



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Biblioteca Digital FCEN-UBA

Dos tipos de memoria determinadas por la presentación repetida de un mismo estímulo de peligro : Estudio comportamental y farmacológico en *Chasmagnathus*

Pedreira, María Eugenia

1999

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

www.digital.bl.fcen.uba.ar

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

FCE y N BIBLIOTECA

DOS TIPOS DE MEMORIA DETERMINADAS POR LA PRESENTACIÓN REPETIDA DE UN MISMO ESTÍMULO DE PELIGRO. ESTUDIO COMPORTAMENTAL Y FARMACOLÓGICO EN *CHASMAGNATHUS*.

Autora: Lic. María Eugenia Pedreira.

Director: Dr. Héctor Maldonado.

LABORATORIO DE NEUROBIOLOGIA DE LA MEMORIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

1999

1403159

Muchos de los resultados mostrados en esta tesis han sido parcial o totalmente publicados en los siguientes artículos:

CYCLOHEXIMIDE INHIBITS CONTEXT MEMORY AND LONG-TERM HABITUATION IN THE CRAB *CHASMAGNATHUS*. Pedreira ME, Dimant B, Tomsic D, Quesada-Allue LA & Maldonado H. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*; vol. 52(2), pp.: 385-395 (1995).

INHIBITORS OF PROTEIN AND RNA SYNTHESIS BLOCK CONTEXT MEMORY AND LONG-TERM HABITUATION IN THE CRAB *CHASMAGNATHUS*. Pedreira ME, Dimant B & Maldonado H. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*; vol. 54(4), pp.: 611-617 (1996).

MASSED AND SPACED TRAINING BUILD UP DIFFERENT COMPONENTS OF LONG TERM HABITUATION IN THE CRAB *CHASMAGNATHUS*. Pedreira ME, Romano A, Tomsic D, Lozada M & Maldonado H. *Animal Learning and Behavior*; vol. 26, pp.: 32-43(1998).

CONTEXT SHIFT AND PROTEIN SYNTHESIS INHIBITION DISRUPT LONG-TERM HABITUATION AFTER SPACED, BUT NOT MASSED, TRAINING IN THE CRAB *CHASMAGNATHUS*. Hermitte G, Pedreira ME, Tomsic D & Maldonado H. *Neurobiology of Learning and Memory*; vol. 71, pp.:34-49 (1999).

Quiero agradecer:

A Rodolfo, por ser mi principio.

A mis hijos Lucía y Nicolás, por ser el Amor, la Esperanza y por ser la prueba de que todo puede ser mejor.

A mis padres y mi hermana, por su amor, ejemplo de vida, comprensión y el apoyo incondicional en estos años.

A mi Director de Tesis, Dr. Héctor Maldonado, por sus consejos, enseñanzas permanente estímulo y respaldo constante que me permitió desarrollarme en el campo de la Investigación.

A Marisa, por ser mi amiga, compañera, y firme sostén, aunque a la distancia, para concretar esta tesis.

A mis amigos, por su cariño y aliento constante.

A mis compañeros de trabajo: Beatriz Dimant, Gabriela Hermitte, Miriam Saraco, Patricia Pereyra, Angel Vidal, Daniel Tomsic, Arturo Romano, Alejandro Delorenzi, Juan Aggio, Fernando Locatelli, Martín Berón de Astrada y Ramiro Freudenthal por todo lo compartido durante estos años.

Un reconocimiento especial a Gabriela Hermitte por su participación en la última serie experimental incluida en esta tesis.

Por último quiero expresar mi mas sincero agradecimiento a la Fundación Antorchas, gracias a cuya beca pude finalizar el trabajo de investigación que materializa esta tesis.

A Rodo, Luli y Nico por su amor.

INDICE

	Pag. N ^o
CAPITULO 1	
Introducción	1
1. El hecho inicial	2
2. Métodos y discusión metodológica en estudios de memoria. La contribución y las limitaciones de la psicología experimental. La aproximación biológica.	3
2.1 Tres niveles de aprendizaje.	4
2.2 Tres preguntas sobre el fenómeno de aprendizaje.	6
2.3 El hecho inicial pareció ser un caso mas de habituación clásica.	7
2.4 Virtudes y debilidades del “método de la psicología experimental”.	9
3. Modelo canónico de la habituación y modelo de memoria a largo término de <i>Chasmagnathus</i> : peculiaridades y contradicciones.	13
4. Tres propiedades de todas las memorias.	18
5. <i>Chasmagnathus</i> como modelo para el estudio de procesos de aprendizaje y memoria. Sus ventajas para la caracterización del fenómeno a nivel farmacológico.	20
6. Objetivo	24
CAPITULO 2	
Materiales y Métodos Generales	25

1. Animales, obtención y mantenimiento en el laboratorio.	26
2. Equipo: <i>Universal</i> . Características generales del aparato.	27
3. Descripción del ensayo y de la respuesta de escape.	29
4. Protocolo experimental	30
5. Evaluación de la retención de la respuesta habituada	31
6. Drogas e inyecciones.	32
7. Definiciones.	32

CAPITULO 3

Efecto de la cicloheximida sobre la habituación a largo termino y la memoria contextual.	34
1. INTRODUCCION	35
2. METODOS	
2.1. Diseño experimental.	36
2.1.1 Experimentos sobre habituación a largo término.	36
2.1.2 Experimentos sobre memoria de contexto.	37
2.2 Inyección	38
2.3 Análisis de los datos y evaluación del efecto amnésico.	39
2.4 Método bioquímico	40
3. RESULTADOS	

3.1 Resultados de los experimentos sobre inhibición de la incorporación de aminoácidos marcados.	41
3.2 Resultados de experimentos comportamentales.	
3.2.1 La administración de la CI antes del entrenamiento no afecta la actividad exploratoria ni la habituación a corto término (HCT).	42
3.2.2 Efecto de la cicloheximida, administrada antes del entrenamiento, sobre la habituación a largo término.	43
A) 72 horas de intervalo entre sesiones.	44
B) 24 horas de intervalo entre sesiones.	47
C) 120 horas de intervalo entre sesiones.	50
3.2.3 Efecto de la CI administrada antes del Entrenamiento sobre la memoria de contexto.	52
3.2.4 Evaluación de la dependencia de estado como responsable del efecto amnésico observado de CI sobre la memoria contextual.	54
3.2.5 Efecto a las 24 horas de la CI administrada Inmediatamente después del entrenamiento, sobre la habituación a largo término y sobre la memoria de contexto.	56
3.2.6 Ventana temporal para el efecto amnésico de CI sobre La Habituación a largo término (HLT)	59
4. DISCUSION	61

CAPITULO 4

Estudio comparativo del efecto de actinomicina-D con el de cicloheximida sobre la habituación a largo termino y la memoria contextual. 64

1. INTRODUCCION 65

2. METODOS

2.1. Diseño experimental 65

2.1.1 Experimentos sobre habituación a largo término. 66

2.1.2 Experimentos sobre memoria del contexto. 67

2.2 Inyección 68

2.3 Análisis de los datos y evaluación del efecto amnésico 68

2.4 Método bioquímico 68

3. RESULTADOS

3.1 Resultados de los experimentos sobre inhibición de la incorporación de aminoácidos marcados. 70

3.2 Resultados de experimentos comportamentales.

3.2.1 Malestar y mortandad luego de la administración de diferentes dosis de actinomicina-D (AD). 70

3.2.2 La administración de la AD antes del

entrenamiento no afecta la habituación a corto término (HCT).	71
3.2.3 Efecto a las 24 horas de la AD y de la CI administrada inmediatamente después del entrenamiento, sobre la habituación a largo término y la memoria contextual.	72
A)Efecto sobre la HLT	73
B)Efecto sobre la MCTX	75
3.2.4 Efecto a las 24 horas de la AD y de la CI administrada inmediatamente antes del entrenamiento, sobre la habituación a largo término y la memoria contextual.	77
A)Efecto sobre la HLT	77
B)Efecto sobre la MCTX	79
4. DISCUSION	82
CAPITULO 5	
Efecto de la distribución temporal de los ensayos de entrenamiento sobre la habituación a largo término.	84
1. INTRODUCCION	85
2. METODOS	
2.1 Diseño experimental	86

2.2	Análisis de datos	88
3.	RESULTADOS	
3.1	Efecto de la variación en el número de ensayos de entrenamiento sobre ambas fases de la evaluación, manteniendo constante el intervalo entre ensayos. (IEE=171 seg.).	89
3.2	Efecto de la variación de los intervalos entre ensayos (IEE) sobre ambas fases de la evaluación, manteniendo constante el número de ensayos.	91
3.3	Efecto de la incongruencia entre el IEE de la sesión de entrenamiento y el de evaluación.	97
3.4	Efecto de la variación del número de ensayos de entrenamiento con IEE breves, sobre ambas fases de la evaluación.	100
4.	DISCUSIÓN	105
 CAPITULO 6		
	Caracterización comparativa de las propiedades de la HLT espaciado-dependiente con las de la HLT masivo-dependiente.	107
1.	INTRODUCCION	108

2. METODOS	
2.1 Diseño experimental	109
2.2 Experimentos con CI: preparación de dosis e inyección	110
2.3 Experimentos de cambio de contexto	111
2.4 Análisis de datos	111
3. RESULTADOS	
3.1 Efecto del cambio entrenamiento-evaluación de las claves contextuales.	112
3.2 Efecto comparativo de CI sobre la HLT luego de un entrenamiento espaciado y luego de un masivo.	115
3.3 Duración de la HLT espaciado-dependiente y de la masivo-dependiente.	123
4. DISCUSION	126
CAPITULO 7	
Discusión general	127
1. Habitación a largo término en <i>Chasmagnathus</i> : Conclusiones a partir del análisis de las tres propiedades universales de los procesos mnésicos.	128
1.1 La consolidación depende de la síntesis de proteínas	128

