANOVA de una vía $F(2, 19) = 12,66$, $P < 0,001$, prueba de comparaciones múltiples de Newman–Keuls Veh vs EME $P < 0,001$). Sin embargo, esta amnesia fue revertida cuando las ratas fueron expuestas a un CA novedoso 1 hora después del re-entrenamiento (Fig 7.A, EME+CA vs EME $P < 0,001$). Este resultado concuerda con estudios previos que muestran que los inhibidores de síntesis proteica no disrumpe la etiqueta de aprendizaje (Moncada y col. 2011).

En contraste, la amnesia inducida por la infusión de U0126 no pudo ser revertida por la exploración del CA (Figura 7B, ANOVA de una vía $F(2, 20) = 5,85$, $P < 0,01$, prueba de comparaciones múltiples de Newman–Keuls Veh vs U0126 y U0126+CA $P < 0,05$). Esto sugiere que el efecto de la inhibición de la actividad de las ERK1/2 en el momento del re-entrenamiento, sobre la persistencia de la memoria, no pudo ser revertido por la provisión de PRPs. Por lo tanto, se propone que U0126 impide el establecimiento de la etiqueta de aprendizaje inducida por el re-entrenamiento. En este sentido, estudios previos han respaldado la participación de las ERK1/2 en el establecimiento/mantenimiento de la etiqueta de aprendizaje de la memoria de REO (Tintorelli y col., 2020).

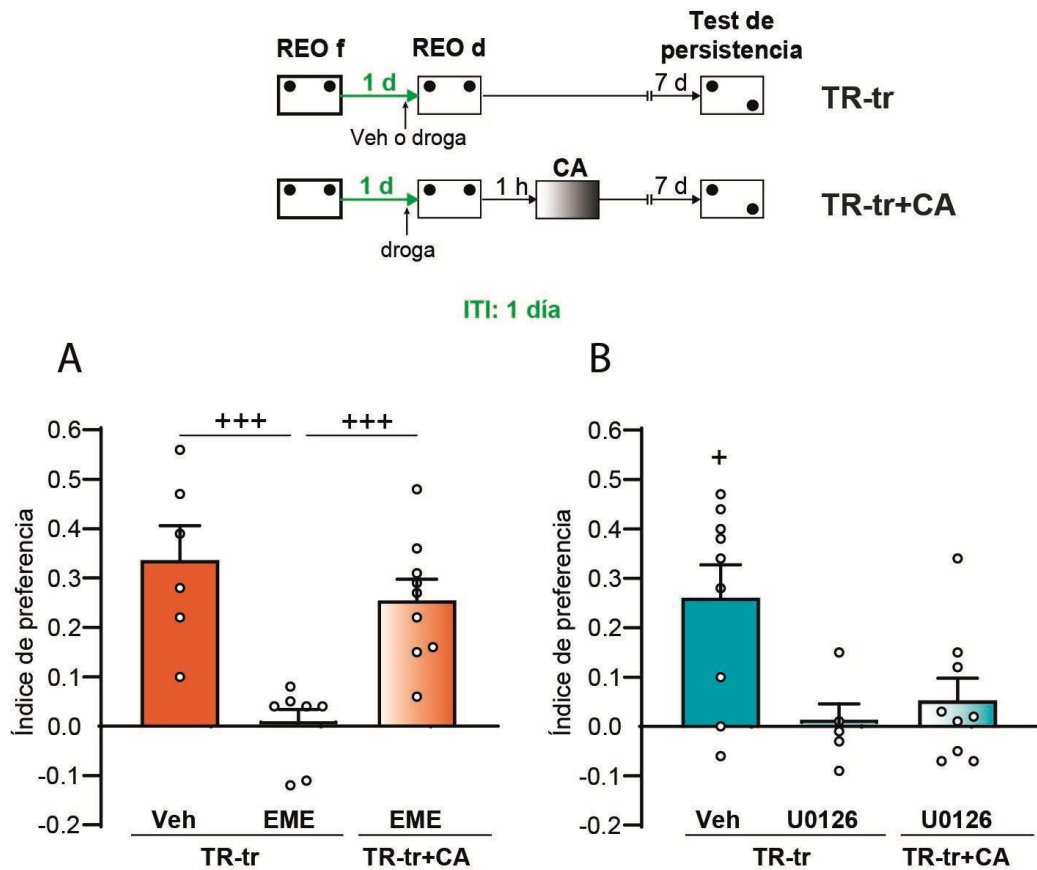


Figura 7: La activación de ERKs1/2 es necesaria para el establecimiento de la etiqueta de aprendizaje inducida por el REOd en la sesión de re-entrenamiento. El esquema superior muestra el diseño experimental. (A) Los grupos de reentrenamiento (TR-tr) recibieron infusiones intra-hipocampales dorsales de vehículo (TR-tr, Veh $n = 6$) o emetina (TR-tr EME, $n = 7$) 15 minutos antes del segundo entrenamiento; y uno de esos grupos (TR-tr EME + CA, $n = 9$) también fue expuesto a una sesión novedosa de campo abierto (CA) 1 hora después de la sesión de reentrenamiento. La REO-MLT se evaluó 7 días después de la segunda sesión de entrenamiento. Los datos se expresan como media \pm SEM. +++ $P < 0.001$, Newman-Keuls después de un ANOVA de una vía. (B) Otros grupos de ratas independientes fueron re-entrenados como en A, pero recibieron una infusión de vehículo (TR-tr Veh, $n = 9$) o U0126 (TR-tr U0126, $n = 5$), o U0126 más una sesión de CA (TR-tr U0126 + CA, $n = 9$). Los datos se expresan como índice de preferencia media \pm SEM. + $P < 0.05$, Newman-Keuls después de un ANOVA de una vía.

La inhibición de la endocitosis de AMPAR promueve la persistencia de la memoria inducida por el re-entrenamiento espaciado por 7 días

La actividad de los AMPAR ha sido ampliamente implicada en procesos de memoria (Riedel y col., 1999). La mayoría de estos receptores en el hipocampo son heterómeros formados por subunidades GluA1 y GluA2. A pesar de que el rol de la subunidad GluA1 en procesos de memoria y aprendizaje ha sido más extensamente reportado, existen trabajos recientes que señalan el requerimiento de la síntesis de novo de la subunidad GluA2 durante la evocación (Lopez y col., 2015; Pereyra y Medina, 2021).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se estudió si la presencia de los receptores AMPA que contienen GluA2 en la membrana sináptica es suficiente para promover la persistencia de la MLT-REO después del aprendizaje espaciado. Se utilizó como herramienta el péptido GluR23γ que interfiere selectivamente con la endocitosis de los receptores AMPA que contienen GluA2. Los animales fueron entrenados con una sesión de REOf y, 7 días después, cuando la MLT de ese único ensayo no se expresa, recibieron una sesión de re-entrenamiento REOd (Fig. 8. TR-tr). Una hora antes de la sesión de REOd, se infundió en el hipocampo dorsal GluR23γ o vehículo. En la Figura 8 se observa que las ratas infundidas con el péptido expresaron MLT 7 días después del re-entrenamiento ($t(10) = 4.14$, $P < 0.01$ vs 0). GluR23γ no tuvo efecto en el grupo de ratas expuesto a una sesión de test de 2 minutos en lugar de re-entrenamiento, y estas no expresaron MLT 7 días después (TR-Test, $t(6) = 0.0$, $P > 0.05$ vs 0). El grupo de re-entrenamiento tratado con el péptido mostró una MLT significativamente mayor que los otros grupos (ANOVA de una vía $F(5, 38) = 6.59$, $P < 0.001$, pruebas múltiples de Newman-Keuls TR-tr GluR23γ vs todos los grupos, $P < 0.05-0.001$). Estos resultados sugieren que tanto el re-entrenamiento como la presencia de receptores AMPA que contienen la subunidad GluA2 en la membrana son necesarios para que la traza de memoria sea duradera después del re-aprendizaje espaciado de REO.

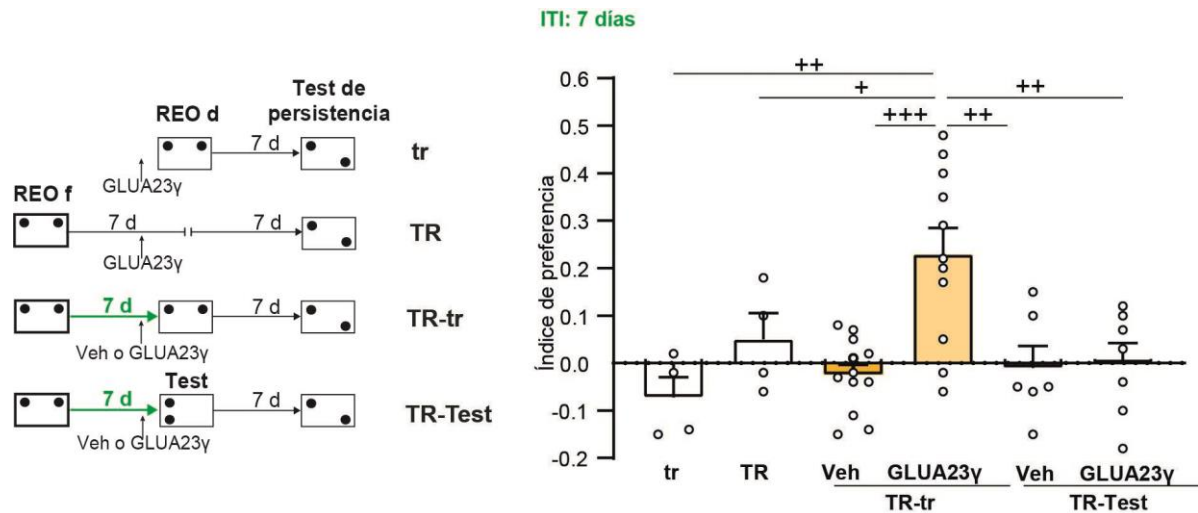


Figura 8: El bloqueo de la endocitosis del receptor AMPA que contiene GluA2 promueve la persistencia de la MLT-REO inducida por el reentrenamiento espaciado por 7 días. El diagrama de la izquierda muestra el diseño experimental. (A) Los grupos de control fueron infundidos con GluR23γ 1 h antes de una sesión de REOd (tr, n = 4) o 7 días después de una sesión de REOf (TR, n = 4). Las ratas fueron entrenadas con una sesión de REOf y, 7 días después, animales independientes recibieron infusiones intra-hipocampales de Veh (n = 12) o GluR23γ (n = 11) 1 h antes de un reentrenamiento de REOd (TR-tr); otros grupos fueron infundidos con Veh (n = 6) o GluR23γ (n = 7) 1 h antes de una sesión de test de 2 minutos (TR-Test). La MLT-REO se evaluó 14 días después de la primera sesión de entrenamiento. Los datos se expresan como media ± SEM. +P < 0.05, ++P < 0.01, +++P < 0.001, Newman-Keuls después de un ANOVA de una vía.

La provisión de PRPs previa al re-entrenamiento espaciado por 7 días promueve la persistencia de la memoria

Como se mencionó anteriormente, la provisión de PRPs puede promover la formación de una MLT a partir de un REOd. A su vez se demostró que las proteínas provenientes de la expresión de la memoria son importantes al momento del re-entrenamiento para la promoción de la persistencia. Basándose en esto, se investigó el efecto del suministro de PRPs previo al segundo entrenamiento utilizando un ITI de 7 días, por ser un protocolo que no induce persistencia de la memoria (Fig. 3). Los animales fueron entrenados con una sesión de REOf y 7 días después, momento en el

que no expresan MLT (Fig.1B), realizaron una segunda sesión de REOd (Fig.9 TR-tr). Un grupo además fue expuesto a un campo abierto novedoso 1 hora después del re-entrenamiento (TR-tr+CA). La MLT se evaluó 7 días después del segundo entrenamiento. Se observó que el aprendizaje espaciado formó una memoria persistente en el grupo que fue expuesto al CA (Fig. 9, ANOVA de una vía $F(2, 23) = 24.48$, $P < 0.001$, pruebas múltiples de Newman–Keuls TR-tr + CA, $P < 0.001$ vs todos los grupos). Este resultado sugiere que la exploración del CA podría proporcionar las PRPs a la etiqueta establecida por el REOd durante el re-entrenamiento, realizado 7 días después del primer entrenamiento, necesarias para promover la persistencia de la traza.

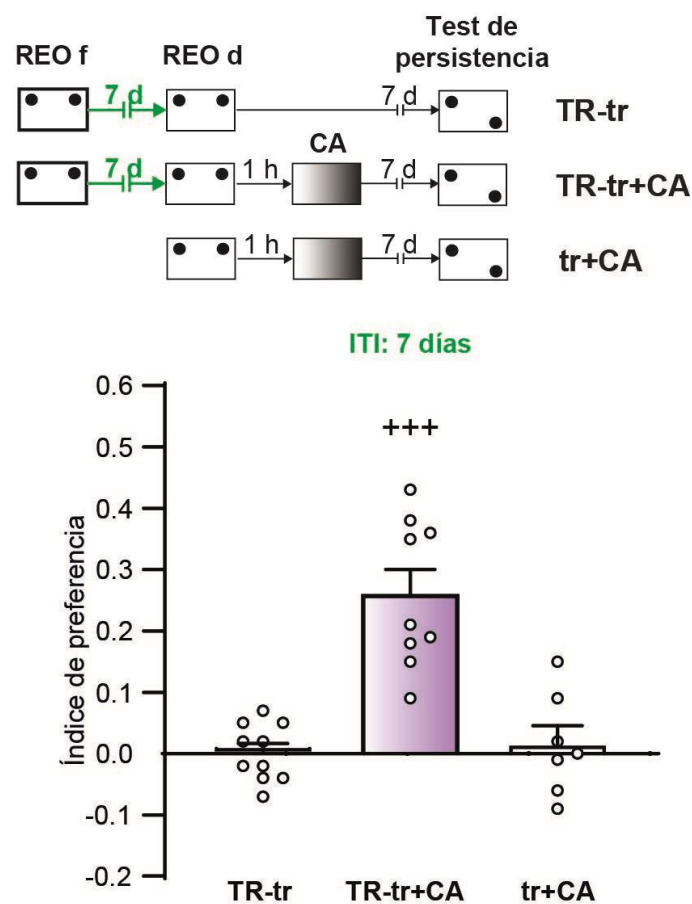


Figura 9: La exploración a un campo abierto promueve la persistencia de la memoria inducida por el re-entrenamiento espaciado por 7 días. Los animales fueron re-entrenados con una sesión de REOd 7 días después de una sesión de entrenamiento de REOf (TR-tr, $n = 10$). También se expuso a un grupo independiente de animales a una sesión de CA novedosa 1 hora después del re-entrenamiento (TR-tr-CA, $n=9$). El grupo control fue expuesto a una sesión de CA 1 hora después de una sesión de entrenamiento de REOd (tr+CA, $n=7$). Se evaluó la MLT-REO 14 días

después de la sesión de entrenamiento de REOf. Los datos se expresan como media \pm SEM. +++ $P < 0.001$ vs todos los grupos, Newman–Keuls después de un ANOVA de una vía.

DISCUSIÓN I

El objetivo de este capítulo fue estudiar y analizar los mecanismos y condiciones que mejoran la persistencia de la memoria de REO a través del aprendizaje espaciado. Los resultados principales demuestran que luego de que una memoria de REO se consolida, existe una ventana temporal dentro de la cual una sesión de re-entrenamiento posee efectos beneficiosos para su persistencia. Nuestros datos sugieren que el factor determinante de esa ventana es la capacidad de expresión de la memoria previamente formada. A su vez, se pone de manifiesto que el efecto promotor sobre la persistencia de la traza mnésica ocurre específicamente por la exposición de los animales a una sesión de REOd, ya que si ésta es reemplazada por una sesión de evaluación (test), la memoria original no prolonga su duración. Nuestro estudio descarta que se requiera de los mecanismos de fortalecimiento o de labilización de la memoria de REO para promover su persistencia, ya que la sesión de re-entrenamiento no induce ninguno de ellos. Proponemos que la reactivación de los sitios neurales específicos activados por la primera sesión de entrenamiento y el uso de PRPs (probablemente los necesarios para la expresión de la memoria y/o los inducidos por la evocación) son necesarios, en el momento del re-entrenamiento débil, para mantener la memoria de REO a lo largo del tiempo. Este es el mecanismo celular que opera en el proceso de EC, que implica el etiquetado específico de los sitios activados por el aprendizaje y el uso de proteínas de plasticidad. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el proceso de etiquetado depende de la actividad de ERKs1/2 y que los receptores AMPA que contienen GluA2 actuarían como proteínas necesarias para promover la persistencia de la MLT-REO inducida por re-entrenamientos espaciados.

Como se mencionó, una sesión de test realizada 24 horas después de una sesión de entrenamiento de REOf no es efectiva para inducir la persistencia de la MLT-REO (Fig. 2), aunque estudios muestran que es capaz de labilizar esta traza de memoria (Orlandi y col., 2020). Sin embargo, una sesión de reentrenamiento de REOd, que no desencadena un proceso de reconsolidación (Fig. 4), es efectiva para inducir la persistencia de la traza (Fig. 2). Por lo que, aunque no es esencial labilizar la traza de memoria para promover su persistencia, la reactivación de sustratos neurales similares a los del entrenamiento inicial sería relevante. Probablemente, la superposición neuronal inducida por una sesión de test no sería suficiente para causar este efecto. Existe evidencia de que las representaciones de la memoria espacial interrumpida vuelven a emerger en la misma forma después del reaprendizaje (Gridchyn y col., 2020). Por otro

lado, aunque la mayoría de los estudios observacionales han revelado que la superposición entre poblaciones de neuronas activas durante el entrenamiento y el test supera los niveles de probabilidad, la correspondencia general entre estas dos poblaciones es relativamente baja (aproximadamente del 10 al 40%, según el estudio) (Richards y Frankland, 2013; Rubin y col., 2015). Además, observamos que la exploración a un campo abierto un día después del entrenamiento de REO no indujo la persistencia de la MLT-REO (Fig. 3A). Esto podría deberse a una baja superposición entre los sitios activados originalmente por el entrenamiento REO y los activados por explorar el CA al día siguiente, lo que resultó insuficiente para promover la persistencia de la memoria. En cambio, la experiencia con una sesión de re-entrenamiento, ofrecería una alta superposición con los sitios activados originalmente, lo que proporcionaría un proceso de re-etiquetado que indica los sitios en el que las PRPs podrían usarse para mantener la traza.

Se ha propuesto que la evocación de la memoria implica dos instancias: una de ejecución (expresión de la memoria) y una de integración (reconsolidación) (Rodríguez-Ortiz y Bermúdez-Rattoni, 2017). Además, aunque se requiere una fase de integración para desestabilizar y modificar la traza de la memoria, la reconsolidación de la memoria se puede lograr con un recordatorio que no induce expresión (Balderas y col., 2013; García-DeLaTorre y col., 2009; Mamou y col., 2006; Rodríguez-Ortiz y col., 2012; Santoyo-Zedillo y col., 2014). Nuestros resultados revelaron que la persistencia de la memoria inducida por el re-entrenamiento no requiere del mecanismo de reconsolidación, pero sí de los mecanismos de expresión de la memoria. Se observó que un re-entrenamiento de REO promueve la persistencia de la MLT-REO si se realiza 1 día pero no 7 días después de la primera sesión de REO, momento en el cual la memoria ya no es expresable. Aunque la expresión conductual de la memoria en el momento de la segunda sesión no se puede registrar en el protocolo de re-entrenamiento, la MLT mostrada por los animales evaluados 1 día después de la sesión de REO confirma que el mecanismo molecular de expresión está disponible en ese momento. Estudios previos han informado que el mecanismo de expresión de la memoria requiere la actividad de los receptores de NMDA, mTOR y la síntesis continua de proteínas (López y col., 2015). La infusión de rapamicina o anisomicina antes de la sesión de test de memoria para diversos tipos de tareas de comportamiento, como evitación inhibitoria, condicionamiento contextual al miedo, REO o laberinto acuático de Morris, ha demostrado que afecta la expresión de la MLT (Lopez y col., 2015; Pereyra y col., 2018; Rodríguez-Ortiz y col., 2008). En este estudio, se confirmó que la administración de rapamicina o emetina 15 minutos antes de la sesión de test inhibe la

expresión de la MLT-REO, y se encontró que estos tratamientos antes de la sesión de re-entrenamiento afectan la persistencia de la memoria de REO (Fig. 5). Además, se observó la ausencia de persistencia de la traza cuando el re-entrenamiento se realizó 1 día después de una sesión de entrenamiento de REOd, cuando la memoria no se expresa debido a las condiciones del entrenamiento original (Fig. 3). En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que el mecanismo de expresión de la MLT es necesario para promover la persistencia de la traza de la memoria inducida por el reentrenamiento.

El proceso de reconsolidación se ha planteado como un reforzador de la traza de memoria evaluada 1 día después de la sesión recordatoria. Estudios previos han observado este efecto utilizando dos ensayos separados por un día en una tarea de condicionamiento del miedo (Lee, 2008), así como mediante una sesión de test seguida de un condicionamiento en la misma tarea (Tay y col., 2019). Los resultados presentados anteriormente, muestran que el protocolo de re-entrenamiento no fortalece la formación de la memoria ni desestabiliza la traza (Fig. 4). Esto puede deberse a que el primer entrenamiento es fuerte y el segundo es débil, por lo que la información en la memoria original no se actualiza ni se refuerza (Rodríguez-Ortiz y Bermúdez-Rattoni, 2017). Este resultado es similar al encontrado por Levitán y colaboradores (Levitán y col., 2010) utilizando el modelo de *Aplysia californica* en respuesta a un entrenamiento con comida no comestible (inedible-food). En ese trabajo, un entrenamiento fuerte indujo una memoria de 1 día, pero no de 2 días, y un entrenamiento débil no indujo una memoria a largo plazo. Los autores observaron que un entrenamiento débil presentado 1 día después de un entrenamiento fuerte fue capaz de inducir que la traza de memoria persista durante 2 días, y este efecto fue abolido por la administración de anisomicina antes del re-entrenamiento débil. Los autores concluyeron que la anisomicina bloqueaba el proceso de reconsolidación. Sin embargo, según nuestros hallazgos, debería considerarse el papel de la anisomicina en el deterioro de los mecanismos de expresión de la memoria.

Como se explicó anteriormente, no todos los recordatorios desestabilizan la traza de memoria. Merlo y colaboradores (Merlo y col., 2018) sugieren que diferentes tipos de recordatorios, dados 1 día después de un entrenamiento de miedo, son clave para desencadenar diferentes procesos, ya sea el de reconsolidación, extinción o un estado de memoria denominado limbo (una nueva fase de evocación insensible a la reconsolidación o extinción). Estos autores observaron que mientras las intervenciones que inducían la reconsolidación de la memoria resultaron en niveles elevados de pERKs1/2, otras intervenciones que no inducían este proceso tampoco alteraron los

niveles de pERKs1/2. En estudios anteriores de nuestro grupo, se demostró que la actividad de las ERKs1/2 es necesaria para el establecimiento de la etiqueta de aprendizaje en los sitios activados por la sesión de REO (Tintorelli y col., 2020). Estos resultados concuerdan con la evidencia que indica que la activación de las ERKs1/2 es específicamente necesaria para el establecimiento de etiquetas sinápticas asociadas a la depresión a largo plazo (Sajikumar y col., 2007), un modelo de plasticidad celular asociado con la adquisición de memoria espacial para la ubicación de objetos en roedores (Kemp y Manahan-Vaughan, 2004). En esta tesis se describe que la infusión del inhibidor de las ERKs1/2 (U0126) en el hipocampo dorsal antes de la sesión de re-entrenamiento perjudica la inducción de la persistencia de la memoria (Fig. 5F) y también bloquea la expresión de la MLT-REO cuando se administra antes de una sesión de test (Fig. 5C). Sin embargo, la amnesia inducida por U0126 no pudo ser revertida por la exposición a un CA novedoso (proveedor de PRPs) después del re-entrenamiento (Fig. 6B). Por lo tanto, sin descartar un posible papel de las ERKs1/2 en la síntesis de PRPs, este resultado sugiere que la actividad de las ERKs1/2 es relevante para marcar los sitios durante el re-entrenamiento. En contraste, la inyección local de inhibidores de la síntesis de proteínas antes del re-entrenamiento inhibió la persistencia de la MLT, pero este efecto fue revertido por la exposición a un OF después del re-entrenamiento. Este resultado concuerda con los hallazgos que muestran que los inhibidores de la síntesis de proteínas no interrumpen la etiqueta de aprendizaje (Moncada y Viola, 2007; Ballarini y col., 2009).

Además del proceso de re-etiquetado de los sitios de aprendizaje, nuestra hipótesis postula que se requieren las proteínas involucradas en la expresión de la memoria para la persistencia de la traza de REO. En este sentido, algunas de estas proteínas podrían ser las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA. Lopez y col. (2015) describieron que la expresión de la memoria requiere la síntesis de proteínas en curso y el tráfico a la membrana del receptor AMPA, mediado por la actividad del receptor NMDA. Estos autores demostraron que la administración de rapamicina antes de una sesión de test de condicionamiento de miedo perturbó el tráfico de GluA1 a la densidad postsináptica y la expresión de la memoria. Se conoce que la activación de mTORC1 aumenta los niveles de GluA1 en la ventana de formación de una memoria de evitación inhibitoria (Slipczuk y col., 2009). En el trabajo de Pedroso y colaboradores (Pedroso y col., 2013), se describió que la evocación de la memoria de evitación inhibitoria puede llevar al fortalecimiento de la memoria, un efecto dependiente de la actividad de mTORC1 después de la reactivación. Esto nos llevó a considerar que la señalización de mTORC1 podría permanecer activa después de la evocación y

desempeñar un papel en la síntesis de proteínas inducida por la reactivación. Sin embargo, no podemos descartar que la actividad de mTORC1 sea necesaria para el mecanismo de etiquetado. Existen evidencias de este mecanismo en un estudio de Sosanya y colaboradores (Sosanya y col., 2015), quienes demostraron que el receptor NMDA activa mTORC1 y que HuD estabiliza al ARNm de CAMKII α y media su expresión en los sitios donde funciona este mecanismo y de esta manera los señala.

Los experimentos revelaron que no hay efecto sobre la persistencia de la memoria de REO cuando los animales son re-entrenados con una sesión de REOd una semana después de una sesión de REOf. Sin embargo, se encontró que la administración del inhibidor de la endocitosis de GluA2 antes del re-entrenamiento de REOd promovió la retención de la memoria de REO (Fig. 7A). Este efecto no se manifestó cuando los animales fueron sometidos a una sesión de test en lugar de una sesión de re-entrenamiento. Por otro lado, evidencian que es importante reactivar los sitios estimulados originalmente y que la disponibilidad de receptores AMPA que contienen GluA2 es suficiente para promover la persistencia de la MLT-REO. Nuestro estudio respalda la idea de que el mecanismo ya no está disponible una semana después del entrenamiento de REO. Sin embargo, al bloquear artificialmente la endocitosis de GluA2, se promueve la persistencia de la memoria. Es decir que en ausencia del mecanismo de expresión de la memoria y las proteínas asociadas a él, la disponibilidad de subunidades GluA2 en la membrana podría suplir o prevenir dicha falencia. En este sentido, se demostró que la exploración de un CA novedoso 1 hora después del re-entrenamiento también promueve la persistencia de la traza, probablemente a través de la provisión de PRPs (Fig. 7B).

Finalmente, nuestros resultados pueden ser analizados considerando el fenómeno de la metaplasticidad, un término que describe cómo la plasticidad sináptica puede regularse mediante la actividad sináptica previa (Abraham y Bear, 1996; Schmidt y col., 2013). En otras palabras, el impacto de la historia del animal en la plasticidad sináptica podría afectar las habilidades de aprendizaje y memoria posteriores (Parsons, 2018). En este marco, la cantidad de subunidades de receptores AMPA y otras proteínas en la sinapsis en el momento del re-entrenamiento podría considerarse un cambio metaplástico derivado del primer entrenamiento. También es importante destacar que los estudios *in vitro* han informado que la duración de la etiqueta puede prolongarse en función de la metaplasticidad inducida por la activación previa de receptores de rianodina o mGluR (Li y col., 2014; Sajikumar y col., 2009). Por lo tanto, dado que el establecimiento de la etiqueta puede ser alterado por procesos de metaplasticidad, no

podemos descartar que el primer entrenamiento modifique las características de la etiqueta inducida por el re-entrenamiento.

En este capítulo, estudiamos el mecanismo que subyace a la persistencia de la memoria de REO después de un re-entrenamiento espaciado. Planteamos que el destino de la memoria está influenciado por la naturaleza de los eventos que tienen lugar horas después del entrenamiento original. Postulamos que varios procesos operan en este efecto y proponemos los siguientes mecanismos basándonos en los resultados obtenidos:

(a) Se evidenció que el re-entrenamiento demostró ser altamente efectivo para promover la persistencia de la memoria de REO. Por lo que, planteamos que el evento recordatorio promueve la persistencia de la traza original dependiendo de la proporción de sitios originales que pueden reactivarse. Así, durante una sesión de re-entrenamiento, la reactivación de las etiquetas sería más completa en comparación con una sesión de test o con la exposición a un CA novedoso, donde esta reactivación sería parcial.

(b) El evento promovió la persistencia de la memoria mientras la traza original era expresable.

(c) No resultó necesario que el evento reforzará la formación de la memoria o labilizara la traza original.

(d) En caso de que el proceso de re-etiquetado o la disponibilidad de PRPs se encontraron afectados en el re-entrenamiento, no se evidenció la persistencia de la memoria.

En resumen, los resultados de este estudio sugieren que el protocolo más efectivo para la persistencia de la memoria implica una sesión de re-entrenamiento en un momento en que la traza original aún es recuperable y expresable. Se demostró la necesidad de la actividad de ERKs1/2 y la disponibilidad de receptores AMPA que contienen GluA2 en la sesión de re-entrenamiento, lo que sugiere sus roles en el proceso de re-etiquetado en los sitios originalmente activados, donde se pueden utilizar diversos PRPs para mantener la plasticidad. Proponemos que el EC es un mecanismo celular que explica nuestros hallazgos y que el establecimiento de una etiqueta de aprendizaje y la síntesis de proteínas son dos procesos necesarios para garantizar la persistencia de la memoria REO.

CAPÍTULO II

EFFECTOS DEL APRENDIZAJE ESPACIADO SOBRE LA MEMORIA GRÁFICA EN ESTUDIANTES DE PRIMARIA

En el capítulo anterior se demostró que cuando la traza de una memoria espacial está en condiciones de expresarse, una sesión de re-entrenamiento extiende su durabilidad, y se han detallado algunos de los mecanismos celulares subyacentes. En esta sección, se llevó a cabo una investigación translacional utilizando actividades gráficas con estudiantes de escuela primaria. El objetivo principal fue determinar intervalos óptimos entre sesiones de aprendizaje para mejorar la persistencia de la memoria en el entorno escolar.

Estudios previos en nuestro laboratorio fueron realizados en el ámbito educativo con el objetivo de identificar los factores que inciden en los procesos de aprendizaje y memoria en el aula, y cómo ejercen su influencia. Se ha descrito que una novedad separada una hora del aprendizaje mejora la formación de memorias en el aula (Ballarini y col., 2013), siendo ese efecto persistente (Ramirez Butavand y col., 2020). También se demostró que un examen en el nivel secundario presenta efectos sobre la formación de otra memoria (Lopes da Cunha y col., 2018). Análisis de los requerimientos temporales o de la familiaridad o novedad del evento, por ejemplo, han permitido sugerir que el mecanismo de EC puede ser subyacente a estos fenómenos.

En este capítulo realizamos actividades en estudiantes de escuelas primarias para caracterizar el tiempo más efectivo para favorecer la persistencia de una memoria gráfica luego de dos sesiones de aprendizaje. Para ello diseñamos un protocolo de aprendizaje espaciado en la tarea de la figura de Rey Osterrieth utilizando una primera sesión de aprendizaje seguida de una sesión de re-entrenamiento o de test.

MATERIALES Y MÉTODOS II

Sujetos experimentales:

En los experimentos detallados en esta sección participaron 363 estudiantes de 8 a 11 años provenientes de tres colegios primarios del Gran Buenos Aires (Argentina). Dicha participación fue aceptada y autorizada con anticipación por las autoridades del colegio. Los experimentos detallados en este capítulo fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación Biomédica del Instituto de Tisioneumonología “Profesor Doctor Raúl Vaccarezza”.

La información y desempeño personal de cada participante en cada una de las tareas realizadas resultó confidencial y no fue utilizada por el grupo de investigación ni por la institución educativa pertinente para realizar ningún tipo de evaluación académica o clínica de los estudiantes. Al finalizar las sesiones correspondientes se le informó a cada curso el objetivo específico de nuestras actividades.

Figura de Rey-Osterrieth

Para estudiar los procesos de memoria se utilizó la figura de Rey-Osterrieth (o simplemente, figura de Rey) como una forma de aprendizaje gráfico. Este test fue evaluado en trabajos previos del laboratorio con fines similares (Ballarini y col., 2013). Se diseñó un protocolo basado en la versión simplificada de esta figura debido a la edad de los participantes (Cortes JF, 1997). Dicha figura está compuesta por 11 elementos geométricos que, en conjunto, componen la imagen de la figura (Fig M.6).

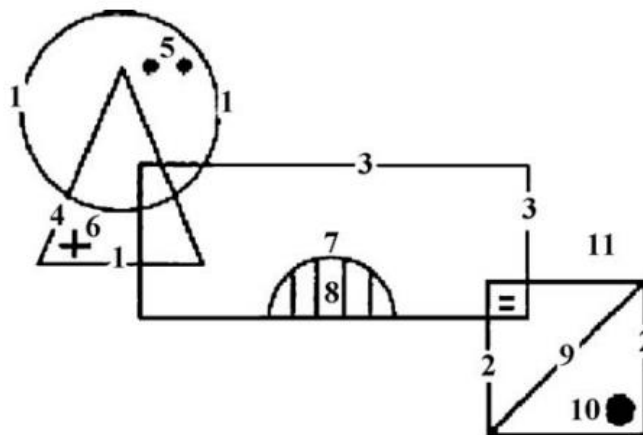


Figura M.6: Figura de Rey-Osterrieth versión para niños. La figura consta de 11 elementos que se analizaron según cómo y en qué posición fueron copiados y dibujados en las sesiones de entrenamiento y evaluación, respectivamente. Un método estandarizado se utilizó para corregir y extraer los datos sobre el rendimiento de memoria de cada participante.

La elección de dicha figura se basó en que la imagen cuenta con un protocolo de corrección estandarizado (Rey, 1959; Shin y col., 2006); y que resulta desconocida por los participantes, logrando de esta manera que forme un nuevo aprendizaje, libre de experiencias previas que generen un sesgo en los resultados.

La tarea constó de dos tipos de sesiones: entrenamiento y test (Fig. M.7). En la sesión de entrenamiento (Copia) se le entregó a cada participante una hoja en cuya parte superior se encontraba la figura de Rey y, en cuya parte inferior disponían de espacio en blanco para copiarla en un período máximo de 5 minutos. Los dibujos se realizaron a mano alzada, sin la ayuda de ningún útil escolar como regla o compás. En la sesión de evaluación (Test), se le repartió a cada estudiante una hoja en blanco en la cual debían dibujar lo que recordaban de la figura copiada durante el entrenamiento, también en un período de 5 minutos. Se enfatizó que la reproducción del dibujo debía realizarse de manera individual.

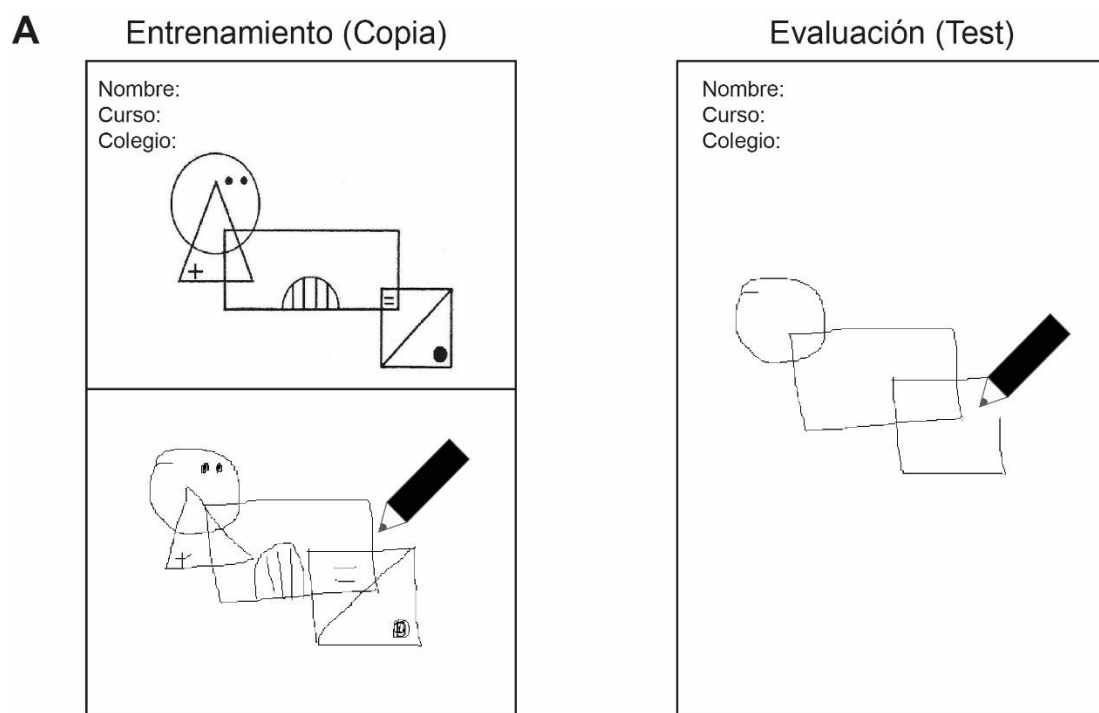


Figura M.7: Protocolo para evaluar una memoria gráfica en estudiantes. A) En el entrenamiento (Copia) los estudiantes copiaron la figura de Rey durante 5 minutos. Durante la evaluación (Test), se les pidió que intentarían reproducirla según lo que recordaban, en un periodo de 5 minutos.

Como se mencionó anteriormente, la figura de Rey cuenta con un método de corrección estandarizado que permite cuantificar el rendimiento de los participantes en dicha tarea. En la corrección se consideraron la ubicación y la precisión de cada uno de los 11 elementos geométricos. El puntaje se obtuvo comparando el elemento dibujado en la sesión de test con respecto al mismo elemento dibujado en el entrenamiento

(sesión de copia), teniendo en cuenta la asignación de puntajes establecidos en la Tabla 1. En síntesis: si un elemento no había sido dibujado en el test se lo consideraba como nulo, es decir, sumaba 0 puntos; si el elemento había sido dibujado correctamente pero en otra posición con respecto al entrenamiento, sumaba 1 punto; si el elemento había sido dibujado en el lugar correcto pero de manera imprecisa también sumaba 1 punto; si había sido dibujado de manera distorsionada y además ubicado en un lugar incorrecto, sumaba 1/2 punto. Por último, si el objeto había sido ubicado y dibujado de manera precisa sumaba 2 puntos.

Elemento	Posición	Puntaje
Correcto	Correcta	2
	Incorrecta	1
Distorsionado pero reconocible	Correcta	1
	Incorrecta	1/2
Ausente o irreconocible		0

Tabla 1: Sistema de puntuación del paradigma de memoria gráfica conocido como Figura de Rey.

Diseño experimental:

Para investigar el efecto del aprendizaje espaciado en la persistencia de la memoria, se utilizó un protocolo (Fig. M.8) de dos sesiones con intervalos inter-sesiones (ITI) que variaron entre 1 día a 6 semanas.

Para cada experimento con distintos ITIs, se trabajó con tres cursos paralelos de estudiantes que tenían la misma edad y asistían a la misma institución. Inicialmente todos los grupos realizaron una sesión de copia de la figura. Luego, uno de los cursos fue asignado al grupo de re-entrenamiento, que completó una segunda sesión de copia idéntica a la primera. Otro curso fue designado como el grupo re-test y participaron en una sesión de test durante su segunda sesión. Por otro lado, al grupo control se le pidió copiar una lista de números en un papel en blanco durante su segunda sesión. La persistencia de la MLT de la figura fue evaluada una semana después de la segunda sesión.

Para cada estudiante, se calculó un Índice de Memoria, como la proporción entre el puntaje obtenido al dibujar la figura en el día del test y el puntaje al copiar la figura en el día de entrenamiento (primera sesión).

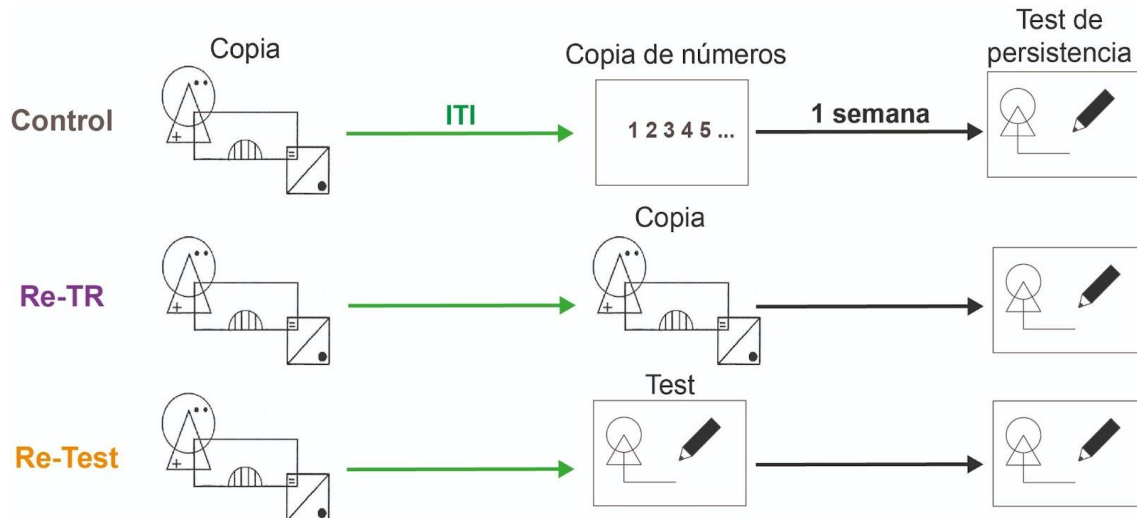


Figura M.8: Diseño experimental para evaluar el aprendizaje espaciado en una memoria gráfica. Inicialmente, los estudiantes copiaron la figura de Rey Osterrieth. Luego, tuvieron o no (Control) una segunda sesión (Re-TR o Re-Test) espaciada desde la copia por un intervalo entre sesiones (ITI).