1.2 La retención de la memoria depende de un período de consolidación que sigue al entrenamiento o se inicia durante el mismo.	129
1.3 El nivel y duración de la retención de la memoria depende del intervalo entre ensayos de entrenamiento	130
2. Dos mecanismos mnésicos diferentes cuya activación depende de la distribución temporal de los ensayos durante el entrenamiento .	132
3. Postulación del modelo: dos tipos de memoria y un mismo estímulo de peligro.	133
4. Ubicuidad de los dos tipos de memoria dentro de las categorías ofrecidas por la Psicología Experimental.	136
5. Memoria del <i>timing</i> : La retención de la HLT en <i>Chasmagnathus</i> se ve afectada cuando se cambia el IEE entre entrenamiento-evaluación.	137
6. Valor adaptativo de los dos tipos de memoria Posible relación con los estímulos ambientales.	139
7. Propuesta de un modelo interpretativo. Funcionamiento de los mecanismos que producen los dos tipos de memoria.	139
REFERENCIAS	142

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1. El hecho inicial

Los trabajos acerca de procesos de memoria en el cangrejo Chasmagnathus se iniciaron en el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria de esta Facultad en el año 1986, basados en una recurrente observación de campo confirmada por pruebas muy elementales de laboratorio. Ante la presentación de una sombra pasante sobre el cangrejo, éste despliega una respuesta de escape que tiende a disminuir rápidamente a medida que se reitera la estimulación. Al hacer más estrictas las condiciones experimentales de estas pruebas, se obtuvieron comprobaciones cuantificadas del fenómeno. Se comenzó a utilizar un protocolo que consistía en 15 presentaciones de una sombra pasante sobre el cangrejo (estímulo de peligro), separadas por un intervalo de 3 minutos. Conjuntamente con un grupo experimental (TR) se corría un grupo control (CT), formado por animales que eran sometidos a las mismas condiciones experimentales que el TR durante toda la sesión de entrenamiento, pero sin que se les presentara el estímulo de peligro. Después de un intervalo de 24 horas, tanto el TR como el CT recibían 6 ensayos separados por 3 minutos. Un resultado típico de esta clase de experimentos se presenta en la **figura 1**.

En síntesis: un estímulo de peligro presentado repetidamente conduce a un decremento de la respuesta de escape por el término de 24 horas, manifestándose por una diferencia CT-TR en los niveles de respuesta. Este resultado ha constituido el hecho inicial que dio lugar a una serie de investigaciones destinadas a estudiar el proceso de memoria en Chasmagnathus, con una aproximación a la vez comportamental y mecanística.

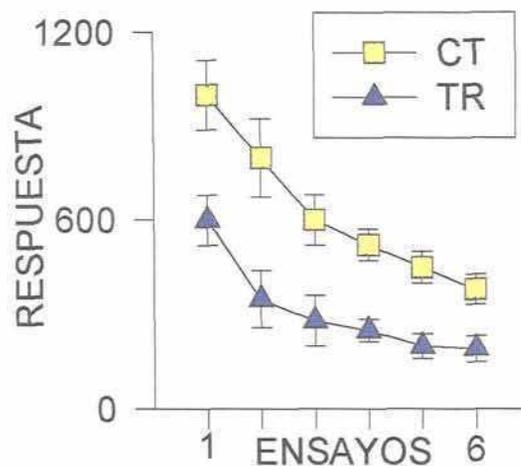


Figura 1: Sesión de evaluación a 24 horas, luego de un entrenamiento con 15 ensayos separados por un intervalo entre ensayos (IEE) de 3 minutos. IEE de la evaluación: 3 minutos. TR: grupo experimental; CT: grupo control ; Los cuadrados amarillos representan al grupo control; los triángulos azules representan al grupo entrenado. Abscisas: Ensayos; Ordenada: media del valor de la respuesta de escape por ensayo.

Los primeros trabajos estuvieron dirigidos a determinar si se trataba de un fenómeno sólido, reproducible y persistente, además de asignarlo a un tipo determinado de aprendizaje (Brunner & Maldonado, 1988; Lozada, Romano, Maldonado, 1990; Romano, Lozada, Maldonado, 1991).

La realización de un estudio como el planteado, implicó la adopción de un tipo de metodología de análisis, con la incorporación de ciertos principios y definiciones canónicas. En la sección siguiente se presenta una visión sintética de esas nociones y se plantea una discusión acerca de los métodos en los estudios sobre aprendizaje y memoria.

2. Métodos y discusión metodológica en estudios de memoria. La contribución y las limitaciones de la psicología experimental. La aproximación biológica.

Con la expresión "método de la psicología experimental" entendemos un conjunto de procedimientos y diseños experimentales, así como un encuadre teórico y esquema clasificatorio, que los psicólogos experimentales han formado como cuerpo de métodos y doctrina para el estudio comportamental del aprendizaje y la memoria.

Gran parte de estos estudios sobre aprendizaje animal han consistido en la búsqueda de principios generales a través de especies y paradigmas diferentes. Se parte del supuesto que existen esos principios generales, inspirándose en la idea darwiniana de que hay una continuidad evolutiva entre las especies, de tal manera que especies muy distintas aprenderían cosas muy diferentes utilizando un mismo mecanismo (Bitterman, 1988; Mcphail, 1987).

2.1 Tres niveles de aprendizaje

Cualquier fenómeno de aprendizaje tiene al menos una definición operacional implícita (Rescorla & Holland, 1976) que implica la observación de la vida del individuo en dos momentos. En un primer tiempo T1, el animal es expuesto a una experiencia que provoca un cambio en su estado (aprendizaje, o mas comprensivamente, memoria), que se refleja luego, en el tiempo de evaluación posterior T2 (1), por un comportamiento diferente al de aquellos animales que no tuvieron la misma experiencia en T1. Teniendo en cuenta este encuadre, es posible colocar los distintos tipos de aprendizaje a comparar en diferentes categorías. En un primer intento de clasificación general, se distinguen tres niveles de complejidad del proceso mnésico (Rescorla, 1988):

1.- Lo más primitivo que se puede aprender acerca de un estímulo, dice Rescorla, es que el estímulo existe. En este nivel elemental de aprendizaje, el procedimiento consiste en la simple presentación del estímulo al animal en tiempo T1, para medir luego el efecto de esa presentación al tiempo T2. El efecto de la presentación se mide como una disminución de la respuesta al estímulo. Este nivel corresponde a la **habituación**, definida como aquel

proceso durante el cual el animal aprende de la existencia de un objeto y sus propiedades.

2. - Para sobrevivir, los animales deben aprender mucho más que la simple existencia de estímulos individuales. Deben aprender algo de la estructura del entorno, es decir, las relaciones entre estímulos. En este nivel más alto de aprendizaje, el procedimiento consiste en la presentación a tiempo T1 de un estímulo en relación con otro u otros estímulos, para medir luego, a tiempo T2, el cambio producido en el animal por la presentación de aquella relación. El ejemplo más conocido de este tipo de aprendizaje es el **condicionamiento pavloviano o clásico**, en donde uno de los estímulos señala la ocurrencia del otro. El estímulo señal es llamado estímulo condicionado (**EC**) y el otro, estímulo incondicionado (**EI**), siendo este último el que evoca originalmente la respuesta incondicionada (**RI**). El resultado convencional es que a T2, el EC evoca, sin la presentación del EI, una respuesta condicionada (**RC**), similar a la RI.

3. - Finalmente, un organismo es capaz de aprender el impacto que sus propias acciones tienen sobre su ambiente. Una experiencia adecuada para producir este tipo de aprendizaje, es someter al individuo a una experiencia que le muestre la relación entre un estímulo y su propio comportamiento. En este marco, el estímulo es considerado como recompensa o refuerzo positivo en unos casos, como castigo o refuerzo negativo en otros. Cuando se establece este vínculo, se produce una modificación en la probabilidad de la respuesta durante el momento de la evaluación (T2), lo que comúnmente llamamos **aprendizaje instrumental**.

En pocas palabras, cuando describimos los procesos en una forma abstracta, ignorando las identidades de los estímulos y de los organismos, estos tres tipos de experiencias del individuo en el T1 con sus correspondientes modificaciones comportamentales en el T2, engloban a la mayoría de los comportamientos estudiados en procesos de aprendizaje analizados a nivel

experimental. La existencia de estos tres grandes "taxones" de una sistemática del aprendizaje, implica que los animales pueden adquirir tres tipos diferentes de información durante T1, a saber: información sobre un estímulo, sobre la relación del estímulo con el ambiente o sobre la relación del estímulo con los comportamientos propios del animal.

2.2 Tres preguntas sobre el fenómeno de aprendizaje.

Este esquema clasificatorio, lleva, a su vez, a precisar tres preguntas fundamentales acerca del fenómeno de aprendizaje que permitirían tipificar el fenómeno bajo estudio (Shettleworth, 1993^a).

Primero, ¿cuales son las condiciones del aprendizaje?, es decir, ¿qué experiencias en T1 son necesarias para producir los cambios comportamentales? Bajo el rótulo de "estudios sobre las condiciones del aprendizaje", se incluyen experimentos acerca de efectos del retardo, magnitud o calidad del refuerzo; extensión del intervalo EC-EI y del intervalo entre ensayos (i.e., *intertrial interval*); duración, calidad o intensidad del estímulo; y en general todo intento dirigido a especificar cuantitativa o cualitativamente lo que los psicólogos experimentales llaman, genéricamente, "leyes del aprendizaje".

Segundo, ¿cuales son los contenidos del aprendizaje? Los estudios sobre el contenido del aprendizaje se proponen caracterizar las estructuras hipotéticas que representan asociaciones o los cambios de estado producidos por la exposición a las condiciones del aprendizaje. Es aquí donde la psicología experimental se emparenta con los estudios mecanísticos de la memoria sin perder su condición de disciplina de análisis comportamental. Entre los ejemplos mas ilustrativos de este tipo de esfuerzo, cabe mencionar la SOP (*standart operating procedures*), postulada por Whitlow y Wagner (1984). El modelo considera que el individuo bajo estudio puede entenderse como un sistema de comunicación que implica un dispositivo codificador de estímulos

(registro-sensorial) y un decodificador (generador de respuesta). Estos están unidos por distintos componentes, entre ellos, una estructura de conocimiento (sistema de memoria) para la representación de la experiencia pasada. En consonancia con varias postulaciones teóricas previas (e.g. Anderson & Bower, 1973; Schiffrin & Schneider, 1977), el sistema de memoria es conceptualizado como una red de unidades representacionales, o nodos de memoria, interconectados por lazos asociativos direccionales. El SOP supone que cualquier estímulo efectivo, a través de la codificación en el registro sensorial, activará el nodo de memoria correspondiente. Este proceso representacional no es considerado dependiente del aprendizaje, pero lo que si depende de la experiencia previa son los lazos (*linkages*) entre nodos, de tal manera que la activación de un nodo puede expandirse a otro u otros nodos.

Tercero, ¿cuales son los efectos del aprendizaje sobre el comportamiento?. La respuesta a esta pregunta implica el estudio de cambios en el comportamiento debidos a la experiencia en T1. En este aspecto, los esfuerzos de la psicología experimental se han dirigido a distinguir claramente entre aprendizaje y rendimiento (*learning vs. performance*). Cambios en el comportamiento pueden no implicar un proceso de aprendizaje (solo como ejemplos: Grether & Evans 1966; Razran, 1971) y a la inversa, el aprendizaje puede darse sin manifestación comportamental, como lo ilustran los casos de habituación sin respuesta (Applewhite, Gardner & Lapan, 1969; Peeke & Veno, 1976) y la posibilidad de adquirir HLT Chasmagnathus sin que haya respuesta de escape durante el entrenamiento, debido a que el cangrejo está bajo el efecto inhibitorio de GABA administrada por vía sistémica (Tomsic, Rakitin & Maldonado, 1991).

2.3 El hecho inicial pareció ser un caso mas de habituación clásica.

En base a este encuadre teórico y esquema clasificatorio, pareció razonable suponer que el fenómeno descrito como **hecho inicial** encuadraba en el tipo de aprendizaje del estímulo, es decir, que se trataría de un fenómeno de habituación. Esta clase de aprendizaje, aunque tardíamente aceptado como

caso mnésico (Davis, 1972), ha sido uno de los primeros en ser investigado — las primeras descripciones de habituación son de fines del siglo XIX (Christoffersen, 1997). Thorpe (1950) la definió como “ una actividad del sistema nervioso central por medio de la cual una respuesta innata ante algunos estímulos relativamente simples, especialmente aquellos de valor como aviso de peligro, decae mientras los estímulos continúen por un largo período sin resultados desfavorables”. En otra ocasión, el mismo Thorpe (1963) hizo hincapié en el hecho que el proceso implica la eliminación de una respuesta del repertorio de comportamientos, y luego, esta idea fue apareciendo de una u otra forma en las definiciones de otros autores. Así se describió a la habituación como “aprender a no hacer” (Razran, 1971), “cese de respuestas” (Treisman, 1984) o “adaptación al significado decreciente de un estímulo “ (Braun & Bicker, 1992). Thompson y Spencer (1966) hicieron una memorable revisión de trabajos sobre habituación en muy diversas especies y durante un extenso período de tiempo, establecieron una lista de lo que denominaron las condiciones paramétricas de la habituación. Entre ellas se destaca la caída de la respuesta al estímulo según una exponencial negativa; la recuperación de la respuesta con la extensión de un período sin estimulación; el hecho que la habituación depende de la presentación del estímulo y no de la emisión de la respuesta (deducida de la condición paramétrica “habituación sub-cero”); y la estímulo-especificidad. En base a estas condiciones, Peeke (1984) acuñó una definición mas comprehensiva: “la habituación es la disminución relativamente permanente de una respuesta como resultado de la repetida o constante estimulación; la caída de la respuesta es específica del estímulo original, y puede ser reinstalada por otro estímulo igualmente fuerte”.

Sin embargo, otras condiciones paramétricas resultaron desmentidas por muchos trabajos experimentales, como aquella según la cual la habituación estaba directamente relacionada con la frecuencia e inversamente con la intensidad (Davis & Wagner, 1968; Davis, 1970). Debido a esto y a otras observaciones, así como a la falta de discriminación entre habituación a corto y largo término, se postuló la teoría dual de la habituación (Groves & Thompson

1970; Groves & Thompson, 1973). Según esta teoría, la presentación iterativa de un estímulo provoca dos procesos, uno decremental que involucra a una vía estímulo-respuesta (habitación propiamente dicha); y otro incremental que involucra al estado del animal (sensibilización); de manera tal que la resultante de esos dos procesos es una curva respuesta- vs.- ensayo que representa la habituación a la respuesta.

Los trabajos iniciales del Laboratorio vinieron a apoyar experimentalmente la idea de que estábamos tratando con un proceso de habituación, puesto que demostraron: a) que la caída de la respuesta habituada no se debe a adaptación sensorial, fatiga motora o daño emergente durante el entrenamiento (Brunner & Maldonado, 1988; Rakitin, Tomsic & Maldonado, 1991); b) que la habituación es estímulo-específica (Lozada et. al, 1990; Lozada, 1993); c) que la habituación depende de la presentación del estímulo pero no de la emisión de la respuesta (Tomsic et. al., 1991). Dado que tanto en los trabajos anteriores a esta Tesis, así como, parcialmente, en los que se exponen en la presente Tesis, se usó el método de la psicología experimental y el encuadre teórico de lo que hemos llamado “método de la psicología experimental”, Corresponde un repaso crítico de esta metodología.

2.4 Virtudes y debilidades del “método de la psicología experimental”.

Entre las principales virtudes, cabe destacarse la rigurosidad en el control experimental, así como la aplicación del análisis estadístico en el tratamiento de los datos. Junto a ellos, un mérito mayor ha sido la apertura hacia el estudio mecanístico del proceso mnésico. Como vimos antes, el estudio del contenido del aprendizaje, aunque haya sido hecho desde una aproximación de “caja negra” y sobre bases especulativas, significa una mirada hacia los posibles mecanismos que sirven a la memoria. De ahí entonces que esos estudios se puedan colocar en la cadena de aproximaciones de lo que suele llamarse la estrategia *top-down* (como contrapuesta a la estrategia *bottom-up*) en la investigación sobre el tema

(Morris, 1994). Finalmente, ha sido notable la creación de un gran número de diseños prototípicos, así como la definición de términos y clases de aprendizaje, lo que ha venido a favorecer la comunicación entre investigadores que trabajando sobre memoria pertenecen a diversos campos de la ciencia.

La mayoría de las limitaciones señaladas para estudios con este método, pueden considerarse resultantes de la ausencia o déficit del componente biológico en el análisis comportamental. Muchos trabajos resultan "*nature blind*" (Nadel, 1995), o sea parten de situaciones experimentales "que no guardan relación con lo que el animal hace para sobrevivir y prosperar en el mundo real" (Eichenbaun, 1990). Se puede enseñar a una rata a presionar una palanca para obtener alimento y a saltar fuera de una caja para evitar un choque eléctrico, pero no a la inversa (Timberlake & Lucas, 1989). El laberinto acuático de Morris es ampliamente usado en estudios de aprendizajes basados en el procesamiento de información visuo-espacial durante horas de luz, pero se utilizan roedores como animales experimentales, es decir animales nocturnos, de poca agudeza visual pero excelentes capacidades olfatorias (Lee, 1998). La situación es aún más singular en estudios con individuos transgénicos sobre mecanismos moleculares de aprendizaje, donde se trabaja con ratones en lugar de ratas debido a la gran información que se tiene acerca de su genoma, y se evalúa su desempeño en el laberinto acuático de Morris, aunque los ratones no están adaptados al medio acuático y revelan por lo tanto muy baja capacidad mnésica en este test (Gerlai & Clayton, 1999). En un trabajo ya clásico, Breland y Breland (1961) han documentado en vertebrados, con muchos ejemplos, que es imposible obtener aprendizaje si los estímulos involucrados no son biológicamente relevantes, pese a que se "cumplan" todos los requisitos del aprendizaje asociativo.

Resulta interesante destacar que estas observaciones sobre la relación entre capacidad mnésica y tipo de vida, habían sido hechas muy anteriormente por biólogos que estudiaban ejemplos de memoria en crustáceos, sin que sus conclusiones fueran jamás consideradas ni citadas en los numerosos estudios realizados por psicólogos experimentales. Así, Bock encontró, ya en 1942, que mientras el isópodo territorial *Porcellio* puede aprender un hábito de posición

tanto en un laberinto en T horizontal como en un uno vertical, el isópodo de agua dulce puede aprender únicamente un laberinto en T horizontal, lo que sugería fuertemente una relación entre capacidad mnésica y comportamiento específico. Y aun previamente, en 1927, Agar informó sobre la imposibilidad de entrenar a *Daphnia* o *Simiocephalus* en el aprendizaje de un laberinto en T, a pesar de dar 300 ensayos con un choque eléctrico como castigo, lo que se compagina con la idea de que el aprendizaje de una respuesta de posición no tendría significado adaptativo en animales planctónicos. Se ha observado que los camarones (e.g. *Procamburus clarkii*) son expertos en huir de un adversario o evitar un obstáculo mediante la contracción y extensión rítmica de su abdomen (Krasne, 1973; Lindberg, 1955), pero, curiosamente, no usan tal habilidad para dirigirse hacia una fuente de comida. Por lo tanto, no es sorprendente que estos animales muestren en este aspecto una notable compartimentalización de la capacidad mnésica, es decir, aprenden a escaparle a un determinado estímulo pero no a nadar hacia una fuente de alimento (e.g. Schone, 1961; Krasne, 1973).