Análisis estadístico:

Los resultados se presentaron como media \pm error estándar (SEM). Las diferencias en el índice de memoria entre grupos se analizaron con una prueba ANOVA de una o dos vías seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey cuando se compararon tres o más grupos. Los análisis se realizaron en GraphPad Prism versión 8.00 (GraphPad Software, La Jolla, California, EE. UU.). Los efectos se consideraron significativos cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS II

Una sesión de re-entrenamiento o test experimentada hasta dos semanas posteriores al primer entrenamiento mejora la persistencia de una memoria gráfica

El primer objetivo fue comparar las tasas de retención de la MLT después de una o dos sesiones de aprendizaje en tres grupos experimentales diferentes. El grupo control realizó una única sesión de copia y durante la segunda sesión, copiaron una secuencia lineal de números. El grupo de re-entrenamiento (Re-TR) tuvo dos sesiones idénticas de copia, mientras que el tercer grupo (Re-Test) realizó una sesión de copia seguida de una sesión de test como segunda sesión (esquema superior en la Fig. 10) . Al igual que en capítulo 1 de esta tesis, la persistencia de la memoria fue evaluada una semana después de la segunda sesión, representando un momento en el cual se esperaba que la MLT estuviera consolidada y almacenada de manera persistente. Se observó una mejor persistencia de la MLT en comparación con el grupo de control en el grupo de estudiantes que recibió un re-entrenamiento o un test como segunda sesión 2 días, 1 o 2 semanas después de la primera (Fig. 10.A, ANOVA de una vía $F(2, 47) = 23,79$, $P < 0,05$; Fig. 10.B, ANOVA de una vía $F(2, 47) = 27,00$, $P < 0,05$; Fig. 10.C, ANOVA de una vía $F(2, 46) = 37,50$, $P < 0,05$; prueba de comparaciones múltiples de Tukey Re-TR y Re-Test vs control $***P < 0,001$).

Sin embargo, cuando el intervalo entre sesiones fue de 3 o 6 semanas, el re-entrenamiento fue la única forma efectiva de promover la persistencia de la memoria (Fig. 10.D, ANOVA de un factor $F(2, 55) = 37,04$, $P < 0,05$; Fig. 10.E, ANOVA de un factor $F(2, 52) = 40,22$, $P < 0,05$; prueba de comparaciones múltiples de Tukey Re-TR vs control y Re-Test $***P < 0,001$). En esos casos no se observaron diferencias entre el grupo control y Re-Test. Estos resultados sugieren que aplicar un test como segunda sesión potenció la persistencia de la MLT de los estudiantes solo cuando el intervalo entre sesiones fue corto. Por otro lado, el uso de una segunda clase de aprendizaje asegura una mejor retención de lo aprendido, incluso cuando está espaciado meses después de la primera clase.

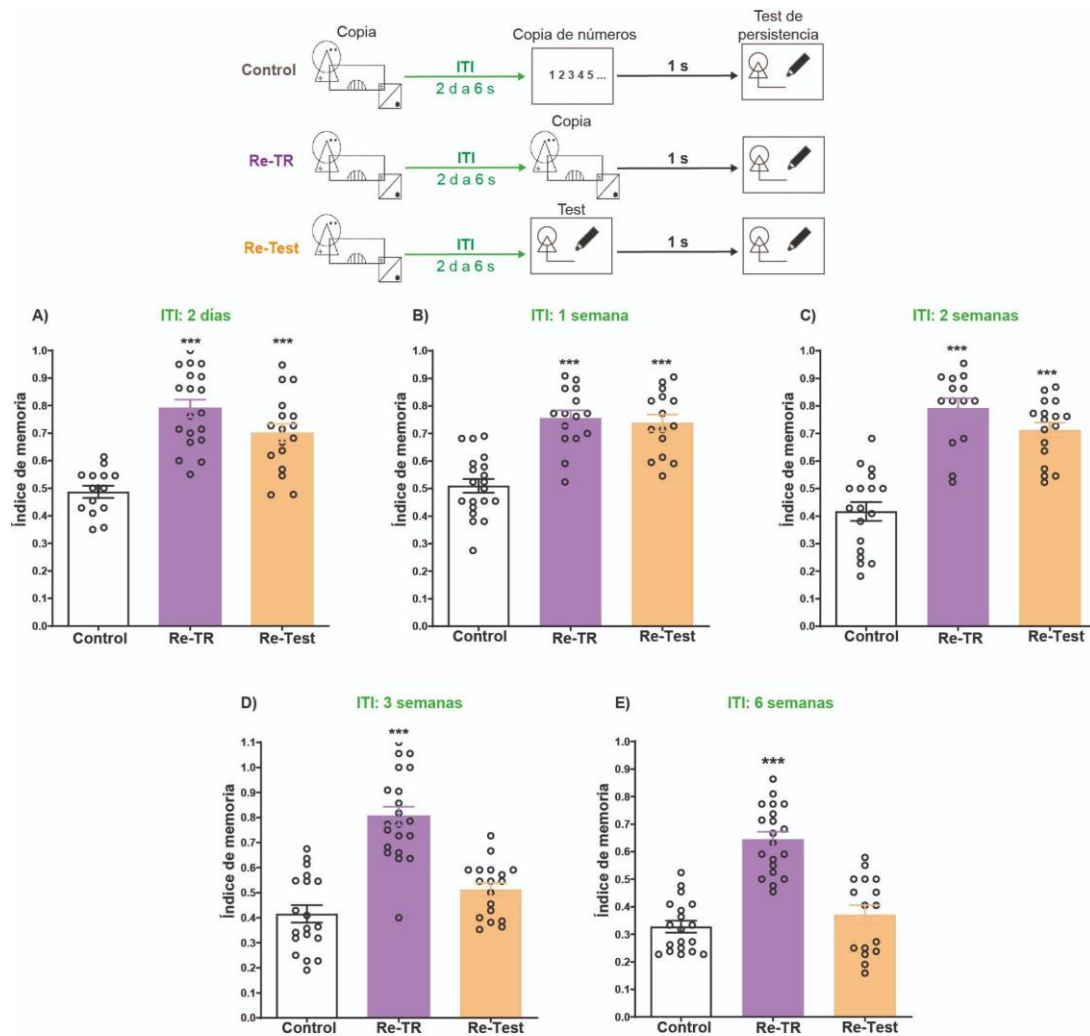


Figura 10: Las sesiones de re-entrenamiento y test realizadas 2 días, 1 o 2 semanas después de la primera sesión de aprendizaje mejoran significativamente la persistencia de la memoria gráfica, en comparación con el grupo de control. Después de un intervalo de 3 semanas entre sesiones, solo el re-entrenamiento resulta efectivo para mejorar la persistencia de la memoria. El diagrama superior muestra el protocolo experimental: se pidió a los estudiantes que copiaran la figura de Rey Osterrieth. Posteriormente, tuvieron o no (Control) una segunda sesión (Re-TR o Re-Test) espaciada desde la copia por un intervalo entre sesiones (ITI) de A) 2 días ($n=14-19$), B) 1 semana ($n=15-20$), C) 2 semanas ($n=14-18$), D) 3 semanas ($n=18-21$) o E) 6 semanas ($n=16-20$). En la segunda sesión, los estudiantes del grupo de control copiaron una lista de números. La persistencia de la MLT se evaluó 1 semana después. Los participantes evaluados en el mismo ITI se encontraban en condiciones comparables (misma edad, con la copia realizada el mismo día y a la misma hora del día). El Índice de Memoria se muestra como media \pm SEM. El número de estudiantes en los diferentes grupos experimentales se detalla dentro de cada barra. A-C) *** $P<0,001$ vs Control, prueba de comparaciones múltiples de

*Tukey después de un ANOVA de una vía. D-E) *** $P < 0,001$ vs Control y Re-Test, prueba de comparaciones múltiples de Tukey después de un ANOVA de una vía*

El protocolo de re-entrenamiento espaciado por 1 o 3 semanas sostuvo la memoria gráfica durante al menos 7 semanas

En la Fig. 10.B, se muestra que si una semana después de una sesión de aprendizaje, los estudiantes reciben una sesión de re-entrenamiento o una sesión de test, exhiben una MLT significativamente mejor una semana después en comparación con el grupo de control.

A partir de este resultado, el segundo objetivo fue estudiar la durabilidad de esta mejora observada en ambos grupos a lo largo del tiempo. Con este fin, se llevó a cabo el mismo diseño experimental, pero se registró la MLT una o siete semanas después de la primera copia. Como se observa en la Fig. 11.A, a las siete semanas la MLT inducida por la sesión de test decae y la memoria se mantiene solo en el grupo de Re-TR (ANOVA de dos vías, Interacción $F(2, 94) = 4,015$, $P < 0,05$, Efectos simples: prueba de comparaciones múltiples de Tukey *** $P < 0,001$ Control vs Re-TR y Re-Test, ### $P < 0,001$ Re-Test vs Control y Re-TR).

Luego, se realizó el mismo estudio para los grupos de estudiantes que realizaron las sesiones espaciadas por 3 semanas, ITI en el cual solo el grupo de Re-TR mostró mejoras en la persistencia de la memoria (Fig. 10.D). También en este caso, la mejora en la retención de la memoria se mantuvo durante al menos 7 semanas después del primer entrenamiento (Fig. 11.B; ANOVA de dos vías, Interacción $F(2, 103) = 1,175$, $P > 0,05$, Efecto principal: prueba de comparaciones múltiples de Tukey +++ $P < 0,001$ Re-TR vs Control y Re-Test). Estos resultados sugieren que la implementación del re-entrenamiento parece ser la herramienta más apropiada para preservar la memoria de la información aprendida de forma reciente o remota.

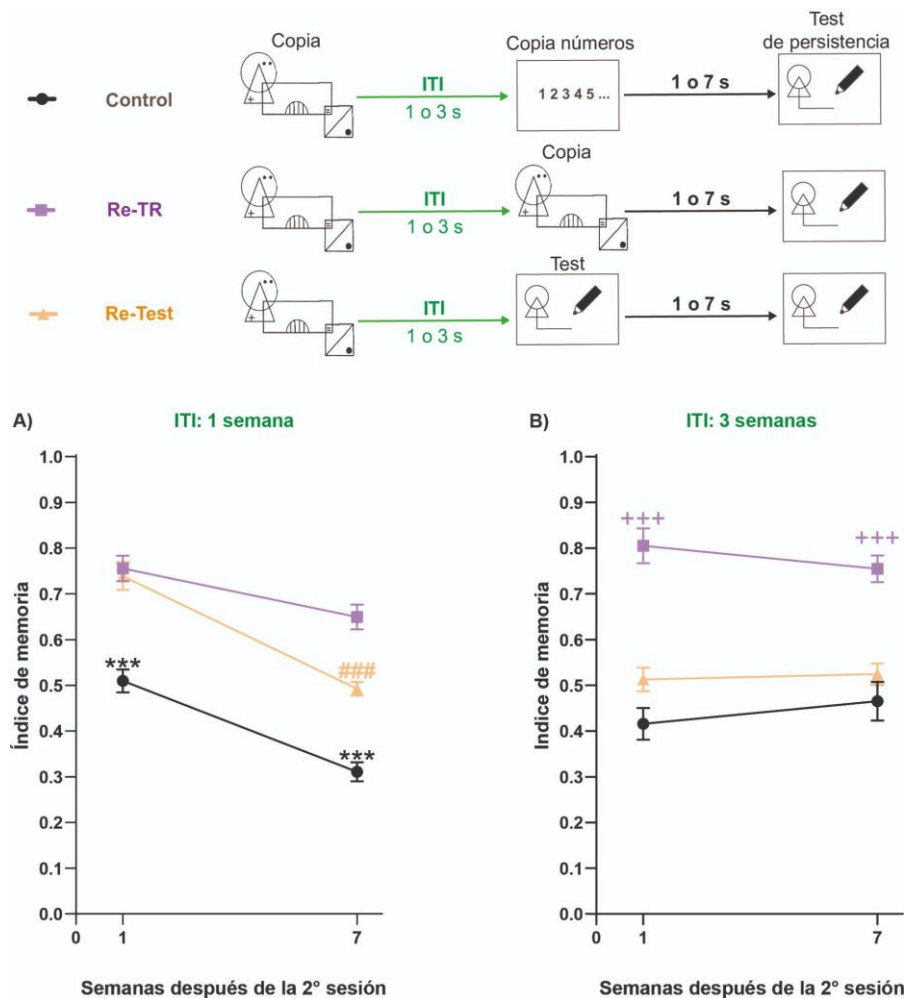


Figura 11: La mejora en la persistencia de la MLT gráfica inducida por el re-entrenamiento, pero no por una sesión de test, se mantuvo durante al menos 7 semanas. El diagrama superior muestra el protocolo experimental: se pidió a los estudiantes que copiaran la figura de Rey Osterrieth. Luego, tuvieron o no (Control) una segunda sesión (Re-TR o Re-Test) espaciada desde la copia por un intervalo entre sesiones (ITI) de A) 1 semana ($n=15-20$) o B) 3 semanas ($n=14-18$). Los estudiantes del grupo de control copiaron una lista de números como segunda sesión. La MLT fue evaluada 1 o 7 semanas después. Los participantes evaluados con el mismo ITI se encontraban en condiciones comparables (misma edad, con la copia realizada el mismo día y hora). El Índice de Memoria se muestra como media \pm SEM. A) *** $P<0,001$ Control vs Re-TR y Re-Test, ### $P<0,001$ Re-Test vs Control y Re-TR, prueba de comparaciones múltiples de Tukey (análisis de efectos simples) después del ANOVA de dos vías. B) +++ $P<0,001$ Re-TR vs Control y Re-Test, prueba de comparaciones múltiples de Tukey (análisis de efectos principales) después del ANOVA de dos vías.

El olvido está asociado con la pérdida de efectividad de una segunda sesión de aprendizaje.

Una de las teorías que explica la efectividad del aprendizaje espaciado se centra en la relevancia de la evocación de la información en el momento de la siguiente sesión (Smolen y col., 2016). En los resultados obtenidos en roedores descritos en el capítulo anterior, se observó que si la memoria del primer entrenamiento puede ser evocada durante el re-entrenamiento, este último resulta efectivo en extender la persistencia de la memoria. Basándose en estos antecedentes, se investigó una posible relación entre los porcentajes de memoria presentes en el momento de la segunda sesión y la persistencia de la memoria inducida por esa sesión.

Considerando el índice de memoria en la primera sesión de test de los grupos de Re-Test en la Fig. 10, se construyó un gráfico que representa la curva de decaimiento de la MLT en función del tiempo (olvido). Por lo tanto, después de una única sesión de aprendizaje (copia de la figura), la prueba de retención se registró a los 2 días, 1, 2, 3 o 6 semanas después. En la Fig. 12.A se observa que después de dos días de una sesión de aprendizaje, se retiene más del 70% de la información. Sin embargo, en las tres semanas siguientes, hay un declive gradual en la memoria, lo que resulta en tasas de retención por debajo del 50%. A las seis semanas de una sesión de copia, el índice de memoria registrado es significativamente diferente a todos los puntos de tiempo anteriores (ANOVA de una vía $F(4, 99) = 20,78$, $P < 0,05$, prueba de comparaciones múltiples de Tukey $P < 0,05$ 6 semanas vs. 3 semanas, $P < 0,01$ 6 semanas vs. 2 semanas, $P < 0,001$ 6 semanas vs. 2 días y 1 semana). Estos resultados indican la capacidad de los estudiantes para expresar la memoria al momento que ejecutan la segunda sesión.

Por lo tanto, el siguiente objetivo consistió en investigar si la curva de olvido al momento de la segunda sesión podría influir en la persistencia de la memoria a través del aprendizaje espaciado. Como se mencionó anteriormente, para este estudio se eligió la evaluación a una semana para registrar la persistencia de la memoria gráfica inducida por el aprendizaje espaciado. La Fig. 12.A muestra que los estudiantes recuerdan aproximadamente el 60% de la figura una semana luego de una única sesión de copia. Se consideró entonces este valor como punto de referencia para compararlo con el índice de memoria registrado una semana después de las dos sesiones en los grupos experimentales de Re-TR, Re-Test, y control, reanalizando los resultados de dichos grupos previamente mostrados en la Fig. 10.

Para comparar si reactivar la memoria a diferentes ITIs mediante una sesión de test o una de re-entrenamiento mejora los índices de memoria registrados una semana después, se realizó un % de Memoria en relación a un aprendizaje único (línea negra Fig. 12.B). Esto se calculó mediante la normalización del índice de Memoria obtenido en la sesión de test realizada una semana después de la segunda sesión (Fig. 10), con respecto al índice de Memoria promedio de los estudiantes sometidos a una sola sesión de aprendizaje y evaluados una semana después (Fig 12.A).

En la Fig. 12.B, el índice de memoria una semana después de un único aprendizaje se indica como Memoria al 100% (línea negra) y se incluye en el gráfico como referencia para comparar con los otros grupos. El grupo de control (línea gris), formado por grupos independientes de estudiantes que copiaron la figura y luego, tras diferentes intervalos de tiempo (indicados en el eje de las abscisas) copiaron una secuencia de números, presenta consistentemente un menor % de Memoria en comparación con el grupo de un único entrenamiento (ANOVA de dos vías, Interacción $F(12, 407) = 6,316$, $P < 0,05$, Efectos simples: prueba de comparaciones múltiples de Tukey $*P < 0,05$, $***P < 0,001$ control vs. entrenamiento). Cuando los estudiantes reciben dos sesiones de copia (grupo de Re-TR, línea violeta) con un intervalo de tiempo de hasta 3 semanas, el % de Memoria es mayor que el del único aprendizaje ($***P < 0,001$ re-entrenamiento vs. entrenamiento). Sin embargo, si el intervalo de tiempo entre las sesiones de copia es de 6 semanas, la retención de memoria no difiere de un solo entrenamiento ($P > 0,05$ Re-TR vs. Entrenamiento), lo que demuestra que hay una ventana óptima de mejora en la retención mediante el re-aprendizaje. El comportamiento del grupo Re-Test (línea naranja) es el más sensible al olvido después de una sesión de copia. Observamos que si la sesión de test ocurre después de la primera semana de aprendizaje, la persistencia de la MLT supera la alcanzada después de una única sesión (Fig. 12.B, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ Re-Test vs. Entrenamiento). Sin embargo, el efecto causado por la reactivación de la traza a través de una sesión de test disminuyó abruptamente desde el intervalo de 2 semanas y alcanzó valores similares a los del grupo control en el intervalo de 6 semanas (Fig. 12.B, 6 semanas: $***P < 0,001$ Re-Test vs. Entrenamiento, $P > 0,05$ Re-test vs. Control). Este efecto se puede asociar a la disminución de la memoria después de un único entrenamiento a lo largo del tiempo (Fig. 12.A).

Estos resultados sugieren que el procedimiento más óptimo para mejorar la persistencia de la MLT es realizar una sesión de re-entrenamiento en un plazo de hasta 3 semanas después de la primera sesión. Esto permite la expresión (Fig. 10 y 12.B) y la persistencia durante meses (Fig. 11) de un índice de Memoria elevado, en contraposición

a la rápida disminución de la memoria observada después de una única sesión de aprendizaje (Fig. 12A).