Finalmente, debe decirse que la nómina de tipos de aprendizaje y sus definiciones, debe considerarse como una lista no exhaustiva de tipos mas generales, no siendo indispensable que cada nuevo caso de aprendizaje que se describa sea colocado en alguna de esas categorías. Así, no hay acuerdo sobre la clase a la que pertenecería el *imprinting* (Shettleworth, 1994) o la imitación (Whiten & Ham, 1992).

En conclusión, el uso del “método de la psicología experimental”, tal como lo hemos definido, es indispensable en estudios sobre aprendizaje y memoria, constituyendo la herramienta fundamental del análisis comportamental. Sin embargo, el análisis comportamental debe integrarse con una aproximación biológica, de manera de constituir en su conjunto la “aproximación sintética al aprendizaje” (Shettleworth, 1994), sin la cual los estudios sobre estos temas “han perdido frecuentemente el rumbo y lo seguirán perdiendo en el futuro” (Nadel, 1995). Así, deben incluirse como temas de análisis el valor adaptativo de la capacidad mnésica bajo estudio, la relevancia biológica de los estímulos propuestos en el paradigma experimental y la

viabilidad biológica de la tarea que se propone que el animal aprenda; en síntesis, “tener en cuenta como el paradigma toma contacto con el repertorio de respuestas y adaptaciones del animal “ (Kamil & Maudlin, 1988).

Finalmente, es necesaria una última consideración metodológica en estudios sobre memoria. Puede decirse que los trabajos del Laboratorio han seguido un camino de investigación que va desde el nivel mas integrado (caracterización del proceso mnésico) hasta los niveles celular y molecular, recorriendo aproximaciones farmacológicas, electrofisiológicas, de localización anatómica, bioquímicas y de la Biología molecular. Esta sería la estrategia *top-down* de la que habla Morris (1994), y que tiene muchos ejemplos de ser un camino apropiado. Entre otros, los cuidadosos estudios comportamentales sobre *imprinting* filial (Bateson, 1976) seguidos por la investigaciones de Horn, Bateson y Rose (ver Horn, 1985) dirigidas a dilucidar el substrato neural del fenómeno mnésico. Pero existe una via opuesta a la descrita, la denominada estrategia interactiva o *bottom-up*. Se inspira en el supuesto de que todo fenómeno mnésico implica cambios a nivel sináptico, es decir, que la plasticidad sináptica esta causalmente involucrada en alguna, o toda forma de aprendizaje. Por lo tanto, el paso inicial que se propone es el estudio de un fenómeno de plasticidad sináptica (e.g. *long-term potentiation* en el hipocampo de ratas) y de ahí , ir hacia niveles mas altos de integración (e.g., el mecanismo neural o el aprendizaje visual-espacial en el laberinto de Morris). Cabe señalar, sin embargo, el riesgo de este camino, ya que el tipo particular de plasticidad sináptica elegida puede no tener significado funcional alguno a nivel mnésico. Este es uno de los temas mas controvertidos en los estudios actuales sobre memoria (Cain, Hargreaves, Boon & Dennison, 1993; Jeffery & Morris, 1993; Korol, Abel, Church, Barnes & Mc Naughton, 1993). El caso podría ilustrarse con aquella clásica analogía de Gould y Lewontin (1979) acerca de las explicaciones adaptacionistas, y decir entonces con Morris (1994) que puede no haber correspondencia entre plasticidad y memoria, “de la misma manera que los *spandrels* de San Marco no tienen relación funcional alguna con los arcos que enmarcan” (1).

3. Modelo canónico de la habituación y modelo de memoria a largo término de *Chasmagnathus*: peculiaridades y contradicciones.

Cuando se profundizó el estudio de la habituación de *Chasmagnathus*, y se comparó sus características con las señaladas por otros autores para ese tipo de aprendizaje en otras especies y paradigmas, llamó la atención algunas peculiaridades del proceso en el cangrejo, ya sea por la excepcionalidad de los valores que se registraban, así como por el hecho que de alguna de sus propiedades estaban en contradicción con lo que prevé el modelo canónico de habituación.

3.1 Como se explicó en la Sección anterior, los primeros resultados experimentales del Laboratorio apoyaron la idea de que el fenómeno básico descrito para *Chasmagnathus* (Fig. 1) es un caso de habituación— mas precisamente como un caso de habituación a “largo término” (HLT). Se denomina así al proceso en el que se forma una respuesta habituada a través de mas de una sesión, como contrapuesto al proceso que forma la respuesta habituada en una misma sesión (habituación a “corto término”, HCT). Cuando se trata de solo dos sesiones de presentación, la HCT de la primera sesión la identificamos con el entrenamiento (T1) y la segunda (HLT) con la sesión de evaluación (T2) **(2)**. Se suele distinguir (Christoffersen , 1997) dos tipos de HCT: el tipo de “habituación lenta” donde la caída del 50% se alcanza recién

(1): Esta metáfora es usada con alguna frecuencia en discusiones acerca de la relación causal entre dos fenómenos. Los *spandrels* son espacios que resultan del encuentro de dos arcos, y que se han usado para memorables desarrollos iconográficos en el caso de la Basílica de San Marco. El error estaría en concentrarse (perderse) en el análisis detallado de la compleja iconografía cuando se trata de un estudio sobre la causalidad estructural de la Basílica.

(2): Preferimos usar el término *evaluación* en lugar del anglicismo *testeo*.

luego de los 100 estímulos y los modelos de "habitación rápida" donde la caída al 50% de amplitud de la respuesta se obtiene entre el quinto y décimo estímulo. Entre los primeros pueden mencionarse el reflejo de recogimiento del bíceps femoral en ratas (Griffin & Pearson, 1968) o la retracción del tentáculo en Helix (Christoffersen, 1992); mientras que en los segundos se puede mencionar la habituación del reflejo del sifón de Aplysia (Carew, , Pinsker & Kandel, 1972) o la respuesta de escape de Lebistes (Russell, 1967). No hay duda que la HCT de Chasmagnathus entraría en el segundo tipo, donde se acumula el mayor número de ejemplos de la bibliografía, incluyendo la primera descripción de una habituación, aquella de Peckham y Peckham (1887) bajo el título de "Algunas observaciones sobre los poderes mentales de las arañas". Por lo tanto, no existiría nada muy peculiar en la HCT de Chasmagnathus, sin embargo, cuando consideramos la rapidez de la HCT junto con la perdurabilidad de la respuesta habituada, concluimos que la HLT reúne propiedades excepcionales.

El resultado presentado en la Fig.1 demostró ser altamente reproducible, ya que invariablemente se encontró que 15 ensayos con un intervalo de 171 seg. producía una robusta retención a las 24 horas, siempre que se usara un número no menor de 30 individuos por grupo y que los experimentos se realizaran entre Diciembre y Julio, es decir, excluyendo los meses de la primavera, donde los niveles de reactividad de los animales ante el estímulo de peligro es generalmente muy bajo. El límite de 15 ensayos e ITI = 171 seg. no parecía ser estricto, ya que también era muchas veces posible obtener esa retención a largo término disminuyendo el entrenamiento a solo 10 o acortando el ITI a solo 36 seg. (Lozada, 1993). Además, una serie de observaciones sugerían que el período de retención podía ir mucho mas allá de las 24 horas. Este conjunto de resultados llevaron a concluir que con pocos estímulos (durante un tiempo total de 10 minutos) era posible demostrar una buena retención después de un período mayor a las 24 horas. Semejante prontitud en la adquisición de una respuesta que perduraba por tanto tiempo no tenía antecedentes en la bibliografía del tema, especialmente tratándose de artrópodos. Es más frecuente hallar estas características entre casos de

aprendizaje asociativo, como en el ejemplo extremo de “un ensayo, un aprendizaje” (i.e., *one trial, one learning*; Ng & Gibbs, 1991) que en procesos de habituación.

En este estado del análisis, parece razonable preguntarse: ¿es posible que una HLT con esas características extremas pueda darse en condiciones naturales? ¿es posible que la breve presentación de un estímulo de peligro desarme tan fácilmente y por tanto tiempo una respuesta defensiva crucial para la supervivencia del animal? Debe advertirse sin embargo que la HLT de Chasmagnathus es altamente específica (Lozada et. al, 1990; Lozada, Tesis, 1993), como lo demostró el hecho que si el mismo estímulo de peligro presentado con un tipo diferente de movimiento, se restablecía la respuesta de escape con su magnitud inicial. De todos modos, si bien la estímulo-especificidad disminuye los riesgos de una respuesta habituada prolongada, cabe preguntarse qué exigencia de la presión de vida viene a satisfacer esta capacidad mnésica demostrada por Chasmagnathus, o en términos mas corrientes, cual será el valor adaptativo que esas peculiaridades de la HLT tienen para Chasmagnathus. El Laboratorio intentó responder a esta pregunta con una extensa investigación sobre el tema (Tomsic, Massoni & Maldonado, 1993; Tomsic, Tesis 1993), partiendo de las siguientes premisas. Primero, una aproximación válida para dilucidar el valor adaptativo de una determinada propiedad es estudiarla en especies filogenéticamente cercanas y ecológicamente distantes (Domjan & Galef, 1983); segundo, cuanto mayor es la ambigüedad en significado de un estímulo, mayor es el grado de habituación a ese estímulo (Fantino & Logan, 1979). Se hizo entonces un estudio idéntico, i.e., usando el mismo recurso experimental, el mismo estímulo iterativo y el mismo paradigma, sobre habituación en Chasmagnathus granulatus y en Pachygrapsus marmoratus. Estas especies tienen una estrecha relación filogenética — ambas pertenecen a la familia Grapsidae— y ambos son cangrejos corredores semiterrestres que despliegan una respuesta de escape similar. Por el contrario, son claramente dispares en lo que se refiere a las condiciones ecológicas impuestas por sus respectivos hábitats. Chasmagnathus es un cangrejo de estuario que vive sobre un sustrato fangoso

blando y se refugia en cuevas que él mismo construye; en tanto que Pachygrapsus es marino, vive sobre un sustrato de roca sólida y busca refugio en las grietas y cavidades de las piedras. Chasmagnathus vive en un entorno de objetos y sombras móviles — una populosa comunidad de *Spartinas* muchas veces agitadas por el viento y una densa presencia de co-específicos que se desplazan. En contraste, Pachygrapsus vive relativamente aislado, ocupando un terreno rocoso desprovisto de vegetación halófila, es decir habitando un biotopo desnudo en comparación al de Chasmagnathus. Es esta última disparidad ecológica la que permite suponer que un objeto o sombra pasante pueda tener para Pachygrapsus un significado menos ambiguo (= es un predador) que para Chasmagnathus (= es un predador o el movimiento de otro cangrejo o de la vegetación). La diferencia en niveles de ambigüedad, explicaría el hecho que Pachygrapsus necesite muchos mas estímulos para la HCT (seria un caso de “habitación lenta”, dentro de la dicotomía de Christoffersen, 1997, en contraposición a la “habitación rápida de Chasmagnathus), que adquiriera una HLT débil, que apenas alcanza las 24 horas. La notable diferencia en capacidades mnésicas entre especies, es explicada por el autor (Tomsic, Tesis 1993) de esta manera:

“Cuando Chasmagnathus se enfrenta reiteradamente y sin consecuencias con un estímulo visual de peligro, esto significa, conforme a lo que resulta de la historia natural de la especie, que ese estímulo no comporta riesgo y que puede abolirse la respuesta de escape en esas condiciones, lo que le permite ahorrar tiempo y esfuerzos; por el contrario, la historia natural de Pachygrapsus, para quien un objeto pasante es muy probablemente un predador, le determina un sostenido nivel de reactividad ante un estímulo visual iterativo de peligro y le impide así la habituación, permitiéndole mantenerse a salvo de sus enemigos”.

3.2 Hemos recordado que conforme a una concepción corriente entre los psicólogos experimentales (Rescorla, 1988) la habituación se encuadra en el nivel mas básico de complejidad de un proceso mnésico, dentro de la

clasificación en tres categorías propuestas. De acuerdo a ese encuadre, durante la habituación, el animal solo aprende la existencia del estímulo, lo que implica el reconocimiento de algunas o muchas de sus propiedades. Es decir, el concepto primigenio de habituación excluía de ella tanto el aprendizaje de las relaciones del estímulo habituante con otros estímulos o eventos, sino, fundamentalmente, cualquier aprendizaje del contexto. Versiones posteriores fueron mitigando la exclusión del contexto (Korn y Moyer, 1966; Marlin y Miller, 1981), culminando con la teoría asociacionista de la habituación (Wagner, 1976, 1978, 1979) que acepta al contexto como estímulo condicionado en la habituación a largo termino. Sin embargo, la renuencia a aceptar que las claves tópicas del entorno influyen de alguna manera sobre la habituación al estímulo fásico, ha sido una noción recurrente en estudios sobre habituación (Leaton, 1974; Castellucci & Kandel, 1976).

La posibilidad de un aprendizaje **solo-estímulo** pareció no conciliarse con las ideas de muchos biólogos que aunque participaban apenas incidentalmente en estudios sobre memoria, entendían que el contexto debía ser inescapable a cualquier proceso mnésico. Así, ya por los años 50, estudios sobre la habituación de la respuesta de contracción en poliquetos tubícolas, habían destacado el papel significativo de los eventos que acompañaban al estímulo fásico de peligro (un estímulo mecánico). Clark (1960, a, b) puso de relieve la influencia del contexto sobre la habituación en poliquetos; y Nicol (1950) destacó la diferencia comportamental entre dos especies de Nereis sp. , una que habita una región intertidal, rocosa y con algas, y la otra una región de estuario desprovista de vegetación. La primera especie, de contexto cambiante, se habitúa rápidamente y por mas tiempo al paso iterativo de una sombra, mientras que la segunda especie, de contexto sin alteraciones frecuentes, presenta un proceso mas lento y menos persistente. Nicol concluía enunciando lo que parece algo muy lógico cuando el análisis se hace desde la vida natural, específicamente, que el animal puede estimar correctamente el riesgo señalado por la presentación repetida de un estímulo de peligro, relacionándolo con el entorno en el que el estímulo se presenta, ya que "estímulos que en un contexto son inocuos, en otros son potencialmente peligrosos"

La contradicción entre estos puntos de vista y el que formula la teoría canónica de la habituación, llevaron a investigar cuál sería el peso del contexto sobre la retención de la respuesta habituada en Chasmagnathus. Se demostró (Tomsic, et. al., 1993) que el proceso que llamamos habituación era contexto-específico, ya que si el contexto durante el entrenamiento no era igual al que se usaba en la evaluación, había una significativa pérdida de retención.

Una segunda e importante contradicción con la idea del aprendizaje **solo-estímulo**, vino de otro trabajo del Laboratorio, demostrando que la retención de la respuesta habituada era circadiana-específica. Es decir, la HLT de Chasmagnathus era afectada cuando se entrenaba a los cangrejos durante la fase de luz del día y se los testeaba en la faz oscura, o vice-versa. Se concluyó, entonces, que durante el entrenamiento no se almacena solo información acerca del estímulo de peligro, sino también sobre la fase del día (Pereyra, de la Iglesia & Maldonado, 1996).

Estas peculiaridades del modelo de memoria de largo término en Chasmagnathus (i.e., facilidad para adquirir una respuesta habituada de larga duración), así como su especificidad contextual y circadiana, nos llevaron a cuestionar si el proceso mnésico bajo estudio era realmente un caso identificable con el concepto clásico de habituación. Y se decidió, entonces, estudiarlo mas profundamente, siguiendo las líneas de investigación que se detallan en la Sección siguiente.

4. Tres propiedades de todas las memorias.

Con el propósito enunciado, es decir, profundizar el estudio de la habituación a largo término de Chasmagnathus, nos propusimos en la presente tesis investigar la relación entre este proceso mnésico y lo que se consideran las tres propiedades universales de cualquier tipo de memoria.

4.1. La consolidación de la memoria depende de la síntesis de proteínas.

Desde los moluscos a los humanos, el electro-choque convulsivo, los anestésicos o los inhibidores de la síntesis de proteínas, producen amnesia retrógrada, es decir, enlentecen o bloquean la consolidación de la memoria (e.g. Ribot, 1892; Glickman, 1961; Erber, 1976; Quinn y Dudai, 1976; Maldonado, 1980; Jaffé, 1980; Riccio y Ebner, 1981; Nagy y Martin, 1993; Botzer, Markovich y Susswein, 1999). Los resultados obtenidos con inhibidores como cicloheximida o anisomicina, han conducido a la conclusión de que la consolidación de la memoria es dependiente de la síntesis de proteínas (e.g., Flood , Bennett, Orme & Jarkiv,1977; Squire, Davis & Spanis,1980; Rosenzweig, Bennett, Lynch, Mc Gaugh & Weinberger, 1984). Esta idea está de acuerdo con una noción muy extendida entre los neurobiólogos, aquella que considera a la consolidación de la memoria como el resultado de cambios estructurales en la morfología sináptica (e.g. Greenough, 1984; Bailey & Kandel, 1994).

4.2. La retención de la memoria depende de un período de consolidación que sigue al entrenamiento o se inicia ya durante el entrenamiento.

Inmediatamente luego de una sesión de entrenamiento, la memoria existe en forma inestable y de breve término, fortaleciéndose a través de un proceso fisiológico muy activo que identificamos como consolidación y que conduce a una etapa de memoria estable y de larga duración (James 1890; Mc Gaugh & Hertz, 1972, Squire, 1987; Menzel, Hammer & Maueslshagen, 1990). La extensión del período de consolidación varía con la especie, la tarea aprendida, el paradigma experimental y hasta con el agente amnésico que se usa para estimarla (Rose & Jork, 1987; Squire & Davis, 1975).

4.3.- El nivel y duración de la retención de la memoria depende del intervalo entre los ensayos de entrenamiento.

Desde experimentos realizados hace más de un siglo (Ebbinhaus, 1885), se viene apreciando que el entrenamiento espaciado, i.e., con intervalos entre

ensayos significativos, produce una retención mayor y mas duradera que el entrenamiento masivo, i.e., sin intervalo entre ensayos o con intervalos extremadamente breves (Carew, et al., 1972; Hintzman, 1974; Frost, Castellucci, Hawkin & Kandel, 1985). Además, estudios más recientes, han demostrado que fases diferentes en formas de memoria multi-fásicas son afectadas diferencialmente por diferentes espaciamientos entre ensayos. Por ejemplo, la memoria de la evitación a un olor en Drosophila consiste de dos componentes de memoria funcionalmente independientes, a saber, una memoria resistente a la anestesia (MRA) que decae dentro de los 4 días y que puede ser obtenida tanto por entrenamiento masivo como espaciado, y una memoria de larga duración, únicamente obtenida por entrenamiento espaciado, ya sea junto a la MRA o independientemente de ella (Tully, Preat, Boyton & DelVecchio, 1994). En el condicionamiento del reflejo de extensión de la probosis en abejas, la estabilidad de la memoria larga depende no monotónicamente del intervalo entre los ensayos de entrenamiento, puesto que intervalos de 20 y 1 minutos, pero no de 3 minutos o 30 segundos, resultan en una retención estable (Gerber, Wustenberg, Schutz & Menzel, 1998). Los ratones mutantes CREB muestran déficits de memoria a largo término en el condicionamiento contextual de miedo, usando el laberinto acuático de Morris, pero su capacidad mnésica aparece completamente restablecida cuando se extiende el intervalo entre ensayos de entrenamiento (Kogan, Frankland, Blendy, Coblenz, Marowitz, Schutz & Silva, 1996).