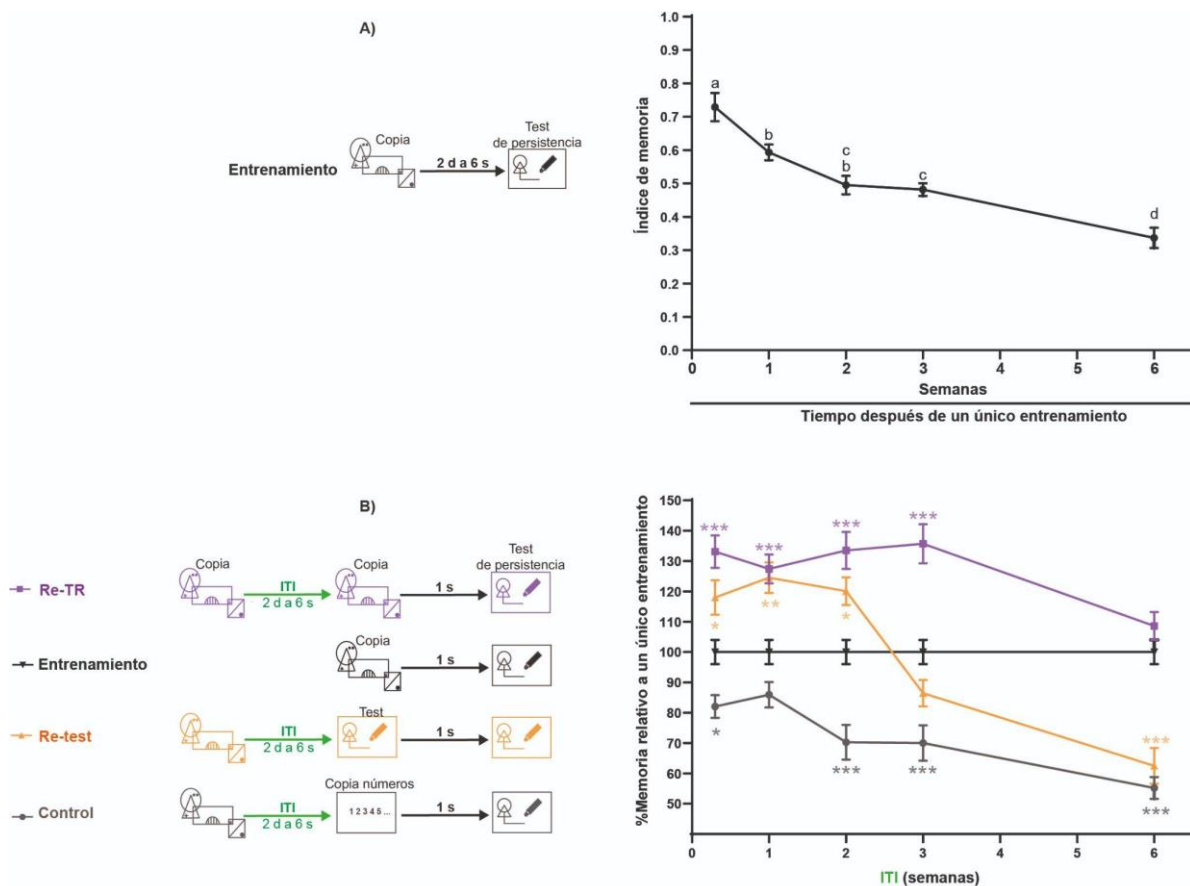


Figura 12: Relación entre el curso temporal de la expresión de la memoria después de una sola sesión de entrenamiento y la persistencia de la memoria después del protocolo de aprendizaje espaciado en comparación con una única sesión de entrenamiento. En el lado izquierdo de la figura se muestra protocolo experimental. A) La MLT gráfica se evaluó en diferentes intervalos de tiempo después de una única sesión de entrenamiento en grupos independientes de estudiantes. El número de estudiantes en los diferentes tiempos varió de 17 a 33. El Índice de Memoria se muestra como media \pm error estándar de la media (SEM). Las medias que se indican con una letra diferente denotan diferencias significativas entre los grupos. $p < 0,05$ Prueba de comparaciones múltiples de Tukey después de un ANOVA de una vía. B) El mismo grupo de estudiantes analizado en las Figuras 10 se utilizó para este análisis. El % de Memoria se calculó normalizando el índice de Memoria obtenido en la sesión de test una semana después de la segunda sesión por cada participante, con la media del índice de Memoria de todos los estudiantes obtenida una semana después de una única sesión de aprendizaje ($n=33$). % de Memoria se

muestra como media \pm error estándar de la media. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs. Entrenamiento Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Análisis de efectos simples principales) después de un ANOVA de dos factores.

DISCUSIÓN II

Una teoría que explica la eficacia del aprendizaje espaciado se centra en la relevancia de la evocación de la información en el momento de la siguiente sesión (Braun y Rubin, 1998; Greene, 1989; Smolen y col., 2016). Basándose en dicho marco conceptual, en este capítulo se realizaron actividades con humanos para explorar cómo las memorias consolidadas pueden persistir con el tiempo a través de la evocación en sesiones posteriores. Sostenemos que la persistencia será mayor cuanto más información de la memoria adquirida en la primera sesión pueda ser expresable durante la segunda sesión. Resultados que avalan esta hipótesis fueron mostrados y discutidos en el capítulo anterior utilizando un modelo murino. Dichos hallazgos alentaron la realización de un estudio traslacional para describir las condiciones que mejoren la retención de la memoria en estudiantes de escuela primaria a través del aprendizaje espaciado.

En este trabajo se eligió la figura de Rey Osterrieth como instrumento de aprendizaje y memoria gráfica visual. Se registró la MLT después de una única sesión de aprendizaje y después de dos sesiones a diferentes intervalos de tiempo. Se observó que tanto las sesiones de re-entrenamiento como el entrenamiento seguido de una sesión de test con un intervalo de hasta 2 semanas inducen la persistencia de la memoria por al menos una semana. Sin embargo, cuando el espacio entre las sesiones se extiende a 3 semanas, solo el protocolo de re-aprendizaje se mantuvo efectivo (Fig. 10). Además, el diseño de Re- TR con ITI de 1 o 3 semanas, pero no el diseño de Re-Test, mantuvo la memoria gráfica durante al menos dos meses (Fig. 11). Estos resultados están en concordancia con investigaciones previas sobre la memoria declarativa en adultos, que demostraron que intervalos más largos entre las sesiones conducen a una memoria más duradera (Kapler y col., 2015). En este sentido, Cepeda y colaboradores (Cepeda y col., 2008) mostraron que el intervalo óptimo entre sesiones aumentaba a medida que aumentaba el intervalo para realizar el test final. En resumen, nuestros resultados sugieren que un ITI de hasta 3 semanas entre las sesiones de aprendizaje es la herramienta más óptima para preservar la memoria de información gráfica aprendida en el pasado reciente o remoto de los estudiantes. Por otro lado, consideramos que debido al bajo índice de olvido de la memoria obtenido en la primera sesión de aprendizaje durante la primera semana tras la adquisición, una sesión de test experimentada en ese intervalo también resultó efectiva en preservar la memoria (Fig. 12B). Cuando los ITI superan las 2 semanas y la memoria original comienza a decaer sustancialmente, solo una sesión de re-

aprendizaje previene o atenúa el mecanismo de olvido. Sin embargo, si el re-aprendizaje se lleva a cabo 6 semanas después de la primera sesión, la persistencia de la traza se equipara a la obtenida después de una única sesión de aprendizaje (Figura 12B). En este sentido, Karpicke y colaboradores sostienen que si el éxito en la evocación es extremadamente bajo, es poco probable que mejore la memoria (Karpicke y col., 2014). En otras palabras, si ha transcurrido demasiado tiempo desde la primera presentación o si la segunda presentación es lo suficientemente diferente de la primera, la segunda sesión es ineficaz y los resultados son equivalentes a la memoria observada tras una sola sesión.

¿Qué mecanismo puede estar operando en el engrama de memoria inducido por el aprendizaje espaciado para promover la persistencia de la memoria a largo plazo? Como se mencionó anteriormente, nuestro grupo postuló la hipótesis del EC, que presenta un modelo celular para el establecimiento y persistencia de la memoria (Moncada y Viola, 2007; Viola y col. 2015; Viola y col. 2024). Este marco conceptual implica el establecimiento de una etiqueta inducida por el aprendizaje y la síntesis de PRPs. Como fue discutido anteriormente, las etiquetas de aprendizaje determinan la selectividad de los sitios sinápticos activados por el aprendizaje, y la síntesis de proteínas podría ser inducida por el propio aprendizaje o por eventos temporalmente asociados. Sin embargo, es fundamental que las etiquetas y las PRPs estén presentes al mismo tiempo y en el mismo sustrato neuronal para consolidar una memoria (Ballarini y col., 2009; Moncada y col., 2015). Considerando estos conceptos, proponemos que la reactivación de sitios neuronales específicos y la disponibilidad de PRPs (probablemente las necesarias para la expresión de la memoria y/o las inducidas tras su evocación) son eventos que la segunda sesión necesita inducir para mantener la memoria gráfica visual a lo largo del tiempo. Como expusimos en el Capítulo 1, el mecanismo celular del EC será más efectivo cuando exista una mayor superposición entre el sustrato neural involucrado durante el aprendizaje con aquel activado en la segunda sesión. La evidencia sugiere que la población neuronal activada durante un re-aprendizaje se superpone significativamente con la del aprendizaje original (Abdou y col., 2018; Guzowski y col., 2006). Esto podría explicar la mayor eficiencia en la persistencia de la memoria cuando se reactiva la traza a través del re-aprendizaje en comparación a cuando se lo hace con una sesión de test.

Algunos recordatorios inducen la reconsolidación de la memoria, lo que se refiere al proceso de desestabilización y posterior reestabilización de una memoria después de su reactivación (Rodríguez-Ortiz y col., 2012). Este proceso permite que la memoria se mantenga e incluso se actualice con nueva información (Rodríguez-Ortiz y Bermudez-Rattoni, 2017). Es posible que la segunda sesión de aprendizaje o incluso la sesión de test

en nuestro estudio hayan desencadenado la reconsolidación de la traza original. En ese caso, podríamos pensar que la reactivación inducida por la sesión de test pudo haber sido parcial y, por lo tanto, solo pudo mantener una parte del engrama. Por otro lado, la segunda sesión de aprendizaje de la figura de Rey Osterrieth podría haber reactivado un mayor porcentaje del engrama originalmente almacenado, lo que llevó a una memoria más sólida y persistente.

Los hallazgos novedosos en la ciencia de la memoria nos inspiraron a buscar intervenciones conductuales que pudieran potenciar el proceso de aprendizaje y memoria en entornos educativos. Nuestros resultados respaldan la incorporación de una segunda clase de aprendizaje, espaciada entre 2 días y 3 semanas después de la primera clase, como una herramienta simple pero efectiva para promover la persistencia de la memoria gráfica. Además, observamos que la tasa de memoria que permanece después de la primera sesión de aprendizaje está directamente relacionada con la eficacia que la segunda sesión imprime sobre los mecanismos de persistencia de la memoria. El uso de dichos ITIs óptimos resulta una herramienta ecológicamente válida que se alinea con contextos educativos realistas, como las aulas, y podría ayudar especialmente a los estudiantes que están aprendiendo temas que requieren un esfuerzo significativo. Estos resultados no solo revelan la mejora de la persistencia de la memoria a través del aprendizaje espaciado en estudiantes de primaria, sino que también resaltan la conservación evolutiva de los procesos de memoria, que resultan similares a los hallados en otros animales de investigación

CAPÍTULO III

EFFECTOS DEL APRENDIZAJE ESPACIADO SOBRE LA MEMORIA GRÁFICA EN POBLACIÓN ADULTA

En el capítulo anterior, se detalló un protocolo llevado a cabo en estudiantes de escuelas primarias, donde se observó que la mejor retención de memoria inducida por el aprendizaje visual gráfico se logró al realizar dos sesiones de aprendizaje espaciadas entre 2 días y 3 semanas. Estos protocolos resultaron en índices de memoria más altos y persistentes en comparación con una sola sesión de aprendizaje o el uso de un test como segunda sesión.

En esta sección, se buscó ampliar el estudio del efecto del aprendizaje espaciado en la persistencia de la memoria en humanos adultos. Se utilizó una tarea de aprendizaje viso-espacial en una población mayor de 18 años, a través de una aplicación original para dispositivos electrónicos que permite realizar la tarea de forma virtual. El objetivo principal fue evaluar el efecto de una sesión de test o re-aprendizaje en la persistencia de la memoria. Aquí se presentan las primeras series de resultados sobre el uso de la aplicación y el diseño del protocolo. Futuros experimentos serán realizados para culminar más acabadamente con los objetivos propuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS III

Sujetos experimentales:

En los experimentos detallados en esta sección participaron 462 personas mayores de 18 años (419 mujeres, 43 hombres) de diferentes provincias del país. Las actividades fueron completadas a través de una aplicación original desarrollada por nuestro equipo, cuya interfaz se muestra en el apéndice. Para participar en el experimento, el sujeto debió completar su dirección de correo electrónico, aceptar el Consentimiento Informado y un cuestionario de datos personales. Se excluyeron del estudio aquellos participantes que declararon consumir psicofármacos y/o presentaran un diagnóstico de salud mental.

Los participantes fueron reclutados a través de redes sociales y aceptaron un consentimiento informado (detallado en el apéndice) antes de comenzar. Los experimentos detallados en este capítulo fueron aprobados por el Comité de Ética Humana de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Buenos Aires.

La información y desempeño personal de cada participante en cada una de las tareas realizadas resultó confidencial y no fue utilizada por el grupo de investigación para realizar ningún tipo de evaluación académica o clínica de las personas.

Test de Aprendizaje Visoespacial (VLST, Visual Spatial Learning Test):

Se utilizó la tarea del VLST como aprendizaje visual y espacial, que consiste en observar 15 símbolos (sin sentido o abstractos) para aprender y recordar la posición de 7 de dichos símbolos ubicados en un tablero. El VSLT permite obtener el registro del índice de memoria, de modo estandarizado y con evidencia de validez y normas disponibles (Malec y col., 1992; Steinberg I., 2005). Requiere una destreza motora fina mínima y utiliza estímulos visuales abstractos que son difíciles de verbalizar. Esta tarea incluye ensayos que evalúan la memoria (inmediata y diferida) tanto para los diseños abstractos, las posiciones de ubicación espacial en el tablero, y los diseños en sus posiciones. Esto permite un análisis de procesos de componentes de la memoria visoespacial.

La tarea requiere el reconocimiento de 7 símbolos abstractos y el recuerdo de la posición de un símbolo en un tablero de matriz 4 × 6 (Fig. M.9). Una sesión de entrenamiento está compuesta por cinco ensayos de aprendizaje (1-5). En cada ensayo (Fig. M.10), en primera instancia el sujeto deberá observar 15 símbolos sin sentido ordenados al azar en 3 filas de 5 elementos durante 10 segundos. Posteriormente aparecerán 7 de estos símbolos, en una disposición al azar, dentro del mencionado tablero. El Sujeto tendrá 10 segundos para observar y recordar los símbolos y su ubicación en el tablero. Luego aparecerán los 15 símbolos ordenados al azar nuevamente en 3 filas de 5 elementos abajo del tablero vacío. El Sujeto deberá ubicar los 7 símbolos en las posiciones correctas, en un tiempo máximo de 2 minutos. El entrenamiento se discontinúa si el sujeto realiza correctamente la tarea en dos ensayos consecutivos.

Durante la sesión de evaluación de la memoria (Test), el Sujeto deberá volver ubicar los 7 símbolos en las posiciones correctas (observadas en el entrenamiento), en un tiempo máximo de 2 minutos.

En cada sesión se registrará: 1) número de símbolos o diseños correctos (SC), 2) número de posiciones correctas (PC), 3) número de símbolos correctos en posiciones correctas (SCPC) .

A partir de estos datos se consideran 3 puntuaciones: a) reconocimiento de símbolos correctos (SC), el sujeto obtiene un punto cuando reconoce un símbolo correctamente y lo coloca en el tablero, sin importar que la posición que ocupa sea acertada o no (puntuación máxima por ensayo= 7); b) recuerdo de posición correcta (PC), el sujeto obtiene un punto cuando recuerda la posición de un símbolo, independientemente de que el símbolo seleccionado sea el correcto o no (puntuación

máxima por ensayo= 7); c) reconocimiento de símbolos correctos en sus posiciones correctas (SCPC)(puntuación máxima por ensayo= 7).

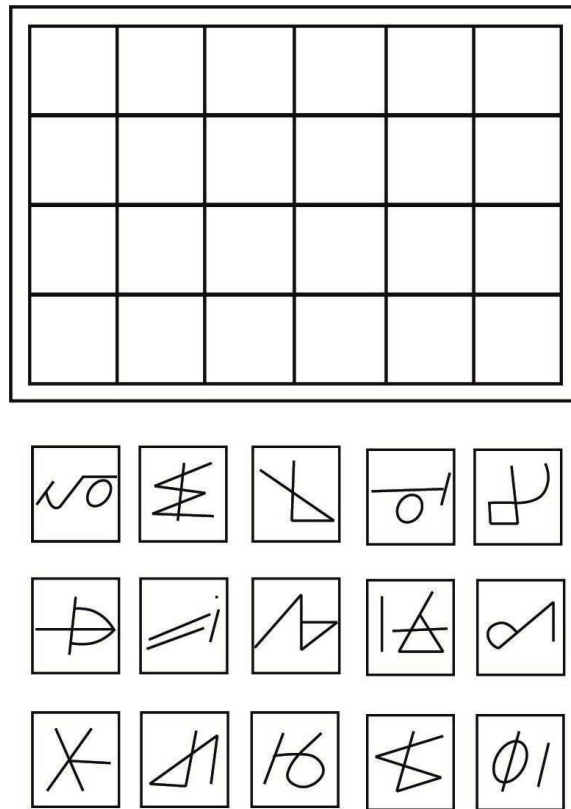


Figura M.9: Visual Spatial Learning Test (VSLT) by James Malec y col 1992.

Se muestra el tablero en la parte superior y los 15 símbolos abstractos o sin sentido, en la parte inferior.

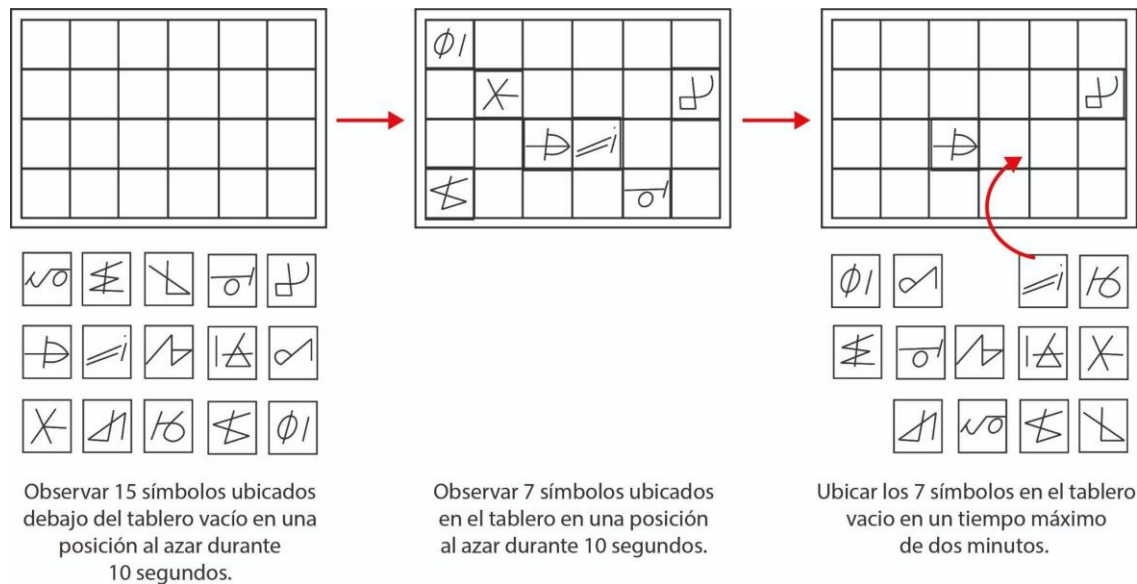


Figura M.10: Esquema de un ensayo del entrenamiento. Cada sesión de entrenamiento está compuesta por cinco ensayos de aprendizaje, donde el participante debe reconocer 7 símbolos abstractos y recordar su posición en un tablero de matriz de 6×4 .

Diseño experimental:

Los experimentos fueron completados a través de una aplicación original desarrollada por nuestro equipo, cuya interfaz se muestra en el apéndice. Esta aplicación está disponible para computadoras y dispositivos móviles.

Para estudiar los efectos del re-entrenamiento sobre la persistencia de la memoria, se utilizaron 3 grupos experimentales (grupo Control, grupo Re-TR y Grupo Re-Test, Fig. M.11). Estos grupos debieron completar una serie de sesiones: Entrenamiento (5 ensayos), Re-entrenamiento (1 o 2 ensayos) o Test y el Test de persistencia. Inicialmente todos los grupos recibieron una sesión de Entrenamiento: a cada sujeto se le presentó un tablero diferente al azar con 7 símbolos a recordar. Luego se diferenciaron los grupos experimentales (grupo Control, grupo Re-Test y Grupo Re-TR) y se dirigió a cada uno de los participantes a uno sólo de los grupos esquematizados debajo. Es decir que cada sujeto formó parte de solo un grupo realizado con un ITI determinado.