Nuestra propuesta es que estudiando en qué medida esos principios aparentemente universales, se confirman en el modelo de memoria estudiado en Chasmagnathus, obtendremos una mejor caracterización y definición del proceso mnésico.

5.- Chasmagnathus como modelo para el estudio de procesos de aprendizaje y memoria. Sus ventajas para la caracterización del fenómeno a nivel farmacológico.

Finalmente, y antes de la formulación concreta del objetivo de este trabajo, resulta pertinente distinguir los méritos de Chasmagnathus como modelo experimental, es decir, destacar las características comportamentales y fisiológicas que lo hacen especialmente adecuado para estudios sobre memoria y aprendizaje.

a) Un considerable progreso en el conocimiento del fenómeno mnésico se ha logrado a través de estudios con "invertebrados", elegidos por considerarlos sistemas simples de memoria (e.g., los moluscos Aplysia (Carew, et. al, 1972; Kandel & Schwartz, 1982) y Hermisenda (Alkon, Bank, Natio, Chung, Ram & Rasmusen, 1987; Crow & Forrester, 1990); la mosca de la fruta Drosophila (Tully, et.al. 1994); y la abeja Apis (Hammer & Menzel, 1995), aunque el término simple ha sido motivo de alguna controversia. Así, el sistema nervioso de esos invertebrados no puede considerarse simple desde la perspectiva de un investigador de una red neuronal, ya que la cantidad de neuronas involucradas en un proceso mnésico, aún el más sencillo, es mucho mayor que aquel requerido para obtener una descripción satisfactoria del circuito subyacente. Por ejemplo, el sistema nervioso de Aplysia contiene aproximadamente 20.000 neuronas, y cientos, si no miles de ellas, son probablemente activadas durante el condicionamiento clásico de los reflejos de contracción de las branquias o del sifón de Aplysia (Glanzman, 1995). Sin embargo, el nivel de complejidad de los invertebrados usados hasta la fecha como sistemas de memoria, es mucho más bajo que el de los vertebrados, de tal manera que los mecanismos básicos que sirven la memoria resultan metodológicamente mucho más accesibles. Puede tenerse una idea acerca de la menor complejidad del sistema nervioso de Chasmagnathus, mencionando las estimaciones en número de neuronas para el cerebro medio de un decápodo oscilan alrededor de 70.000 (Wirmsma, 1953).

b) La respuesta de escape de Chasmagnathus, como la de otros cangrejos corredores que viven en hábitats semiterrestres, es una respuesta

nítida, cuantificable, y fácilmente provocable por estímulos de diversa modalidad sensorial (i.e., visuales o táctiles; Rakitin et al, 1991).

c) Chasmagnathus parece soportar muy bien la manipulación farmacológica, no revelando mayores perturbaciones inespecíficas luego de las maniobras necesarias para la administración de drogas. Una peculiaridad notable en este aspecto, es que las dosis efectivas para compuestos que son administrados por vía sistémica, resultaron claramente más bajas que las dadas en vertebrados [e.g. angiotensina II (Delorenzi, Pedreira, Romano, Pirola, Nahamod & Maldonado, 1995); enkefalina (Godoy & Maldonado, 1995), serotonina (Aggio, Rakitin & Maldonado, 1996), activadores e inhibidores de PKA (Romano, Delorenzi, Pedreira, Tomsic & Maldonado, 1996 a; Romano, Locatelli, Delorenzi, Pedreira & Maldonado, 1996)]. La relativa simplicidad de la organización del cerebro y la falta de una barrera hemato-encefálica endotelial en cangrejos (Abbott, 1970), juntamente con el hecho que la hemolinfa es distribuida totalmente a través de una extensa red de capilares en varias áreas de neuropilos (Abbott, 1992; Roskoski, 1983), podría explicar el bajo umbral para la acción de las drogas en Chasmagnathus.

d) Existe un buen conocimiento acerca de la organización de aquellas partes del sistema nervioso de crustáceos que pueden suponerse están implicadas en el proceso mnésico que estudiamos. Baste recordar que la circuitería neuronal que sirve a la respuesta de escape del *crayfish* (*Procambarus clarikii*), así como a aspectos básicos de la habituación de esa respuesta, constituye uno de los circuitos neuronales mejor conocidos en el reino animal (ver revisión en Edwards, Keitler & Krasne, 1999). Por otro lado, ya tempranamente, Wiersma (1966, 1967, 1967a) había logrado describir, a través del registro electrofisiológico de potenciales evocados, describir la topografía funcional del ojo, clasificando las células de acuerdo al tipo de estímulo lumínico al que respondían y a su campo receptivo. Nalbach (1990) realizó registros electrofisiológicos de potenciales evocados por objetos en aproximación, en el cuerpo celular en distintas regiones del lóbulo óptico,

llegando a identificar las “células reflejantes” (*looming cells*, Horridge, 1986) que poseen la capacidad de habituarse durante la estimulación repetida, recuperando su respuesta cuando el objeto se aproxima desde un área diferente (Nalbach, 1990; Glantz, 1977). Estos y otros antecedentes (como los trabajos funcionales de Wood y Glantz sobre el procesamiento por interneuronas visuales en el cerebro de *Procambarus*; Wood & Glantz 1980^a, b), apuntalan en el Laboratorio la línea de trabajos electrofisiológicos en Chasmagnathus, los que han demostrado la posibilidad de obtener preparaciones óptimas, habiendo ya identificado neuronas en el lóbulo óptico detectoras de movimiento con modelos de habituación característicos (Tomsic, datos no publicados).

e) Un gran número de Chasmagnathus pueden ser recogidos en un solo esfuerzo de captura, durante prácticamente todo el año, con excepción de días de invierno en los que la temperatura del agua resulta inferior a los 10 °C. Los cangrejos pueden ser mantenidos fácilmente en el Laboratorio en cubas de agua marina no circulante, renovable cada 2 días, por períodos de hasta 20 días sin variaciones observables en las variables comportamentales bajo estudio.

f) En base a la confiabilidad del paradigma de memoria usado y las modalidades de la respuesta de escape antes señaladas, se pudo diseñar y construir un recurso experimental de comando y registro totalmente automático que permite trabajar simultáneamente con 40 cangrejos Chasmagnathus (descripción del equipo en el Capítulo 2 de esta Tesis). No es superfluo destacar la importancia del uso de un recurso automatizado cuando se trata de experimentos sobre aprendizaje. Los efectos de la presencia del experimentador sobre el comportamiento de un animal, se convirtió en un tema de gran importancia, desde que Oskar Pfungst reveló que el “inteligente” caballo Hans (*clever Hans*) era guiado en sus demostraciones de memoria por claves muy sutiles que le daba involuntariamente su entrenador (Pfungst, 1911). Este fenómeno, es decir, el cambio en el comportamiento de un animal

por claves suministradas por el experimentador, conocido como *cuing* en la literatura, ha quitado validez a muchas conclusiones obtenidas por pruebas de laboratorio en trabajos sobre aprendizaje y cognición (e.g. Rosenthal, 1974, 1977; Chevalier-Skolnikoff, 1981; Rosenthal, 1981; Sebeok, 1981; Sulliman, 1992). La necesidad de eliminar la posibilidad del *cuing* aparece garantizada por un recurso automatizado, dado que evita la confusión entre observador y sujeto observado (Caine, 1990; Fentres, 1992).

6. Objetivo

El objetivo de la Tesis es profundizar en la caracterización del proceso de memoria que resulta de la presentación iterativa de un estímulo de peligro al cangrejo Chasmagnathus granulatus. Para tal propósito, se conducen estudios dirigidos a determinar en el proceso mnésico bajo estudio, la perdurabilidad de la retención, la sensibilidad a inhibidores de la síntesis protéica, la fase de consolidación; y el efecto de la variación de distintos parámetros, como número de ensayos, frecuencia de estimulación y alteraciones en el contexto.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS GENERALES

1. Animales, obtención y mantenimiento en el laboratorio

Los sujetos experimentales empleados en esta Tesis son machos de la especie Chasmagnathus granulatus. Este cangrejo semiterrestre habita la zona costera desde el sur de Brasil, Uruguay y Argentina, ocupando los bancos de limo mesolitoral y supralitoral de la zona de transición de agua dulce y marina. En nuestro caso, los animales son capturados es en las rías de San Clemente del Tuyú , Argentina y transportados luego al laboratorio, en gabinetes diseñados para tal fin. Las recolecciones se realizan durante todo el año cada veinte días, aproximadamente.

En los experimentos se utilizan animales de entre 2.6-3.0 cm. de ancho de caparazón; el peso húmedo promedio de esta categoría de tamaño , calculado sobre una muestra de 60 animales es de 15gr (ESM 0.2). En el laboratorio, los cangrejos son alojados en cubas plásticas (35 x 48 x 27 cm.) con un fondo de agua 2 cm de profundidad, a razón de 30 animales por tanque. El agua utilizada en las cubas de mantenimiento y en los otros contenedores utilizados en los experimentos, es preparada con sal marina para acuarios hw-Marimex (Winex-Alemania) con una salinidad de 10-14% y un pH 7.4-7.6. Estos tanques se ubican en una sala especial del Laboratorio: el "cangrejario". En dicho ambiente, los animales se mantienen bajo un ciclo 12:12 hs luz-oscuridad en un rango de temperatura controlada entre 19-24 C^o. La alimentación consiste en *pellets* para conejos, suministrados cada 3 días. El agua era renovada después de 4 hs del comienzo de la ingesta.

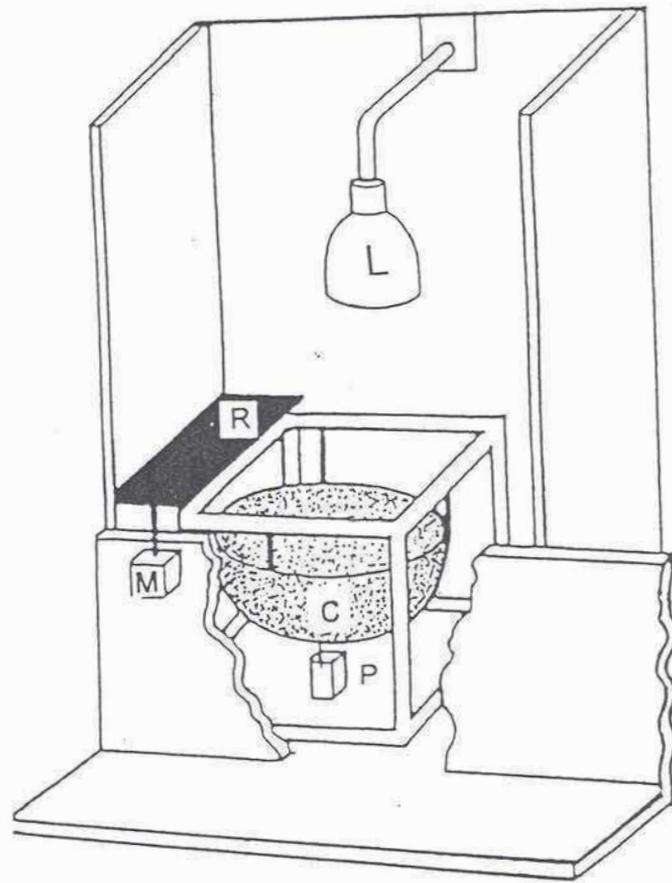
Chasmagnathus puede ser capturado durante todo el año. Sin embargo, la repuesta de escape disminuye significativamente en el Laboratorio a finales del invierno y durante la primavera. Por ello, los experimentos de esta Tesis se realizaron entre los meses de diciembre y agosto, es decir durante el verano, otoño y parte del invierno.

2. Equipo: Universal. Características generales del aparato.

Con el nombre de **Universal** se designa el equipo empleado en los experimentos de esta Tesis. Es un dispositivo automatizado que permite al experimentador trabajar con 40 animales en forma simultánea. La unidad experimental es el actómetro (**Figura 2**), consistente en un contenedor de plástico (**C**) de pared cóncava y piso llano de 10 cm. de diámetro, cubierto con agua hasta una profundidad de 0.5 cm. El cangrejo es alojado en el contenedor que está suspendido por 3 tensores desde una estructura de madera y se encuentra iluminado con una lámpara (**L**) de 10W ubicada a 30cm por encima del animal. Un motor (**M**) permite mover horizontalmente una pantalla de forma rectangular opaca (**R**, 25 x 13 cm.), desde la posición (1) a la posición (2) y viceversa. Los desplazamientos de la pantalla provocan una respuesta de escape en el animal y consecuentemente oscilaciones del contenedor. En el fondo del recipiente se halla una aguja solidamente fijada a la base del recipiente que se conecta a un transductor piezoeléctrico (**P**).

Las oscilaciones del recipiente inducen, a través del piezoeléctrico, señales eléctricas proporcionales a su velocidad (Cady, 1964). Tales señales son amplificadas, integradas durante el tiempo de registro (9 seg.) y transformadas en unidades numéricas en un rango entre 0-1530, antes de ser procesadas por la computadora. De este modo, los valores se encuentran proporcionalmente correlacionados con la velocidad y el número de oscilaciones del contenedor durante los 9 seg. que dura el registro. La amplificación de los cambios de voltaje está calibrada con una ganancia que hace que los valores de registro se encuentren por debajo de 1530. Un dispositivo de freno permite inmovilizar el recipiente mientras se realizan las maniobras de limpieza.

a)



b)

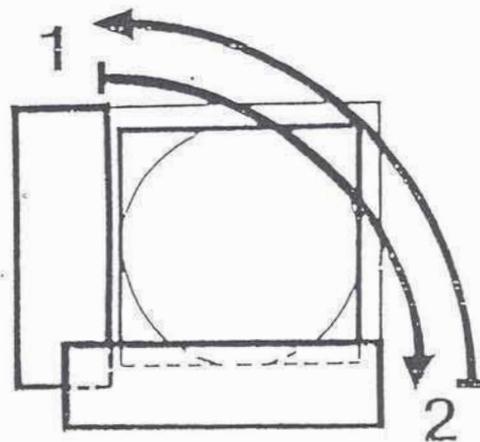


Figura 2: a) Esquema de un actómetro de los cuarenta que constituyen el Universal: (c) contenedor; (R) figura rectangular (pantalla); (M) motor encargado del movimiento de la figura. (P) piezoeléctrico. (L) lámpara que ilumina el actómetro. b) Movimiento horizontal de la pantalla desde la posición 1 a la 2 y viceversa.

En la sala experimental los actómetros se hallan separados unos de otros por particiones laterales (paneles de madera) y por una pared frontal, quedando así completamente aislados. Las unidades son calibrada periódicamente.

Una computadora es utilizada para programar la secuencia de ensayos, la duración del ensayo, el intervalo entre ensayos, y permite monitorear los eventos experimentales.

3. Descripción del ensayo y de la respuesta de escape

Un **ensayo** consistía de dos ciclos de pasajes sucesivos (i.e., un ciclo, de 1 a 2 y de 2 a 1, **Fig. 2**). Cada ciclo duraba aproximadamente 4 seg., por lo que el tiempo total era de 9 seg. El ensayo se estructuró con ese movimiento cíclico, con un doble propósito: primero, obtener una respuesta mas conspicua mediante la acumulación de oscilaciones del actómetro; segundo, aumentar la posibilidad de que la pantalla entre en el campo visual del animal por lados diferentes, garantizando así la estimulación similar para cada individuo independientemente de la ubicación del mismo en el actómetro. La actividad se registraba durante todo el ensayo.

La **respuesta de escape** (Pereyra, Saraco & Maldonado, 1998) consiste en la corrida del cangrejo tratando de dejar atrás a la sombra pasante. Dada la marcada concavidad del recipiente del actómetro, estos movimientos quedaban limitados al piso plano del mismo. Cabe puntualizar dos características salientes de esta respuesta. Primero, comienza inmediatamente después de la entrada del estímulo en el campo visual, precedida generalmente por un pequeño salto, y siempre tiene prioridad sobre la actividad exploratoria oposición de reposo en que estaba el animal ejecutando (Korn & Faber, 1996). Segundo, el escape es una respuesta direccional, específicamente, el cangrejo tiende a correr en dirección opuesta a la que la pantalla se esta moviendo.

4. Protocolo experimental.

Durante un experimento de habituación a largo término (**HLT**), se sometía a los animales a dos sesiones, primero la **sesión de entrenamiento** que constaba de un número dado de ensayos (5,15,30, 60, 120, 300) separados por un intervalo entre ensayos, IEE (0,9,27,45,81,135,171 seg.). La elección tanto del número como del IEE dependía de la hipótesis que se estaba analizando. La **sesión de evaluación** consistía de 1, 2 o 6 ensayos (con IEE=0,9,27,45,81,135, ó 171seg.), separada de la primera sesión por un **intervalo entre sesiones**, IES de 24,72 ó 120 horas. Durante el **IES** los animales eran ubicados en recipientes individuales con un fondo de agua de 0.5 cm. guardados en cajones con una iluminación tenue. El diseño experimental incluía pares de grupos, cada par formado por un grupo entrenado (**TR**) y uno control (**CT**). Durante la sesión de entrenamiento, el grupo TR recibía , luego de un breve período de adaptación en el actómetro (**fase contextual**), un número dado de ensayos separados por el IEE elegido (**fase de estimulación**); mientras que el grupo CT permanecía en los actómetros durante el mismo período pero sin presentación del estímulo (es decir, solo había **fase contextual** durante la sesión). Durante la sesión de evaluación, los grupos CT y TR recibían el mismo tratamiento.

Para el caso de los experimentos de memoria de contexto (**MCTX**), el protocolo experimental se explica con la presentación de los experimentos respectivos.

La línea de base del nivel de respuesta resulta consistente hasta los 10 días de llegados, pero animales provenientes de distintas capturas presentaban diferencias en el nivel de respuesta. Debido a ello, solo animales provenientes de la misma captura participaban en el mismo experimento.

Cuando comenzaba un experimento los animales eran trasladados desde el cuarto de mantenimiento al cuarto experimental, y antes de ser ubicados en el actómetro se sometían a un **test de selección**: cada cangrejo era dado vuelta apoyándolo sobre su región dorsal y solo si el sujeto se reincorporaba rápidamente, eran utilizados en el experimento. Esta selección se basaba en el hecho que los sujetos con recuperación lenta mostraban baja reactividad al estímulo visual de peligro. No más del 10 % de los animales era eliminado por este criterio.