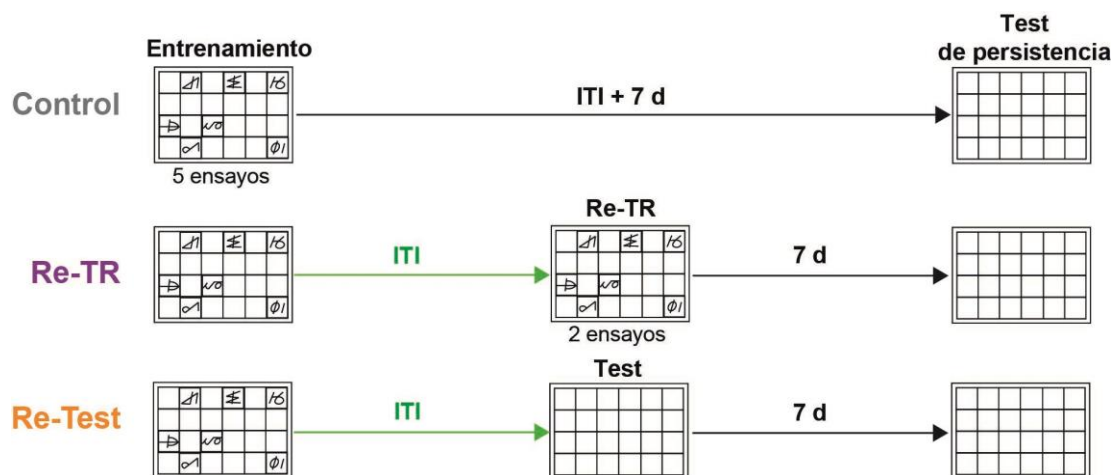


Figura M.11: Diseño experimental para evaluar el efecto del aprendizaje espaciado en una memoria viso-espacial. El grupo Control llevó a cabo una sola sesión de entrenamiento, mientras que el grupo de Re-TR tuvo una segunda sesión de entrenamiento adicional que constaba de 2 ensayos. Por otro lado, el tercer grupo (Re-Test) tuvo como segunda sesión un Test. La memoria fue evaluada en todos los grupos mediante el Test de persistencia. Se realizaron experimentos utilizando distintos intervalos entre sesiones (ITIs).

El grupo control llevó a cabo una única sesión de entrenamiento compuesta de 5 ensayos durante el día de aprendizaje. Por otro lado, el grupo Re-TR participó de una segunda sesión de entrenamiento compuesta de uno o dos ensayos (re-entrenamiento débil) separada por un ITI específico respecto al día de aprendizaje. En esta sesión, los participantes volvieron a memorizar el tablero con los 7 símbolos ubicados en sus respectivas posiciones. Por su parte, el grupo Re-Test participó de una segunda sesión que consistió en un test. Durante la sesión de test, los sujetos debieron colocar en un tablero en blanco los símbolos que recordaran. Tanto el grupo Re-TR como el grupo Re-Test fueron sometidos a un test de persistencia 7 días después de la segunda sesión (Fig. M.11). Por último, en el grupo control se evaluó la memoria en un tiempo equivalente al ITI +7 días.

Para cada participante, se calculó un Índice de Memoria de cada parámetro (SC, PC y SCPC), como la proporción entre el puntaje obtenido en el día del test y el puntaje del último ensayo en el día de entrenamiento (primera sesión).

Análisis estadístico:

Los resultados se presentaron como media \pm error estándar (EE). Las diferencias en el índice de memoria entre grupos se analizaron con una prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn's cuando se compararon tres o más grupos. Los análisis se realizaron en GraphPad Prism versión 8.00 (GraphPad Software, La Jolla, California, EE. UU.). Los efectos se consideraron significativos cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS III

El reconocimiento de símbolos correctos en las posiciones correctas durante la sesión de test, después de una sola sesión de entrenamiento, decrece con el tiempo.

Inicialmente se investigó el curso temporal de la MLT después de una sola sesión de entrenamiento en la tarea VLST (5 ensayos), registrando la memoria en grupos independientes de participantes 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días después (Fig. 13). Para analizar la retención de la memoria gráfica, se consideraron los índices de memoria de los parámetros SC, PC y SCPC. Se observó un declive temporal en la memoria de reconocimiento de SCPC, con diferencias significativas en el índice de memoria entre los días 1 o 3 y los 14 días en adelante (Fig. 13.C, Test de Kruskal-Wallis $P < 0,001$, prueba de comparaciones múltiples de Dunn's 1 día vs 14 días $P < 0,001$, 3 días vs 14 días $P < 0,05$). Sin embargo, esta diferencia fue menos notable en el resto de los parámetros (Fig. 13.A SC, Test de Kruskal-Wallis $P < 0,001$, prueba de comparaciones múltiples de Dunn's 1 día vs 14 días $P < 0,01$, 3 días vs 14 días $P > 0,05$. Fig. 13.B PC, Test de Kruskal-Wallis $P < 0,001$, prueba de comparaciones múltiples de Dunn's 1 día vs 14 días $P < 0,01$, 3 días vs 14 días $P > 0,05$).

Basándose en estos resultados, se desarrolló un protocolo de aprendizaje espaciado con el objetivo de potenciar la persistencia del índice SCPC, dado que es el indicador de la memoria de VLST más susceptible al deterioro con el tiempo.

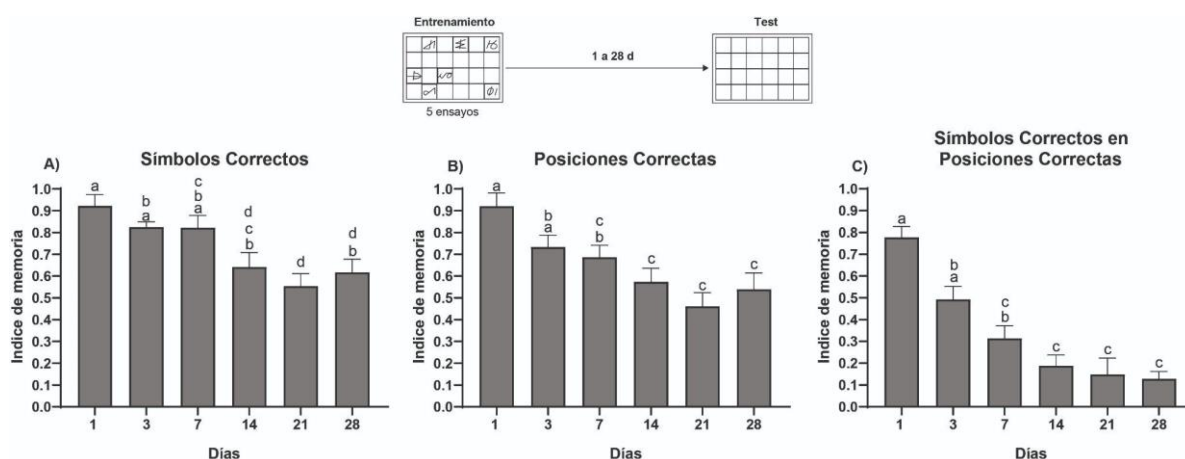


Figura 13: Curso temporal de expresión de la memoria gráfica después de una única sesión de entrenamiento. El esquema superior muestra el diseño experimental. La MLT gráfica se evaluó en diferentes intervalos de tiempo después de una única sesión de

entrenamiento en grupos independientes de personas (1 día $n=23$, 3 días $n=26$, 7 días $n=25$, 14 días $n=24$, 21 días $n=27$, 28 días $n=22$). El Índice de Memoria se presenta como media \pm SEM. Se muestran los siguientes resultados: A) el número de símbolos correctos (SC), B) el número de posiciones correctas (PC) y el C) el número de símbolos correctos en posiciones correctas (SCPC). Las medias que se indican con una letra diferente denotan diferencias significativas entre los grupos. $p < 0,05$ Prueba de comparaciones múltiples de Dunn's después de un test de Kruskal-Wallis.

Una sesión de re-entrenamiento separada un día del entrenamiento mejora la persistencia de la memoria visoespacial

Para investigar el impacto del re-entrenamiento sobre la persistencia de la memoria, se utilizaron 3 grupos experimentales (Fig. 14). Todos los grupos recibieron una sesión de entrenamiento de VLST que constaba de 5 ensayos. Luego, se dividieron a los participantes en tres grupos: un grupo Control, un grupo que realizó una segunda sesión de entrenamiento con un ensayo (Re-TR 1 ensayo) y otro grupo con dos ensayos (Re-TR 2 ensayos). Nuestro objetivo fue comparar la efectividad del re-entrenamiento en función del número de ensayos realizados. Las sesiones estuvieron separadas por un ITI de 1 día, lo que permitió realizar el segundo entrenamiento en un momento en el que se esperaba que los participantes tuvieran una alta memoria de la primera sesión de aprendizaje, como se muestra en la Figura 13 (Índice de memoria SPSC de 1 día = $0,77 \pm 0,05$). Al igual que en los capítulos anteriores, la persistencia de la memoria se evaluó una semana después de la segunda sesión, tiempo en el que se espera que la MLT se encuentre consolidada y almacenada de forma duradera.

Se observó una mejora en la persistencia de la memoria en los tres parámetros analizados en ambos grupos que recibieron re-entrenamiento. Sin embargo, el efecto fue más pronunciado en el grupo que completó dos ensayos en su segunda sesión en comparación con el grupo control, particularmente en el índice de SCPC (Fig. 14.D SCPC, Test de Kruskal-Wallis $P < 0,001$, prueba de comparaciones múltiples de Dunn's Control vs Re-TR (1Esy) $P < 0,05$, Control vs Re-TR (2Esy) $P < 0,001$). En un grupo independiente de participantes, se evaluó la memoria un día después del primer entrenamiento. Esto lo hicimos para confirmar que la memoria se expresara en forma robusta al momento de presentar la segunda sesión. Encontramos valores similares a los registrados en la curva de la Fig. 13, donde se utilizaba también una única sesión de entrenamiento (Fig. 14.A SC 1 día: $0,94 \pm 0,02$ vs SC 1 día/curva: $0,92 \pm 0,05$; PC 1 día:

0,92 ± 0,02 vs PC 1 día/curva: 0,92 ± 0,06; SCPC 1 día: 0,70 ± 0,05 vs SCPC 1 día/curva: 0,77 ± 0,05; test de Mann Whitney $P > 0,05$).

Basándonos en estos resultados, se decidió emplear una sesión de re-entrenamiento compuesta por dos ensayos en los siguientes experimentos para explorar el efecto del aprendizaje espaciado.

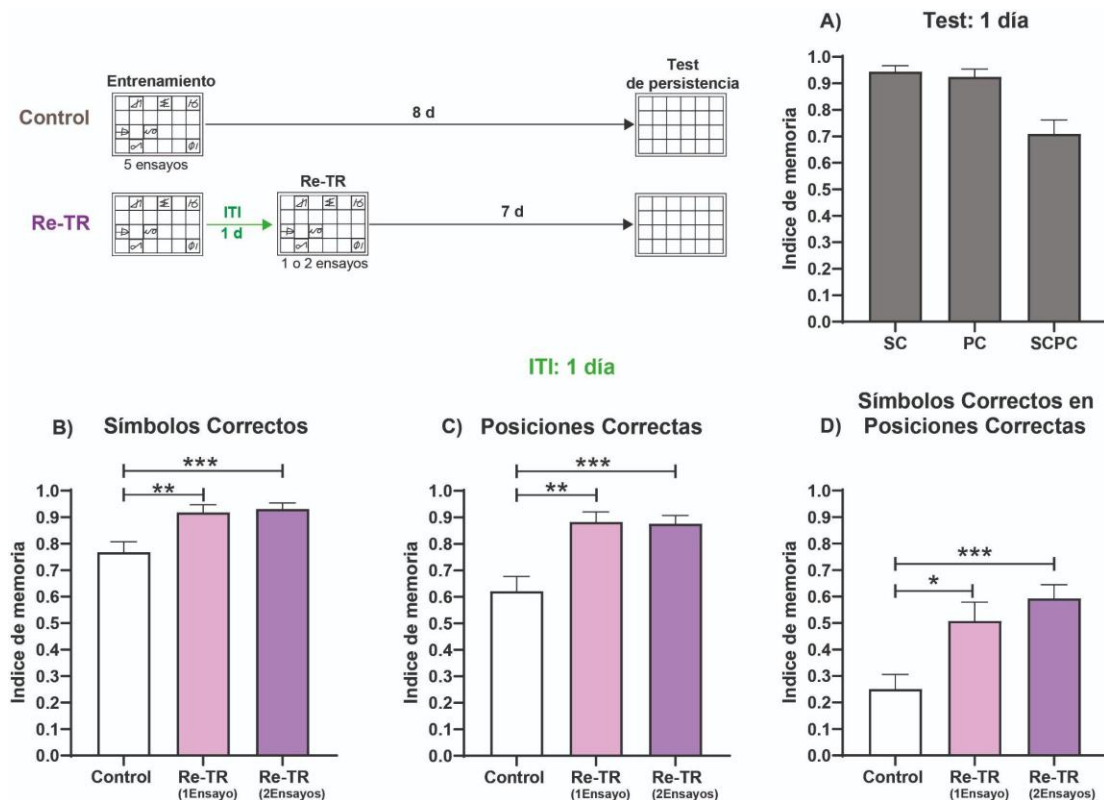


Figura 14: Un día después del entrenamiento inicial, una sesión de re-entrenamiento mejora el reconocimiento de símbolos correctos, posiciones correctas y su combinación. En la parte superior izquierda de la figura se muestra el protocolo experimental. Los participantes llevaron a cabo una sesión de entrenamiento que consistió en 5 ensayos. Posteriormente, se dividieron en grupos que recibieron diferentes tipos de sesiones adicionales: un grupo que no tuvo sesión adicional (Control, $n=24$), un grupo que tuvo una segunda sesión de entrenamiento con 1 ensayo (Re-TR 1 ensayo, $n=19$) y otro grupo con una segunda sesión de entrenamiento de 2 ensayos (Re-TR 2 ensayo, $n=29$). Estas sesiones se separaron del entrenamiento inicial por un intervalo de 1 día. La persistencia de la MLT se evaluó una semana después de la segunda sesión, tomando en cuenta tres aspectos: B) el número de símbolos correctos (SC), C) el número de posiciones correctas (PC), y D) el número de símbolos correctos en posiciones correctas (SCPC). (A) Además, se presentan estos parámetros en el test realizado un día después del primer entrenamiento en un grupo independiente de participantes ($n=26$). El Índice de

*Memoria se presenta como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ Prueba de comparaciones múltiples de Dunn's después de un test de Kruskal-Wallis.*

Una sesión de re-entrenamiento o una sesión de test separadas tres días del entrenamiento mejoran la persistencia de la memoria visoespacial

Luego se investigó la efectividad del uso de una sesión de test en comparación con un re-entrenamiento para preservar la traza de memoria original. Se utilizó un esquema similar al anterior, en el que el grupo de Control completó una sola sesión de entrenamiento, el grupo de Re-TR tuvo una sesión adicional de 2 ensayos, y el grupo de Re-test tuvo una sesión adicional de test (Fig. 15). Al igual que en el experimento anterior, la segunda sesión fue realizada cuando aún los sujetos expresan un índice alto de memoria, en este caso con un ITI de 3 días (Estas comparaciones muestran que los índices de memoria registrados al día 1 son similares y tan altos a los del día 3: Fig 13. SC 1 día: $0,94 \pm 0,02$ vs SC 3 días: $0,82 \pm 0,02$; PC 1 día: $0,92 \pm 0,02$ vs PC 3 días: $0,73 \pm 0,05$; SCPC 1 día: $0,77 \pm 0,05$ vs SCPC 3 días: $0,49 \pm 0,06$; Test de Kruskal-Wallis $P < 0,001$, prueba de comparaciones múltiples de Dunn's $P > 0,05$). A partir de los resultados de la primera sesión de test del grupo Re-Test se verificó que a los 3 días del entrenamiento, los sujetos expresaron una memoria similar a la registrada en el grupo independiente de personas graficado en la curva de la Fig.13 (3 días vs 3 días/curva: los tres parámetros arrojaron $P > 0,05$; test de Mann Whitney). La persistencia de la memoria se midió una semana después de la segunda sesión.

Se encontraron diferencias significativas en el índice de memoria de SC y PC entre el grupo Control y el grupo Re-TR (Fig.15 B SC, Test de Kruskal-Wallis $P < 0,001$, prueba de comparaciones múltiples de Dunn's Control vs Re-TR $P < 0,001$; Fig.15 C, PC Test de Kruskal-Wallis $P < 0,001$, prueba de comparaciones múltiples de Dunn's Control vs Re-TR $P < 0,001$). En el caso del índice de memoria SCPC, tanto el grupo Re-TR como Re-Test mejoraron significativamente la persistencia con respecto al grupo Control (Fig.15 D SCPC, Test de Kruskal-Wallis $P < 0,001$, prueba de comparaciones múltiples de Dunn's Control vs Re-TR, Control vs Re-Test $P < 0,001$).

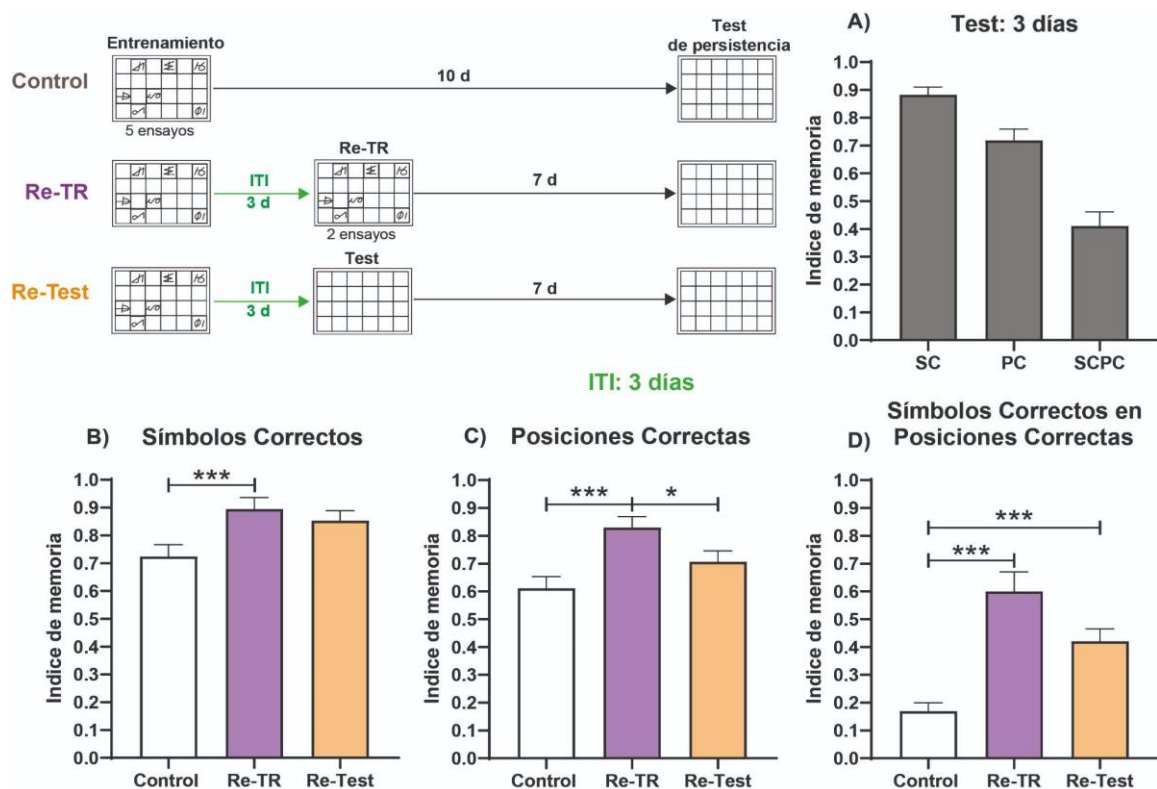


Figura 15: Una sesión de re-entrenamiento de dos ensayos o una sesión de test separadas tres días del entrenamiento mejoran el reconocimiento del número de símbolos correctos en posiciones correctas. En la parte superior izquierda de la figura se muestra el protocolo experimental. Los participantes completaron una sesión de entrenamiento con 5 ensayos y luego se dividieron en tres grupos. Un grupo no tuvo sesiones adicionales (Control, $n=46$), otro tuvo una segunda sesión de entrenamiento con 2 ensayos (Re-TR, $n=47$), y un tercer grupo tuvo una sesión de test (Re-test, $n=35$). Estas sesiones se realizaron tres días después del entrenamiento inicial. La persistencia de la MLT se evaluó una semana después de la segunda sesión, considerando: B) el número de símbolos correctos (SC), C) posiciones correctas (PC), y D) símbolos correctos en posiciones correctas (SCPC). (A) Además, se presentan estos parámetros en el test realizado tres días después del primer entrenamiento ($n=35$). El Índice de Memoria se presenta como media \pm SEM. $*p<0,05$ y $***p<0,001$ Prueba de comparaciones múltiples de Dunn's después de un test de Kruskal-Wallis.

Si el intervalo entre sesiones es de 14 días, el re-entrenamiento demostró ser la única estrategia efectiva para promover la persistencia de la memoria.

Por último, analizamos la eficacia de una sesión de re-entrenamiento o de test en un momento en que los participantes mostraban una baja retención de la memoria del entrenamiento original. Para ello, seleccionamos un ITI de 14 días, en el cual los

índices de memoria para todos los parámetros fueron significativamente más bajos que los observados en los intervalos utilizados anteriormente (Fig 13. Test de Kruskal-Wallis $P < 0,001$, prueba de comparaciones múltiples de Dunn's. SC 1 día: $0,94 \pm 0,02$ vs SC 14 días: $0,64 \pm 0,06$, $P < 0,01$; PC 1 día: $0,92 \pm 0,02$ vs PC 14 días: $0,57 \pm 0,06$ $P < 0,01$; SCPC 1 día: $0,77 \pm 0,05$ vs SCPC 14 días: $0,19 \pm 0,05$ $P < 0,001$).

En la figura 16, se observa que únicamente el grupo Re-TR exhibe una mejora en la persistencia de los índices de los tres parámetros en comparación con el grupo Control (Fig.16 B SC, Test de Kruskal-Wallis $P < 0,001$, prueba de comparaciones múltiples de Dunn's Control vs Re-TR $P < 0,01$; Fig.16 C, PC Test de Kruskal-Wallis $P < 0,01$, prueba de comparaciones múltiples de Dunn's Control vs Re-TR $P < 0,001$; Fig.16 C, SCPC Test de Kruskal-Wallis $P < 0,001$, prueba de comparaciones múltiples de Dunn's Control vs Re-TR $P < 0,001$). Basándonos en los resultados de la primera sesión de test del grupo Re-Test, se confirmó que los sujetos mostraron una memoria similar a la registrada en la curva de la Figura 13 al momento de la segunda sesión (Fig. 16.A SC 14 día: $0,71 \pm 0,03$ vs SC 14 día/curva: $0,64 \pm 0,06$; PC 14 día: $0,62 \pm 0,04$ vs PC 14 día/curva: $0,57 \pm 0,06$; SCPC 14 día: $0,22 \pm 0,03$ vs SCPC 14 día/curva: $0,22 \pm 0,05$; test de Mann Whitney $P > 0,05$).

Estos resultados sugieren que, al igual que lo observado en estudiantes en el capítulo anterior, una sesión de test es efectiva para promover la persistencia de la memoria cuando la retención de la traza original se mantiene elevada. En cambio, el uso de una sesión de re-entrenamiento garantiza una retención más sólida del aprendizaje, incluso con un intervalo de tiempo entre sesiones de hasta 14 días, momento donde la memoria original decae significativamente. Se requieren más experimentos para delinear los límites temporales de este efecto en esta tarea.

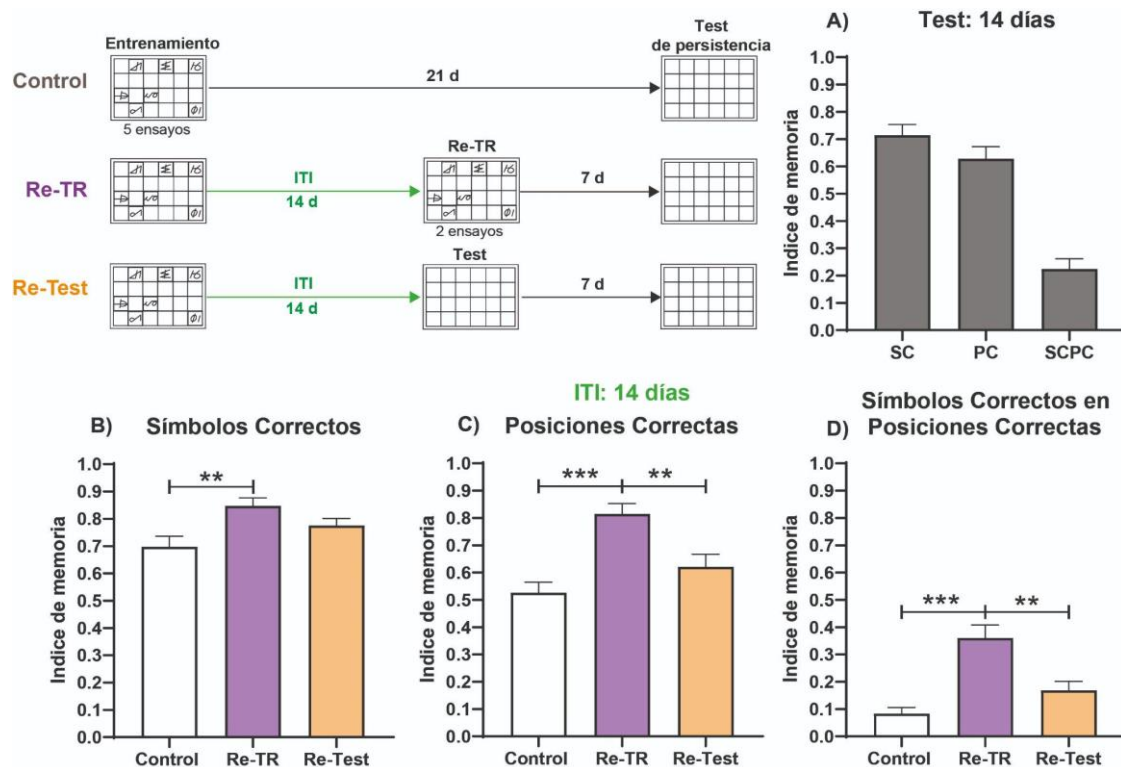


Figura 16: Una sesión de re-entrenamiento de dos ensayos, pero no una sesión de test, separada 14 días del entrenamiento inicial mejora la persistencia de la memoria. En la parte superior izquierda de la figura se muestra el protocolo experimental. Los participantes completaron una sesión de entrenamiento con 5 ensayos y luego se dividieron en tres grupos. Un grupo no tuvo sesiones adicionales (Control, $n=45$), otro tuvo una segunda sesión de entrenamiento con 2 ensayos (Re-TR, $n=45$), y un tercer grupo tuvo una sesión de test (Re-test, $n=44$). Estas sesiones se realizaron catorce días después del entrenamiento inicial. La persistencia de la MLT se evaluó una semana después de la segunda sesión, considerando: B) el número de símbolos correctos (SC), C) posiciones correctas (PC), y D) símbolos correctos en posiciones correctas (SCPC). (A) Además, se presentan estos parámetros en el test realizado 14 días después del primer entrenamiento ($n=45$). El N° de símbolos correctos se muestra como media \pm error estándar de la media (SEM). $**p<0,01$ y $***p<0,001$ Prueba de comparaciones múltiples de Dunn's después de un test de Kruskal-Wallis.

DISCUSIÓN III

En el primer capítulo de este trabajo de tesis, se demostró la efectividad del uso de entrenamientos espaciados para promover la persistencia de memorias espaciales en roedores. Este estudio fue trasladado al ámbito escolar con estudiantes de escuela primaria utilizando actividades gráficas en el segundo capítulo. En ambos modelos, se observó que mientras una traza de memoria sea expresable, una sesión de re-entrenamiento en la misma tarea promocionará su persistencia. El objetivo de este capítulo fue extender el análisis de este efecto a la población adulta, estudiando el efecto de una sesión de test o re-aprendizaje en la persistencia de una memoria visoespacial.

En la parte final de este trabajo de Tesis se utilizó una tarea de aprendizaje visoespacial (VLST) a través de una aplicación para computadoras y dispositivos móviles. Para evaluar la memoria del tablero se consideraron 3 puntuaciones: el reconocimiento de símbolos correctos, recuerdo de posición correcta y el reconocimiento de símbolos correctos en sus posiciones correctas. Inicialmente, se registró el curso temporal de la MLT tras una única sesión de entrenamiento de 5 ensayos, en un intervalo de entre 1 y 28 días posteriores (Fig. 13). El parámetro de SCPC resultó ser más sensible al deterioro con el paso del tiempo, mostrando diferencias significativas en el índice de memoria entre el primer o tercer día de testeo respecto del día 14 en adelante, donde se evidencia un marcado olvido. Esta diferencia fue menos notable en el resto de los parámetros, por lo que se prestó especial atención al SCPC para evaluar el efecto del protocolo de re-aprendizaje. Para explorar el efecto del re-entrenamiento, se utilizó una segunda sesión de un ensayo, realizada un día después del entrenamiento inicial (Fig. 14). Se encontró que esta sesión mejoró el reconocimiento de símbolos correctos, las posiciones correctas y su combinación, respecto a un único entrenamiento. Esta mejora en la memoria se evidenció más cabalmente cuando se utilizó un segundo entrenamiento de dos ensayos. A partir de este resultado, se eligieron dos ITI para comparar el efecto del re-entrenamiento y el re-test. Utilizando un ITI de 3 días, cuando aún los sujetos muestran un índice alto de memoria del entrenamiento inicial, se observó que tanto una sesión de re-entrenamiento de dos ensayos como una sesión de test mejoran el reconocimiento del número de símbolos correctos en posiciones correctas (Fig. 15). Sin embargo, con un ITI de 14 días, cuando los participantes muestran una baja retención de la memoria, solo la sesión de reentrenamiento de dos ensayos mejora la persistencia del SCPC (Fig. 16). Esta diferencia podría

atribuirse al distinto número de ensayos entre el grupo de re-tr y el grupo de re-test. Sin embargo, el segundo entrenamiento de dos ensayos sigue siendo débil y breve. Incluso, pensamos que si utilizáramos dos ensayos de test como segunda sesión, ello podría representar una mayor confusión para los participantes en caso de que la respuesta sea incorrecta. De todos modos, serían necesarios más experimentos para analizar esta posibilidad en detalle. Estos resultados concuerdan con lo observado en estudiantes de primaria en el capítulo anterior, donde la tasa de memoria que se mantiene después de la primera sesión de aprendizaje está relacionada con la eficacia que tenga la segunda sesión de aprendizaje para mejorar la persistencia de la memoria. Los experimentos realizados representaron una primera aproximación al uso de esta aplicación y al estudio del impacto de re-aprendizaje. Sin embargo, se requieren más experimentos para delinear los límites temporales de este efecto en la tarea de VLST.

La memoria visoespacial ha experimentado avances significativos en la investigación clínica y científica. La prueba de memoria visual se ha identificado como uno de los predictores más precisos del resultado funcional de la demencia de la enfermedad de Alzheimer, demostrando tener un gran valor diagnóstico (Cai y col., 2023). El VSLT ha sido validado en adultos mayores sanos y utilizado en el estudio de diferentes déficits cognitivos como la enfermedad de Huntington y Alzheimer (Contador-Castillo y col., 2009; Malec y col., 1992; Pirogovsky y col., 2015). La adaptación virtual del VSLT, desarrollada para esta tesis, implica llevar esta prueba a un formato digital, lo que ofrece varias ventajas:

- La administración y puntuación se vuelven más eficientes, ya que el software puede registrar automáticamente las respuestas y calcular los puntajes.
- Se pueden ajustar los parámetros del test según el efecto a analizar, como la dificultad o el tiempo de exposición de los símbolos.
- Los datos recopilados pueden ayudar a monitorear el rendimiento a lo largo del tiempo y detectar posibles cambios cognitivos.
- Se puede aplicar a varias personas al mismo tiempo, sin restricciones geográficas o de movilidad.

Esta herramienta brinda la posibilidad de estudiar diferentes procesos de la memoria en personas sanas o con deterioro cognitivo.

CONCLUSIONES GENERALES

La memoria construye nuestras vidas, sin ella no somos nada (Luis Buñuel). La persistencia es una característica crucial de la memoria y en este trabajo de tesis doctoral hemos focalizado sobre el estudio de los procesos y mecanismos que permiten promover su duración.

Considerando el beneficio de los entrenamientos espaciados en la formación y persistencia de las memorias, y en el contexto de la hipótesis del EC como mecanismo subyacente, realizamos experimentos para caracterizar los intervalos óptimos entre sesiones y estudiar los mecanismos celulares que promueven la persistencia de memorias espaciales en modelos de roedores y humanos.

Los resultados principales y las conclusiones generales son las siguientes:

1. Los resultados en roedores del Capítulo 1, evidenciaron que una primera sesión de entrenamiento fuerte de REO, que indujo la formación de la MLT no persistente, logró promover su duración en presencia de una segunda sesión de entrenamiento débil (que solo induce MCT) experimentada 1 día después del primer entrenamiento (Fig. 17). No se observó una promoción de la persistencia cuando la segunda sesión fue dada con un ITI de 7 días, ni tampoco si se utiliza una sesión de test en lugar del re-entrenamiento como segunda sesión. El efecto promotor del re-entrenamiento requiere de la evocación de la memoria de la primera sesión y de la integridad de los mecanismos celulares de expresión de la memoria. Sin embargo, no requiere de los mecanismos de refuerzo o reconsolidación de la memoria original. El efecto promotor del re-entrenamiento involucra la actividad de ERKs1/2, para establecer la etiqueta de aprendizaje, y la disponibilidad de receptores AMPA que contienen GluA2 en el hipocampo dorsal como proteína de plasticidad. En base a estos resultados, proponemos que la promoción de la persistencia se basa en el mecanismo del EC que opera cuando se recupera la traza mnésica y están disponibles los mecanismos celulares de su expresión. Postulamos que durante el re-entrenamiento, los sustratos neurales inicialmente activados por el aprendizaje original serían principalmente re-etiquetados. En estos sitios, se utilizarían las PRP necesarias tanto para la expresión de la memoria como las inducidas por la evocación, lo que permitiría mantener una traza mnésica persistente. En ocasión de un test como segunda sesión, los sustratos neurales activados serían menos parecidos

a la de la primera sesión y este mecanismo sería menos eficiente. En conclusión, tanto las PRP como el establecimiento de marcas de aprendizaje son procesos clave desencadenados por el re-entrenamiento, que permiten la persistencia de la memoria de REO.

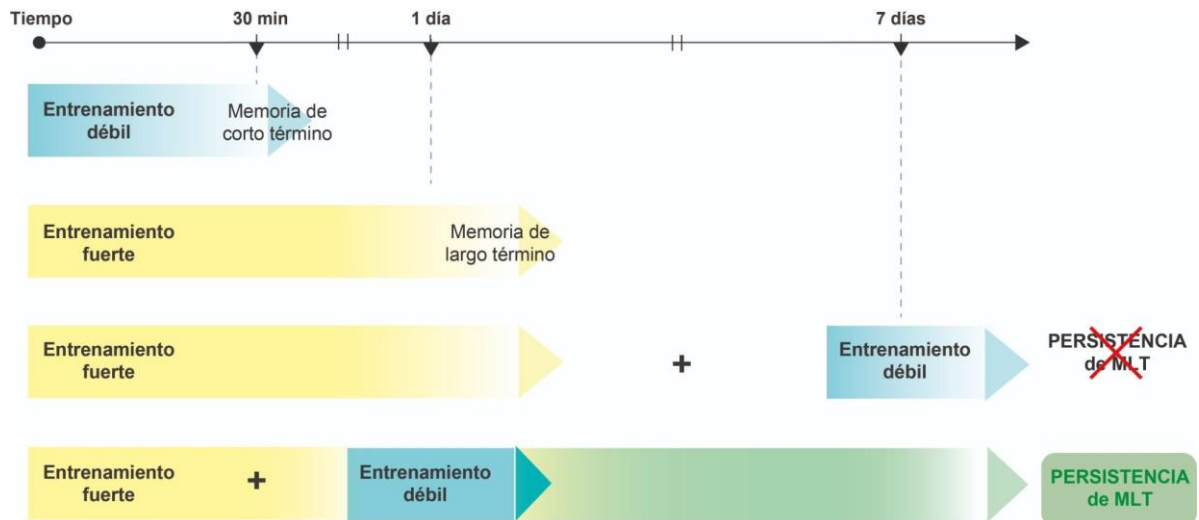
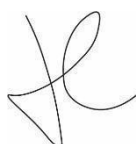


Figura 17. Resumen de los resultados obtenidos en el capítulo 1.

2. En el Capítulo 2 se demuestra que un aprendizaje gráfico visual en estudiantes de primaria realizado en el aula, seguido por un segundo entrenamiento de las mismas características dado durante las siguientes tres semanas, mejora significativamente la persistencia de la memoria. Incluso estos protocolos logran que la memoria dure por meses. Sin embargo, el efecto sobre la persistencia de esta memoria cuando se induce por una segunda sesión de test, solo es efectivo utilizando ITI de hasta una semana; y luego el efecto disminuye significativamente en comparación con lo logrado por una sola sesión. En resumen, nuestros resultados sugieren que un ITI de hasta 3 semanas entre las sesiones de aprendizaje es la herramienta más óptima para preservar la memoria de información gráfica aprendida en el pasado reciente o remoto de los estudiantes. Concluimos que debido al bajo índice de olvido de la memoria original durante la primera semana tras su adquisición, una sesión de test experimentada en ese intervalo también resulta efectiva en preservar la memoria. Sin embargo, cuando los ITI son prolongados y la memoria original comienza a decaer sustancialmente, únicamente una sesión de re-aprendizaje previene o atenúa el mecanismo de olvido y mantiene la traza mnésica.
3. En el Capítulo 3, se comprobó que un aprendizaje espacial a través de una plataforma virtual, experimentado por adultos mayores de 18 años, puede

promocionar la persistencia de su memoria cuando es acompañado de una breve sesión de entrenamiento dada hasta 2 semanas después de la primera. Sin embargo, si la segunda sesión consiste en un test, el efecto es menor al de re-entrenamiento y su efectividad decae al incrementar el ITI utilizado. En sintonía con lo observado en el Capítulo 2, el aprendizaje original sufre una fuerte caída en su MLT, la cual solo pudo ser recuperada mediante un entrenamiento adicional y no con un testeo.

Los resultados obtenidos fueron interpretados bajo el marco conceptual de la hipótesis del EC, sugiriendo que la persistencia de una memoria consolidada se potencia con la adición de información congruente a la original. Esto ocurriría porque se re-etiquetarían mayormente los sitios neuronales previamente activados y se podrían utilizar de manera más eficiente los recursos proteicos necesarios para estabilizar la traza mnésica. En nuestro protocolo de entrenamiento espaciado, esos recursos provendrían del mecanismo de la evocación y expresión de la memoria original. Sin embargo, el sistema muestra una menor eficiencia cuando el recordatorio se presenta en forma de test, lo que podría deberse a una menor superposición de los engramas activados durante el entrenamiento y el test. Este hecho reflejaría un bajo rendimiento del mecanismo de captura de PRPs que opera en dicha porción compartida del engrama, donde deben repartirse los recursos disponibles entre las etiquetas propias del entrenamiento y las inducidas por el testeo.



Lic. Julieta Correa

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. De Robertis", UBA-CONICET



Dra. Haydée Ana María Viola

Profesora asociada UBA, Investigadora principal CONICET

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. De Robertis", UBA-CONICET

BIBLIOGRAFIA

- Abdou, K., Shehata, M., Choko, K., Nishizono, H., Matsuo, M., Muramatsu, S. ichi, & Inokuchi, K. (2018). Synapse-specific representation of the identity of overlapping memory engrams. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6394), 1227-1231. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAT3810>
- Abraham, W. C., & Bear, M. F. (1996). Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 19(4), 126-130. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)80018-X](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)80018-X)
- Alberini, C. M., & Kandel, E. R. (2015). The Regulation of Transcription in Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a021741. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021741>
- Almaguer-Melian, W., Bergado-Rosado, J., Pavon-Fuentes, N., Alberti-Amador, E., Mercerón-Martínez, D., & Frey, J. U. (2012). Novelty exposure overcomes foot shock-induced spatial-memory impairment by processes of synaptic-tagging in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(3), 953-958. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114198109>
- Amtul, Z., & Atta-ur-Rahman. (2015). Neural plasticity and memory: molecular mechanism. *Reviews in the Neurosciences*, 26(3). <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0075>
- Anderson, C. M., & Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 32(1), 1-14. [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(200010\)32:1<1::AID-GLIA10>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1098-1136(200010)32:1<1::AID-GLIA10>3.0.CO;2-W)
- Arenz, S., & Wilson, D. N. (2016). Blast from the Past: Reassessing Forgotten Translation Inhibitors, Antibiotic Selectivity, and Resistance Mechanisms to Aid Drug Development. *Molecular cell*, 61(1), 3-14. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2015.10.019>
- Asok, A., Leroy, F., Rayman, J. B., & Kandel, E. R. (2019). Molecular Mechanisms of the Memory Trace. *Trends in Neurosciences*, 42(1), 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.10.005>
- Bae, S. E., & Richardson, R. (2018). Behavioral tagging in infant rats. *Learning & Memory*, 25(11), 580-586. <https://doi.org/10.1101/lm.047605.118>
- Balderas, I., Rodríguez-Ortiz, C. J., & Bermúdez-Rattoni, F. (2013). Retrieval and reconsolidation of object recognition memory are independent processes in the perirhinal cortex. *Neuroscience*, 253, 398-405. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2013.09.001>
- Ballarini, F., Martínez, M. C., Díaz Perez, M., Moncada, D., & Viola, H. (2013). Memory in Elementary School Children Is Improved by an Unrelated Novel Experience. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066875>
- Ballarini, F., Moncada, D., Martínez, M. C., Alen, N., & Viola, H. (2009). Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14599-14604. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907078106>
- Barco, A., Lopez de Armentia, M., & Alarcon, J. M. (2008). Synapse-specific stabilization of plasticity processes: The synaptic tagging and capture hypothesis revisited 10 years later. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(4), 831-851. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.01.002>
- Baumann, V., Birnbaum, T., Breitling-Ziegler, C., Tegelbeckers, J., Dambacher, J., Edelmann, E., Bergado-Acosta, J. R., Flechtner, H.-H., & Krauel, K. (2020).

- Exploration of a novel virtual environment improves memory consolidation in ADHD. *Scientific Reports*, 10(1), 21453. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78222-4>
- Bechtholt-Gompf, A. J., Walther, H. V., Adams, M. A., Carlezon, W. A., Ngür, D., & Cohen, B. M. (2010). Blockade of Astrocytic Glutamate Uptake in Rats Induces Signs of Anhedonia and Impaired Spatial Memory. *Neuropsychopharmacology*, 35(10), 2049. <https://doi.org/10.1038/NPP.2010.74>
- Beck, C. D. O., Schroeder, B., & Davis, R. L. (2000). Learning performance of normal and mutant drosophila after repeated conditioning trials with discrete stimuli. *Journal of Neuroscience*, 20(8), 2944-2953. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-08-02944.2000>
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilacqua, L. R. M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron*, 53(2), 261-277. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.025>
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2008). Reviews: BDNF and Memory Formation and Storage. *The Neuroscientist*, 14(2), 147-156. <https://doi.org/10.1177/1073858407305850>
- Bekinschtein, P., Kent, B. A., Oomen, C. A., Clemenson, G. D., Gage, F. H., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2013). BDNF in the Dentate Gyrus Is Required for Consolidation of "Pattern-Separated" Memories. *Cell Reports*, 5(3), 759-768. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.027>
- Bello-Medina, P. C., Sánchez-Carrasco, L., González-Ornelas, N. R., Jeffery, K. J., & Ramírez-Amaya, V. (2013). Differential effects of spaced vs. massed training in long-term object-identity and object-location recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 250, 102-113. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.04.047>
- Berman, D. E., & Dudai, Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: Dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, 291(5512), 2417-2419. <https://doi.org/10.1126/science.1058165>
- Bonin, R. P., & De Koninck, Y. (2015). Reconsolidation and the regulation of plasticity: moving beyond memory. *Trends in Neurosciences*, 38(6), 336-344. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.007>
- Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., & Silva, A. J. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*, 79(1), 59-68. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90400-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90400-6)
- Bouton, M. E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learning and Memory*, 11(5), 485-494. <https://doi.org/10.1101/lm.78804>
- Bramham, C. R., Alme, M. N., Bittins, M., Kuipers, S. D., Nair, R. R., Pai, B., Panja, D., Schubert, M., Soule, J., Tiron, A., & Wibrand, K. (2010). The Arc of synaptic memory. *Experimental Brain Research*, 200(2), 125-140. <https://doi.org/10.1007/s00221-009-1959-2>
- Braun, K., & Rubin, D. C. (1998). The Spacing Effect Depends on an Encoding Deficit, Retrieval, and Time in Working Memory: Evidence from Once-presented Words. *Memory*, 6(1), 37-66. <https://doi.org/10.1080/741941599>
- Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(40), 14515-14520. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406344101>

- Budriesi, P., Tintorelli, R., Correa, J., Villar, M. E., Marchal, P., Giurfa, M., & Viola, H. (2023). A behavioral tagging account of kinase contribution to memory formation after spaced aversive training. *iScience*, 26(8), 107278. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107278>
- Buzsáki, G., & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience*, 16(2), 130-138. <https://doi.org/10.1038/nn.3304>
- Cahill, L., McGaugh, J. L., & Weinberger, N. M. (2001). The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends in Neurosciences*, 24(10), 578-581. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01885-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01885-3)
- Cai, Y., Yang, T., Yu, X., Han, X., Chen, G., & Shi, C. (2023). The alternate-form reliability study of six variants of the Brief Visual-Spatial Memory Test-Revised and the Hopkins Verbal Learning Test-Revised. *Frontiers in Public Health*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1096397>
- Carpenter, S. K. (2017). Spacing Effects on Learning and Memory. En *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* (pp. 465-485). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21054-7>
- Cassini, L. F., Sierra, R. O., Haubrich, J., Crestani, A. P., Santana, F., de Oliveira Alvares, L., & Quillfeldt, J. A. (2013). Memory reconsolidation allows the consolidation of a concomitant weak learning through a synaptic tagging and capture mechanism. *Hippocampus*, 23(10), 931-941. <https://doi.org/10.1002/hipo.22149>
- Cepeda, N. J., Pashler, H., Vul, E., Wixted, J. T., & Rohrer, D. (2006). Distributed practice in verbal recall tasks: A review and quantitative synthesis. *Psychological Bulletin*, 132(3), 354-380. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.132.3.354>
- Cepeda, N. J., Vul, E., Rohrer, D., Wixted, J. T., & Pashler, H. (2008). Spacing effects in learning: A temporal ridge line of optimal retention: Research article. *Psychological Science*, 19(11), 1095-1102. https://doi.org/10.1111/J.1467-9280.2008.02209.X/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1111_J.1467-9280.2008.02209.X-FIG4.JPEG
- Chaudhry, F. A., Lehre, K. P., Lookeren Campagne, M. van, Ottersen, O. P., Danbolt, N. C., & Storm-Mathisen, J. (1995). Glutamate transporters in glial plasma membranes: Highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron*, 15(3), 711-720. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90158-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90158-2)
- Contador-Castillo, I. , Fernández-Calvo, B., Ramos Campos, F., Cacho Gutiérrez Laureano Jesús, & Rodríguez Pérez Roberto. (2009). Deterioro de la memoria no verbal en la demencia tipo Alzheimer: ¿olvido o adquisición? *Psicothema*, 21(1), 15-20.
- Cortés JF, G. y V. G. S. J. (1997). La figura compleja de Rey para niños: Propiedades psicométricas. *Salud Mental*, 20, 17-20.
- Davis, H. P., & Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: A review. *Psychological Bulletin*, 96(3), 518-559. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.96.3.518>
- de Carvalho Myskiw, J., Furini, C. R. G., Benetti, F., & Izquierdo, I. (2014). Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(12), 4572-4577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400423111>

- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2005). Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84(3), 214-221. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.07.002>
- Dong, Z., Gong, B., Li, H., Bai, Y., Wu, X., Huang, Y., He, W., Li, T., & Wang, Y. T. (2012). Mechanisms of hippocampal long-term depression are required for memory enhancement by novelty exploration. *Journal of Neuroscience*, 32(35), 11980-11990. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0984-12.2012>
- Dudai Y. (2002). *Memory from A to Z: Keywords, Concepts, and Beyond*. Oxford University Press.
- Dunsmoor, J. E., Murty, V. P., Davachi, L., & Phelps, E. A. (2015). Emotional learning selectively and retroactively strengthens memories for related events. *Nature*, 520(7547), 345-348. <https://doi.org/10.1038/nature14106>
- Ebbinghaus, H. (2013). Memory: A Contribution to Experimental Psychology. *Annals of Neurosciences*, 20(4), 155. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.200408>
- Frankland, P. W., & Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2), 119-130. <https://doi.org/10.1038/nrn1607>
- Frey, S., & Frey, J. U. (2008). Chapter 7 'Synaptic tagging' and 'cross-tagging' and related associative reinforcement processes of functional plasticity as the cellular basis for memory formation (pp. 117-143). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00007-6)
- Frey, U., & Morris, R. G. M. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature*, 385(6616), 533-536. <https://doi.org/10.1038/385533a0>
- Frey, U., & Morris, R. G. M. (1998). Weak before strong: dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP. *Neuropharmacology*, 37(4-5), 545-552. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(98\)00040-9](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(98)00040-9)
- Furuta, A., Rothstein, J. D., & Martin, J. L. (1997). Glutamate Transporter Protein Subtypes Are Expressed Differentially during Rat CNS Development. *Journal of Neuroscience*, 17(21), 8363-8375. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-21-08363.1997>
- García-DeLaTorre, P., Rodríguez-Ortiz, C. J., Arreguin-Martínez, J. L., Cruz-Castañeda, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2009). Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. *Learning & Memory*, 16(9), 514-519. <https://doi.org/10.1101/LM.1356509>
- Gates, A. I. (1917). *Recitation as a factor in memorizing*. The Science press.
- Gordon, K. R. (2020). The Advantages of Retrieval-Based and Spaced Practice: Implications for Word Learning in Clinical and Educational Contexts. *Language, Speech, and Hearing Services in Schools*, 51(4), 955-965. https://doi.org/10.1044/2020_LSHSS-19i-00001
- Greene, R. L. (1989). Spacing Effects in Memory: Evidence for a Two-Process Account. En *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition* (Vol. 15, Número 3).
- Gridchyn, I., Schoenenberger, P., O'Neill, J., & Csicsvari, J. (2020). Assembly-Specific Disruption of Hippocampal Replay Leads to Selective Memory Deficit. *Neuron*, 106(2), 291-300.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.01.021>

- Gros, A., & Wang, S. H. (2018). Behavioral tagging and capture: long-term memory decline in middle-aged rats. *Neurobiology of Aging*, 67, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.02.023>
- Guzowski, J. F., & McGaugh, J. L. (1997). Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(6), 2693-2698. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2693>
- Guzowski, J. F., Miyashita, T., Chawla, M. K., Sanderson, J., Maes, L. I., Houston, F. P., Lipa, P., McNaughton, B. L., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2006). Recent behavioral history modifies coupling between cell activity and Arc gene transcription in hippocampal CA1 neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4), 1077-1082. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0505519103/ASSET/9B698037-3CF9-4488-AF5D-E3457AA442A9/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ0020607250004.JPEG>
- Haubrich, J., & Nader, K. (2016). Memory Reconsolidation. En *Brain Imaging in Behavioral Neuroscience* (Número November 2011, pp. 151-176). https://doi.org/10.1007/7854_2016_463
- Hogan, R. M., & Kintsch, W. (1971). Differential effects of study and test trials on long-term recognition and recall. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior*, 10(5), 562-567. [https://doi.org/10.1016/S0022-5371\(71\)80029-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5371(71)80029-4)
- Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R. M., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences*, 29(9), 496-505. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.07.005>
- Josselyn, S. A., Köhler, S., & Frankland, P. W. (2015). Finding the engram. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(9), 521-534. <https://doi.org/10.1038/nrn4000>
- Josselyn, S. A., Shi, C., Carlezon, W. A., Neve, R. L., Nestler, E. J., & Davis, M. (2001). Long-Term Memory Is Facilitated by cAMP Response Element-Binding Protein Overexpression in the Amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 21(7), 2404-2412. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-07-02404.2001>
- Josselyn, S. A., & Tonegawa, S. (2020). Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science*, 367(6473). <https://doi.org/10.1126/science.aaw4325>
- Kandel, E. R. (2001). The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science*, 294(5544), 1030-1038. <https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Kandel E.R., & S. J. H. , & J. T. M. , & S. S. A. , & H. A. J. , & M. S. (2000). *Principles of Neural Science* (4th Edition). McGraw-Hill.
- Kapler, I. V., Weston, T., & Wiseheart, M. (2015). Spacing in a simulated undergraduate classroom: Long-term benefits for factual and higher-level learning. *Learning and Instruction*, 36, 38-45. <https://doi.org/10.1016/J.LEARNINSTRUC.2014.11.001>
- Karpicke, J. D., & Roediger, H. L. (2008). The critical importance of retrieval for learning. *Science*, 319(5865), 966-968. <https://doi.org/10.1126/science.1152408>
- Kemp, A., & Manahan-Vaughan, D. (2004). Hippocampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), 8192-8197. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402650101>

- Kim, J., Cho, H.-Y., Han, J.-H., & Kaang, B.-K. (2016). Which Neurons Will Be the Engram - Activated Neurons and/or More Excitable Neurons? *Experimental Neurobiology*, 25(2), 55-63. <https://doi.org/10.5607/en.2016.25.2.55>
- Kinnavane, L., Albasser, M. M., & Aggleton, J. P. (2015). Advances in the behavioural testing and network imaging of rodent recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 285, 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.049>
- Kramar, C. P., Chefer, V. I., Wise, R. A., Medina, J. H., & Barbano, M. F. (2014). Dopamine in the dorsal hippocampus impairs the late consolidation of cocaine-associated memory. *Neuropsychopharmacology*, 39(7), 1645-1653. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.11>
- Küpper-Tetzl, C. E., Erdfelder, E., & Dickhäuser, O. (2014). The lag effect in secondary school classrooms: Enhancing students' memory for vocabulary. *Instructional Science*, 42(3), 373-388. <https://doi.org/10.1007/S11251-013-9285-2>
- Lee, J. L. C. (2008). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience*, 11(11), 1264-1266. <https://doi.org/10.1038/nn.2205>
- Lehre, K. P., Levy, L. M., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., & Danbolt, N. C. (1995). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(3 Pt 1), 1835-1853. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-01835.1995>
- Levitan, D., Twitto, R., Levy, R., Lyons, L. C., & Susswein, A. J. (2010). A brief retraining regulates the persistence and lability of a long-term memory. *Learning and Memory*, 17(8), 402-406. <https://doi.org/10.1101/lm.1820010>
- Li, Q., Rothkegel, M., Xiao, Z. C., Abraham, W. C., Korte, M., & Sajikumar, S. (2014). Making synapses strong: Metaplasticity prolongs associativity of long-term memory by switching synaptic tag mechanisms. *Cerebral Cortex*, 24(2), 353-363. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs315>
- Liu, J.-F., Yang, C., Deng, J.-H., Yan, W., Wang, H.-M., Luo, Y.-X., Shi, H.-S., Meng, S.-Q., Chai, B.-S., Fang, Q., Chai, N., Xue, Y.-X., Sun, J., Chen, C., Wang, X.-Y., Wang, J.-S., & Lu, L. (2015). Role of Hippocampal -Adrenergic and Glucocorticoid Receptors in the Novelty-Induced Enhancement of Fear Extinction. *Journal of Neuroscience*, 35(21), 8308-8321. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0005-15.2015>
- Lopes da Cunha, P., Ramirez Butavand, D., Chisari, L. B., Ballarini, F., & Viola, H. (2018). Exams at classroom have bidirectional effects on the long-term memory of an unrelated graphical task. *npj Science of Learning*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41539-018-0036-7>
- Lopes da Cunha, P., Villar, M. E., Ballarini, F., Tintorelli, R., & Ana María Viola, H. (2019). Spatial object recognition memory formation under acute stress. *Hippocampus*, 29(6), 491-499. <https://doi.org/10.1002/hipo.23037>
- Lopez, J., Gamache, K., Schneider, R., & Nader, K. (2015). Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. En *Journal of Neuroscience* (Vol. 35, Número 6, pp. 2465-2475). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0735-14.2015>
- Lu, Y., Christian, K., & Lu, B. (2008). BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(3), 312-323. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.018>

- 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. *The Journal of Neuroscience*, 31(33), 11762-11771. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2707-11.2011>
- Lynch, M. A. (2004). Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews*, 84(1), 87-136. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00014.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/9J0140284006.JPEG>
- Malec, J. F., Ivnik, R. J., Smith, G. E., Tangalos, E. G., Petersen, R. C., Kokmen, E., & Kurland, L. T. (1992). Visual Spatial Learning Test: Normative Data and Further Validation. *Psychological Assessment*, 4(4), 433-441. <https://doi.org/10.1037/1040-3590.4.4.433>
- Malenka, R. C., & Nicoll, and R. A. (1999). Long-Term Potentiation--A Decade of Progress? *Science*, 285(5435), 1870-1874. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1870>
- Mamou, C. Ben, Gamache, K., & Nader, K. (2006). NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nature Neuroscience* 2006 9:10, 9(10), 1237-1239. <https://doi.org/10.1038/nn1778>
- Martin, K. C., & Kosik, K. S. (2002). Synaptic tagging — who's it? *Nature Reviews Neuroscience*, 3(10), 813-820. <https://doi.org/10.1038/nrn942>
- Martin, S. J., & Morris, R. G. M. (2002). New life in an old idea: The synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus*, 12(5), 609-636. <https://doi.org/10.1002/hipo.10107>
- Martínez, M. C., Alen, N., Ballarini, F., Moncada, D., & Viola, H. (2012). Memory traces compete under regimes of limited Arc protein synthesis: Implications for memory interference. *Neurobiology of Learning and Memory*, 98(2), 165-173. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2012.05.007>
- McGaugh, J. L. (2000). Memory - A century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
- Medina, J. H., & Viola, H. (2018). ERK1/2: A Key Cellular Component for the Formation, Retrieval, Reconsolidation and Persistence of Memory. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(October), 1-8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00361>
- 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. *Learning and Memory*, 8(4), 198-208. <https://doi.org/10.1101/lm.40001>
- Merlo, E., Milton, A. L., & Everitt, B. J. (2018). A novel retrieval-dependent memory process revealed by the arrest of ERK1/2 activation in the basolateral amygdala. *Journal of Neuroscience*, 38(13), 3199-3207. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3273-17.2018>
- Migues, P. V., Liu, L., Archbold, G. E. B. B., Einarsson, E. O., Wong, J., Bonasia, K., Ko, S. H., Wang, Y. T., & Hardt, O. (2016). Blocking Synaptic Removal of GluA2-Containing AMPA Receptors Prevents the Natural Forgetting of Long-Term Memories. *Journal of Neuroscience*, 36(12), 3481-3494. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3333-15.2016>
- Miles, S. W. (2014). Spaced vs. massed distribution instruction for L2 grammar learning. *System*, 42(1), 412-428. <https://doi.org/10.1016/j.system.2014.01.014>

- Moncada, D. (2016). Synaptic tagging and capture. En *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.02410-X>
- Moncada, D., Ballarini, F., Martinez, M. C., Frey, J. U., & Viola, H. (2011). Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12931-12936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104495108>
- Moncada, D., Ballarini, F., Martinez, M. C., & Viola, H. (2015). The Behavioral Tagging Hypothesis and Its Implications for Long-Term Memory Formation. En *Synaptic Tagging and Capture* (pp. 231-259). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1761-7_14
- Moncada, D., Ballarini, F., & Viola, H. (2015). Behavioral Tagging: A Translation of the Synaptic Tagging and Capture Hypothesis. *Neural Plasticity*, 2015, 1-21. <https://doi.org/10.1155/2015/650780>
- Moncada, D., & Viola, H. (2007). Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: Evidence for a behavioral tagging. *Journal of Neuroscience*, 27(28), 7476-7481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1083-07.2007>
- Myers, K. M., & Davis, M. (2002). Behavioral and Neural Analysis of Extinction. *Neuron*, 36(4), 567-584. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01064-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01064-4)
- Nadel, L., & Maurer, A. P. (2020). Recalling Lashley and reconsolidating Hebb. *Hippocampus*, 30(8), 776-793. <https://doi.org/10.1002/hipo.23027>
- Nader, K. (2003). Memory traces unbound. *Trends in Neurosciences*, 26(2), 65-72. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)00042-5)
- Nader, K. (2015). Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(10), a021782. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021782>
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722-726. <https://doi.org/10.1038/35021052>
- Naseem, M., Tabassum, H., & Parvez, S. (2019). PKM- ζ Expression Is Important in Consolidation of Memory in Prelimbic Cortex Formed by the Process of Behavioral Tagging. *Neuroscience*, 410, 305-315. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.060>
- O'Keefe, J. N. L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford University Press.
- Orlandi, I. R., Fullio, C. L., Schroeder, M. N., Giurfa, M., Ballarini, F., Moncada, D., Rabinovich, I., Fullio, C. L., Nicolás, M., Giurfa, M., & Ballarini, F. (2020). Behavioral tagging underlies memory reconsolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(30), 18029-18036. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.2009517117>
- Pagani, M. R., Oishi, K., Gelb, B. D., & Zhong, Y. (2009). The Phosphatase SHP2 Regulates the Spacing Effect for Long-Term Memory Induction. *Cell*, 139(1), 186-198. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.033>
- Parsons, R. G. (2018). Behavioral and neural mechanisms by which prior experience impacts subsequent learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 154(November), 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.11.008>

- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.). Elsevier.
- Pedreira, M. E., & Maldonado, H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, 38(6), 863-869. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00352-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00352-0)
- Pedroso, T. R., Jobim, P. F. C., Carvalho, L. M., Christoff, R. R., Maurmann, N., Reolon, G. K., Werenicz, A., & Roesler, R. (2013). Inhibition of protein synthesis or mTOR in the basolateral amygdala blocks retrieval-induced memory strengthening. *Journal of Neural Transmission*, 120(11), 1525-1531. <https://doi.org/10.1007/s00702-013-1032-y>
- Pereyra, M., Katche, C., De Landeta, A. B., & Medina, J. H. (2018). MTORC1 controls long-term memory retrieval. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27053-5>
- Pereyra, M., & Medina, J. H. (2021). AMPA Receptors: A Key Piece in the Puzzle of Memory Retrieval. *Frontiers in Human Neuroscience*, 15(September), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.729051>
- Philips, G. T., Ye, X., Kopec, A. M., & Carew, T. J. (2013). Cellular/Molecular MAPK Establishes a Molecular Context That Defines Effective Training Patterns for Long-Term Memory Formation These findings provide the first demonstration of a requirement for MAPK in the intertrial interactions during memory formation. *Journal of Neuroscience*, 33(17), 7565-7573. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5561-12>
- Pirogovsky, E., Nicoll, D. R., Challener, D. M., Breen, E., Gluhm, S., Corey-Bloom, J., & Gilbert, P. E. (2015). The Visual Spatial Learning Test: Differential impairment during the premanifest and manifest stages of Huntington's disease. *Journal of Neuropsychology*, 9(1), 77-86. <https://doi.org/10.1111/jnp.12036>
- Poo, M., Pignatelli, M., Ryan, T. J., Tonegawa, S., Bonhoeffer, T., Martin, K. C., Rudenko, A., Tsai, L.-H., Tsien, R. W., Fishell, G., Mullins, C., Gonçalves, J. T., Shtrahman, M., Johnston, S. T., Gage, F. H., Dan, Y., Long, J., Buzsáki, G., & Stevens, C. (2016). What is memory? The present state of the engram. *BMC Biology*, 14(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0261-6>
- Ramirez Butavand, D., Hirsch, I., Tomaiuolo, M., Moncada, D., Viola, H., & Ballarini, F. (2020). Novelty Improves the Formation and Persistence of Memory in a Naturalistic School Scenario. *Frontiers in Psychology*, 11(January). <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.00048>
- Raven, F., Bolsius, Y. G., van Renssen, L. V., Meijer, E. L., van der Zee, E. A., Meerlo, P., & Havekes, R. (2021). Elucidating the role of protein synthesis in hippocampus-dependent memory consolidation across the day and night. *European Journal of Neuroscience*, 54(8), 6972-6981. <https://doi.org/10.1111/ejn.14684>
- Redondo, R. L., & Morris, R. G. M. (2011). Making memories last: The synaptic tagging and capture hypothesis. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(1), 17-30. <https://doi.org/10.1038/nrn2963>
- Rey, A. (1959). Test de copie et de reproduction de memoire de figures geometriques complexes. En *Editions du centre de Psychologie Appliquee*.
- Richards, B. A., & Frankland, P. W. (2013). The conjunctive trace. *Hippocampus*, 23(3), 207-212. <https://doi.org/10.1002/HIPO.22089>
- Riedel, G., Micheau, J., Lam, A. G. M., Roloff, E. V. L., Martin, S. J., Bridge, H., De Hoz, L., Poeschel, B., McCulloch, J., & Morris, R. G. M. (1999). Reversible neural

- inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nature neuroscience*, 2(10), 898-905. <https://doi.org/10.1038/13202>
- Robbins, D., & Bush, C. T. (1973). Memory in great apes. *Journal of Experimental Psychology*, 97(3), 344-348. <https://doi.org/10.1037/h0034133>
- Rodriguez-Ortiz, C. J., Balderas, I., Garcia-DeLaTorre, P., & Bermudez-Rattoni, F. (2012). Taste aversion memory reconsolidation is independent of its retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 98(3), 215-219. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.08.002>
- Rodriguez-Ortiz, C. J., Garcia-DeLaTorre, P., Benavidez, E., Ballesteros, M. A., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(3), 352-359. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2007.10.004>
- Roediger, H. L., & Karpicke, J. D. (2006). Test-Enhanced Learning. *Psychological Science*, 17(3), 249-255. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9280.2006.01693.x>
- Rossato, J. I., Bevilacqua, L. R. M., Izquierdo, I., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science*, 325(5943), 1017-1020. <https://doi.org/10.1126/science.1172545>
- Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., & Kuncel, R. W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, 13(3), 713-725. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90038-8)
- Rubin, A., Geva, N., Sheintuch, L., & Ziv, Y. (2015). Hippocampal ensemble dynamics timestamp events in long-term memory. *eLife*, 4(DECEMBER2015), e12247. <https://doi.org/10.7554/eLife.12247>
- Sajikumar, S., Li, Q., Abraham, W. C., & Xiao, Z. C. (2009). Priming of short-term potentiation and synaptic tagging/capture mechanisms by ryanodine receptor activation in rat hippocampal CA1. *Learning & Memory*, 16(3), 178-186. <https://doi.org/10.1101/LM.1255909>
- Sajikumar, S., Navakkode, S., & Frey, J. U. (2007). Identification of compartment- and process-specific molecules required for «synaptic tagging» during long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1. *Journal of Neuroscience*, 27(19), 5068-5080. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4940-06.2007>
- Santoyo-Zedillo, M., Rodriguez-Ortiz, C. J., Chavez-Marchetta, G., Bermudez-Rattoni, F., & Balderas, I. (2014). Retrieval is not necessary to trigger reconsolidation of object recognition memory in the perirhinal cortex. *Learning and Memory*, 21(9), 452-456. <https://doi.org/10.1101/lm.035428.114>
- Sara, S. J. (2000). Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering. *Learning & Memory*, 7(2), 73-84. <https://doi.org/10.1101/lm.7.2.73>
- Schmidt, M. V., Abraham, W. C., Maroun, M., Stork, O., & Richter-Levin, G. (2013). Stress-induced metaplasticity: From synapses to behavior. *Neuroscience*, 250, 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.06.059>
- Schmitt, A., Asan, E., Püschel, B., & Kugler, P. (1997). Cellular and Regional Distribution of the Glutamate Transporter GLAST in the CNS of Rats: Nonradioactive In Situ Hybridization and Comparative Immunocytochemistry. *Journal of Neuroscience*, 17(1), 1-10. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-01-00001.1997>

- Schomaker, J., Roos, R., & Meeter, M. (2014). Expecting the unexpected: The effects of deviance on novelty processing. *Behavioral Neuroscience*, 128(2), 146-160. <https://doi.org/10.1037/a0036289>
- Schroeder, M. N., Fullio, C. L., Ballarini, F., & Moncada, D. (2023). Modulation of memory reconsolidation by adjacent novel tasks: timing defines the nature of change. *Communications Biology*, 6(1), 1288. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05666-5>
- Semon, R. (2001). *Richard Semon and the Story of Memory*. Psychology Press.
- Shin, M. S., Park, S. Y., Park, S. R., Seol, S. H., & Kwon, J. S. (2006). Clinical and empirical applications of the Rey-Osterrieth Complex Figure Test. *Nature Protocols*, 1(2), 892-899. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.115>
- Silva, A. J., Kogan, J. H., Frankland, P. W., & Kida, S. (1998). CREB AND MEMORY. *Annual Review of Neuroscience*, 21(1), 127-148. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.127>
- Slipczuk, L., Bekinschtein, P., Katche, C., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2009). BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS ONE*, 4(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006007>
- Smolen, P., Zhang, Y., & Byrne, J. H. (2016). The right time to learn: Mechanisms and optimization of spaced learning. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(2), 77-88. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.18>
- Sobel, H. S., Cepeda, N. J., & Kapler, I. V. (2011). Spacing effects in real-world classroom vocabulary learning. *Applied Cognitive Psychology*, 25(5), 763-767. <https://doi.org/10.1002/ACP.1747>
- Sosanya, N. M., Cacheaux, L. P., Workman, E. R., Niere, F., Perrone-Bizzozero, N. I., & Raab-Graham, K. F. (2015). Mammalian target of rapamycin (mTOR) tagging promotes dendritic branch variability through the capture of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α (CaMKII α) mRNAs by the RNA-binding protein HuD. *Journal of Biological Chemistry*, 290(26), 16357-16371. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.599399>
- Spitzer, H. F. (1939). Studies in retention. *Journal of Educational Psychology*, 30(9), 641-656. <https://doi.org/10.1037/h0063404>
- Squire, L. R., Stark, C. E. L., & Clark, R. E. (2004). THE MEDIAL TEMPORAL LOBE. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 279-306. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130>
- Steinberg, B. A., Bieliauskas, L. A., Smith, G. E., Ivnik, R. J., & Malec, J. F. (2005). Mayo's Older Americans Normative Studies: Age- and IQ-adjusted norms for the Auditory Verbal Learning Test and the Visual Spatial Learning Test. *Clinical Neuropsychologist*, 19(3-4), 464-523. <https://doi.org/10.1080/13854040590945193>
- Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J., & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4787-4795. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004>
- Szapiro, G., Galante, J. M., Barros, D. M., Levi de Stein, M., Vianna, M. R. M., Izquierdo, L. A., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2002). Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochemical Research*, 27(11), 1491-1498. <https://doi.org/10.1023/A:1021648405461>

- Szapiro, G., Izquierdo, L. A., Alonso, M., Barros, D., Paratcha, G., Ardenghi, P., Pereira, P., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2000). Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience*, 99(1), 1-5. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00236-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00236-0)
- Taubenfeld, S. M., Wiig, K. A., Bear, M. F., & Alberini, C. M. (1999). A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 2(4), 309-310. <https://doi.org/10.1038/7217>
- Tay, K. R., Flavell, C. R., Cassini, L., Wimber, M., & Lee, J. L. C. (2019). Postretrieval Relearning Strengthens Hippocampal Memories via Destabilization and Reconsolidation. *Journal of Neuroscience*, 39(6), 1109-1118. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2618-18.2018>
- Thompson, C. P., Wenger, S. K., & Bartling, C. A. (1978). How recall facilitates subsequent recall: A reappraisal. *Journal of Experimental Psychology: Human Learning and Memory*, 4(3), 210-221. <https://doi.org/10.1037/0278-7393.4.3.210>
- Tian, S. W., Yu, X. D., Cen, L., & Xiao, Z. Y. (2019). Glutamate transporter GLT1 inhibitor dihydrokainic acid impairs novel object recognition memory performance in mice. *Physiology & Behavior*, 199, 28-32. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2018.10.019>
- Tintorelli, R., Budriesi, P., Villar, M. E., Marchal, P., da Cunha, P. L., Correa, J., Giurfa, M., & Viola, H. (2020). Spatial-Memory Formation After Spaced Learning Involves ERKs1/2 Activation Through a Behavioral-Tagging Process. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57007-4>
- Tomaiuolo, M., Katche, C., Viola, H., & Medina, J. H. (2015). Evidence of Maintenance Tagging in the Hippocampus for the Persistence of Long-Lasting Memory Storage. *Neural Plasticity*, 2015, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/603672>
- Tonegawa, S., Nakazawa, K., & Wilson, M. A. (2003). Genetic neuroscience of mammalian learning and memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1432), 787-795. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1243>
- Trent, S., Barnes, P., Hall, J., & Thomas, K. L. (2015). Rescue of long-term memory after reconsolidation blockade. *Nature Communications*, 6, 1-7. <https://doi.org/10.1038/ncomms8897>
- Tronson, N. C., & Taylor, J. R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(4), 262-275. <https://doi.org/10.1038/nrn2090>
- Tulving, E. (2002). Episodic Memory: From Mind to Brain. *Annual Review of Psychology*, 53(1), 1-25. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.53.100901.135114>
- Tzingounis, A. V., & Nicoll, R. A. (2006). Arc/Arg3.1: Linking Gene Expression to Synaptic Plasticity and Memory. *Neuron*, 52(3), 403-407. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.016>
- Viola H, B. F. and M. D. (2024). The Behavioral Tagging hypothesis: a mechanistic approach for the storage of lasting memories. En *Synaptic Tagging and Capture. From Synapses to Behavior*. (Second Edition). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-54864-2>
- Viola, H., Ballarini, F., Martínez, M. C., & Moncada, D. (2014). The Tagging and Capture Hypothesis from Synapse to Memory. En *Progress in Molecular Biology*

- and Translational Science* (Vol. 122, pp. 391-423). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420170-5.00013-1>
- Wang, S. H., Redondo, R. L., & Morris, R. G. M. (2010). Relevance of synaptic tagging and capture to the persistence of long-term potentiation and everyday spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), 19537-19542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008638107>
- Wibbrand, K., Pai, B., Siripornmongcolchai, T., Bittins, M., Berentsen, B., Ofte, M. L., Weigel, A., Skaftnesmo, K. O., & Bramham, C. R. (2012). MicroRNA Regulation of the Synaptic Plasticity-Related Gene Arc. *PLoS ONE*, 7(7), e41688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041688>
- Yang, C., Liu, J.-F., Chai, B.-S., Fang, Q., Chai, N., Zhao, L.-Y., Xue, Y.-X., Luo, Y.-X., Jian, M., Han, Y., Shi, H.-S., Lu, L., Wu, P., & Wang, J.-S. (2013). Stress within a Restricted Time Window Selectively Affects the Persistence of Long-Term Memory. *PLoS ONE*, 8(3), e59075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059075>
- Zamorano, C., Fernández-Albert, J., Storm, D. R., Carné, X., & Sindreu, C. (2018). Memory Retrieval Re-Activates Erk1/2 Signaling in the Same Set of CA1 Neurons Recruited During Conditioning. *Neuroscience*, 370, 101-111. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.03.034>
- Zhang, H.-T., Zhao, Y., Huang, Y., Dorairaj, N. R., Chandler, L. J., & O'Donnell, J. M. (2004). Inhibition of the Phosphodiesterase 4 (PDE4) Enzyme Reverses Memory Deficits Produced by Infusion of the MEK Inhibitor U0126 into the CA1 Subregion of the Rat Hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 29(8), 1432-1439. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300440>

Apéndice

Interfaz de la aplicación desarrollada para realizar el test de VLST:

Ejemplo de una sesión de Entrenamiento:

Paso 1:

Por favor ingresá tu email:

Paso 2:

Consentimiento Informado

¡Bienvenido/a! Esta es una investigación neurocientífica desarrollada por investigadores del Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof E. De Robertis" (UBA-CONICET).

Hoy podrás realizar una actividad que te demandará aproximadamente 15 minutos. Luego te contactaremos otros dos días más para realizar otra actividad de menos de 5 minutos de duración. En cada ocasión vas a tener que reconocer y ubicar símbolos en un tablero que van a aparecer en la pantalla. Será importante para el proyecto de investigación que puedas seguir las consignas sin interrupciones ni distracciones. El único requisito para participar es ser mayor de 18 años.

Tu participación es voluntaria, por lo que no estás obligado/a a realizar la actividad ni a responder cada una de las preguntas. Podés abandonar tu participación en cualquier momento si así lo deseas. La información recolectada durante este estudio será guardada confidencialmente. Los resultados pueden ser publicados para propósitos científicos, pero la identidad de las personas participantes no será revelada. Tus datos se mantendrán anónimos, asignándoles un código. Te solicitamos tu correo electrónico, para individualizar el registro y poder comunicarnos con vos para continuar con las actividades. Todos tus datos están protegidos por la Ley 25.326 de Protección de Datos Personales.

Para no influenciar la participación de otros voluntarios te pedimos por favor que no comentes los contenidos y tareas de esta actividad. Si tenés cualquier tipo de duda, podés escribirnos a hviola@fmed.uba.ar o comunicarte telefónicamente con el investigador a cargo (Dra. Haydée Viola, (54-11) 5285-2800 int. 53179), o con el Comité de Ética Humana (comitedeetica@fmed.uba.ar).


Si estás de acuerdo en participar, te pedimos que brindes tu conformidad, marcando el casillero de abajo.

Muchas gracias.

¿Estás de acuerdo en participar?

☐ Sí, estoy de acuerdo en participar

I B C N



CONICET

U B A

Paso 3:

Encuesta inicial

A continuación, le solicitamos que complete con la siguiente información personal.

Mail de contacto:

Edad:

Género:

Autodescriptivo:

Provincia:

Nivel educativo: ☐ Primario ☐ Secundario ☐ Terciario ☐ Universitario

☐ Completo ☐ Incompleto

¿Tenés algún diagnóstico de salud mental o neurológico?

☐ Sí ☐ No

¿Cuál? (optativo)

¿Tomás psicofármacos o psicotrópicos?

☐ Sí ☐ No

¿Tuviste COVID-19?

☐ Sí ☐ No

¿Cuándo lo tuviste por última vez?

¿Tuviste síntomas?

Paso

Asegurate de poder estar los próximos 15 minutos sin interrupciones.

Vas a tener 10 segundos para observar los símbolos que aparecen bajo el tablero. Son todos diferentes.

Paso 5:

ϕ

\neq

\triangle

\star

∇

\neq

∇

\circ

\cup

\oplus

\simeq

\in

\times

∇

$\sqrt{\circ}$

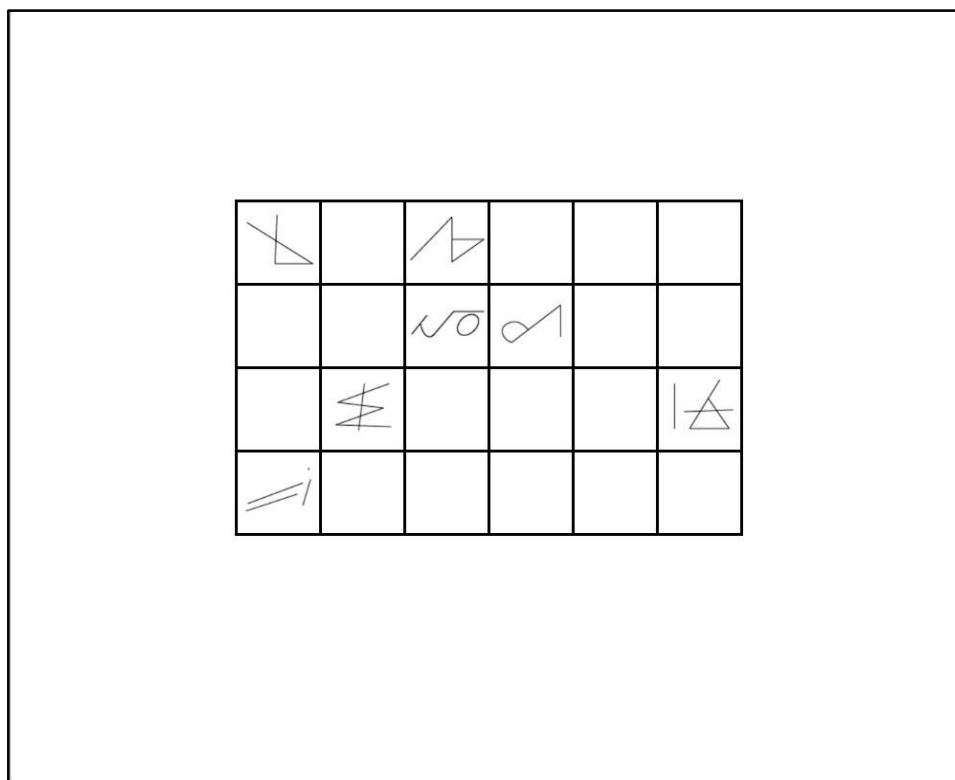
Paso 6:

Vas a ver 7 de los símbolos anteriores dentro del tablero.

Tendrás 10 segundos para recordarlos en su ubicación.

Siguiente

Paso 7:



Paso 8:

Ahora intentá colocar los símbolos dentro del tablero según lo que acabás de observar.


Para cada símbolo que elijas ubicar, primero hacé click sobre el mismo y luego sobre el casillero que le corresponde en el tablero.


Si necesitás cambiar su ubicación, volvé a hacer click en el símbolo.


Tenés 2 minutos para ubicar los 7 símbolos.


Siguiente


Paso 9:









































1:55 [Siguiente](#)

Paso 10:

¡Vamos de nuevo!

Vas a volver a ver los 7 símbolos en su ubicación correcta dentro del tablero.

Tendrás 10 segundos para recordarlos.

[Siguiente](#)

Se repiten pasos 7, 8 y 9 hasta completar 5 ensayos.

Al finalizar:

Cierre



Gracias por tu participación.

¡Nos vemos pronto con otra actividad!



Ejemplo de una sesión de Test:

Paso 1

Por favor ingresá tu email:

Ingresar

Paso 2:

¿Te acordás de la actividad de los símbolos y el tablero?

Intentá colocar nuevamente aquellos 7 símbolos en sus ubicaciones correctas dentro del tablero.

Para cada símbolo que elijas ubicar, primero hacé click sobre el mismo y luego sobre el casillero que le corresponde en el tablero.

Si necesitás cambiar su ubicación, volvé a hacer click en el símbolo.

Tenés 2 minutos para ubicar los 7 símbolos.

Siguiente

4:

Cierre



Gracias por tu participación.

¡Nos vemos pronto con otra actividad!



Formulario de Consentimiento Informado (CI)

¡Bienvenido/a! Esta es una investigación neurocientífica desarrollada por investigadores del Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof E. De Robertis” (UBA-CONICET).

Hoy podrás realizar una actividad que te demandará aproximadamente 15 minutos. Luego te contactaremos otros dos días más para realizar otra actividad de menos de 5 minutos de duración. En cada ocasión vas a tener que reconocer y ubicar símbolos en un tablero que van a aparecer en la pantalla. Será importante para el proyecto de investigación que puedas seguir las consignas sin interrupciones ni distracciones. El único requisito para participar es ser mayor de 18 años.

Tu participación es voluntaria, por lo que no estás obligado/a a realizar la actividad ni a responder cada una de las preguntas. Podés abandonar tu participación en cualquier momento si así lo deseas. La información recolectada durante este estudio será guardada confidencialmente. Los resultados pueden ser publicados para propósitos científicos, pero la identidad de las personas participantes no será revelada. Tus datos se mantendrán anónimos, asignándoles un código. Te solicitamos tu correo electrónico, para individualizar el registro y poder comunicarnos con vos para continuar con las actividades. Todos tus datos están protegidos por la Ley 25.326 de Protección de Datos Personales.

Para no influenciar la participación de otros voluntarios te pedimos por favor que no comentes los contenidos y tareas de esta actividad. Si tenés cualquier tipo de duda, podés escribirnos a hviola@fmed.uba.ar o comunicarte telefónicamente con el investigador a cargo (Dra. Haydée Viola, (54-11) 5285-2800 int. 53179), o con el Comité de Ética Humana (comitedeetica@fmed.uba.ar).

Si estás de acuerdo en participar, te pedimos que brindes tu conformidad, marcando el casillero de abajo.

Muchas gracias.

¿Estás de acuerdo en participar?

☐

Sí, estoy de acuerdo en participar