5. Evaluación de la retención de la respuesta habituada.

La retención de la respuesta habituada es definida operacionalmente como la diferencia significativa entre los grupos CT y TR en el nivel de respuesta durante la sesión de evaluación. Como vemos, la memoria a largo término es evaluada centrando el análisis de los datos en los niveles de respuesta de la evaluación. Rescorla (1988) argumenta en forma convincente a favor de utilizar este tipo de análisis en vez de la comparación entrenamientoXevaluación de un mismo grupo, puntualizando la necesidad de distinguir entre el tiempo de *input* (sesión de entrenamiento) y tiempo el de *output* (sesión de evaluación). La justificación para este tipo de comparación, esta dada por el hecho de que el comportamiento del organismo puede diferir entre las sesiones por razones no relacionados con el aprendizaje. Este argumento es especialmente apropiado para nuestro modelo, ya que resultados previos demostraron que la HLT es independiente del nivel de la respuesta de escape durante el entrenamiento (Tomsic et. al, 1991), un resultado coincidente con el obtenido con otras especies (Applewhite et. al, 1969, Peeke & Veno,1976).

De acuerdo a la hipótesis planteada en las distintas series de experimentos de esta Tesis, se eligieron herramientas estadísticas diferentes para el análisis de los datos obtenidos en cada caso. Una descripción sucinta de cada uno se incluye al comienzo del capítulo respectivo.

6. Drogas e inyecciones.

En los experimentos donde se realizan tratamientos de tipo farmacológico, se inyectaban 50 μ l del vehículo o de soluciones de las drogas utilizadas; administrando la inyección a través del lado derecho de la membrana cefalotorácica-abdominal con una penetración controlada de la aguja de 4 mm, asegurándose de esta forma que la solución era liberada en el centro del saco pericardial. En experimentos de los primeros capítulos utilizamos agua destilada como vehículo ya que se había demostrado que ese volumen no afectaba la reactividad del animal (Godoy & Maldonado, 1996), mientras que en lo últimos el vehículo elegido fue solución salina para crustáceos (Hoeger & Florey, 1989) que tampoco evidenció un efecto propio sobre la reactividad ni diferencias con el primer vehículo (Delorenzi et. al, 1995).

7. Definiciones

Presentamos a continuación, un conjunto de términos de uso común a lo largo de la Tesis.

- **Habitación a corto término (HCT)** es el decremento de la respuesta dentro de una sesión.
- **Habitación a largo término (HLT)** es el decremento entre sesiones de la respuesta. Se usa como equivalente a retención de la memoria o CT-TR (diferencia en la evaluación).
- **Intervalo entre ensayos (IEE)** se refiere al intervalo de reposo entre ensayos.
- **Intervalo entre sesiones (IES):** período de reposo entre la sesión de entrenamiento y la sesión de evaluación.

- La expresión **fase inicial** distingue al primer ensayo de la Sesión de evaluación del resto de la misma, mientras que, la **fase de reentrenamiento** se refiere a los últimos 5 ensayos de esta sesión.
- **Protocolo fuerte** de entrenamiento: programa de entrenamiento que incluye 15-30 ensayos con IEE de 171 seg.
- **Protocolo débil** de entrenamiento: programa de entrenamiento que comprende 10 o menos ensayos con un IEE de 171 seg.
- La expresión **estímulo fásico** (= estímulo habituante = estímulo visual de peligro = señal) se refiere a la pantalla rectangular pasante.
- **Contexto** define al conjunto de claves ambientales (visuales, táctiles) presentes en el lugar de entrenamiento y en el de evaluación.

CAPITULO 3

*EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA HABITUACION
A LARGO TERMINO Y LA MEMORIA CONTEXTUAL.*

1. INTRODUCCION

Durante las últimas dos décadas se han obtenido numerosas evidencias de que los inhibidores de la síntesis de proteínas producen impedimentos en la formación de la memoria a largo término, cuando se administran inmediatamente antes o después del entrenamiento (Eisenstein, Altman, Barraco, Barraco & Lovell, 1983; Flood, Bennett, Orme & Rosenzweig, 1975^a; . Flood, Bennett, Orme & Rosenzweig, 1975^b; Patterson, Rose & Bradley, 1989; Squire & Barondes, 1974).

Estudios recientes, realizados en invertebrados, a nivel celular y molecular, sugieren fuertemente la relación de la memoria a largo término con la síntesis de proteínas. Así, se ha demostrado en Aplysia que los inhibidores bloquean la facilitación a largo término inducida por la aplicación *in vitro* de 5-HT (Montarolo, Goelet, Castellucci, Morgan, Kandel & Scharer, 1986) y la endocitosis de moléculas de adhesión celular, un mecanismo temprano en el crecimiento sináptico relacionado con el aprendizaje (Bailey, Chen, Keller & Kandel, 1992). Asimismo, en Hermisenda, esos inhibidores impiden la reducción de las corrientes de K^+ mediadas por Ca^{2+} , que es el componente mas importante en la respuesta condicionada (Alkon, Bank, Natio, Chung, Ram & Rasmussen, 1987), asi como también el aumento de potenciales generadores en los fotorreceptores B (Crow & Forrester, 1990). Finalmente en el *crayfish*, se ha demostrado que impiden la expresión de la adaptación a largo término de la transmisión sináptica (Nguyen & Altwood, 1990).

Por otro lado, experimentos con vertebrados acerca de la expresión de genes en la consolidación de nuevas experiencias, están de acuerdo con la idea de que la adquisición de una memoria a largo término depende de la síntesis de proteínas (Anokhin, Mileusnic, Shamakina & Rose, 1991; Anokhin & Rose, 1991; Campeau, Hayward, Hope, Rosen, Nestler & Davis, 1991).

En este capítulo, el modelo de HLT de Chasmagnathus es usado para evaluar el efecto de la cicloheximida (CI), un inhibidor de la síntesis proteica.

Si la hipótesis de que la memoria a largo término depende de la síntesis *de novo* de proteínas es válida, para todos los tipos de memoria, debería esperarse que la retención en la HLT (diferencia CT-TR) fuera también significativamente disminuida. Y en tal caso, sería esperable una correlación entre el aprendizaje en Chasmagnathus y la expresión de genes tempranos (correlación que recientemente se ha comprobado, Freudenthal y Romano, 1997).

Además, de demostrarse el efecto amnésico de CI en Chasmagnathus, podría utilizarse ese efecto de la droga como herramienta para explorar un punto controvertido de la teoría de la habituación, concretamente, aquel de la relación entre la habituación a largo término y la memoria del contexto (MCTX) (Tomsic et.al., 1993). Si la HLT y la MCTX fuesen dos procesos mnésicos completamente independientes, el efecto deletéreo de CI sobre uno de ellos no debería afectar al otro. Por lo tanto, se realizaron dos tipos de experimentos a lo largo del presente capítulo, unos dirigidos a estudiar el efecto de la CI sobre la HLT y otros sobre la memoria contextual.

2. METODOS

2.1. Diseño experimental

2.1.1 Experimentos sobre habituación a largo termino (Tabla 1, A).

El protocolo general para estos experimentos incluía 4 grupos de igual número de animales ($n= 35-45$). Dos grupos eran inyectados con agua (grupos AG) mientras que los otros dos eran inyectados con cicloheximida (grupos CI); a su vez, un grupo de cada par era entrenado (grupo entrenados, EXP) mientras que el otro permanecía durante toda la sesión de entrenamiento en los actómetros pero sin recibir la estimulación de la pantalla (grupo control, CT). Por lo tanto, los grupos eran: CT-AG, TR-AG, CT-CI y TR-CI. En la sesión de entrenamiento los grupos TR recibían 5, 15 ó 30 ensayos con un intervalo entre ensayos de 171 seg. El intervalo entre

sesiones podía ser de 24, 72, 120 horas. La sesión de evaluación consistía en un ensayo. La elección de un único ensayo para evaluar la retención se apoya en los argumentos claramente expuestos por Squire (1984). Según este autor, cuando los animales son tratados con un inhibidor de la síntesis de proteínas y sometidos a varios ensayos de evaluación, el efecto amnésico surge claramente en el primer ensayo de la evaluación; pero en los siguientes, la combinación de distintos factores, como la reexposición al aparato de entrenamiento y la retención parcial (debido al hecho que la inhibición no es total), interactúan maximizando la performance, de tal manera que se observa nuevamente retención, quedando así enmascarado el efecto disruptor de la CI.

Tabla1: Protocolo general correspondiente a Experimentos del Capítulo 3

Tabla 1 A: Experimentos de Habitación a Largo Término

Grupos	Inyección pre- Sesión de Entrenamiento		Intervalo entre Sesiones	Inyección post- Sesión de Evaluación	
	Fase contextual	Fase de Estimulación		Fase contextual	Fase de estimulación
Grupo Entrenado (TR)	15 minutos	5,15,30 ensayos. Separados por 171 segundos	24,72,120 horas	15 minutos	1 ensayo
Grupo Control (CT)	30,60 o 120 minutos	-----	24,72, 120 horas	15 minutos	1 ensayo

2.1.2 Experimentos sobre memoria del contexto (Tabla 1, B).

El protocolo general para estos experimentos incluía 4 grupos de igual número de animales (n= 35-45). Dos grupos eran inyectados con agua (grupos AG) mientras que los otros dos eran inyectados con cicloheximida (grupos CI); a su vez, un grupo de cada par permanecía dos horas en los actómetros corrientes durante la sesión de "entrenamiento" (grupo de igual contexto, IG), mientras que el otro permanecía las dos horas en recipientes cilíndricos de plástico transparente con el fondo cubierto por una capa de

arena húmeda (cilindros), ubicados en cajas poco iluminadas, es decir, en un contexto de claves visuales y táctiles muy diferentes a los actómetros (grupo de diferente contexto, DIF). Los grupos resultantes eran: DIF-AG, IG-AG, DIF-CI e IG-CI.

El intervalo entre sesiones, era de 24 o 72 horas, según el experimento. La sesión de evaluación consistía de dos ensayos con un intervalo de 171 seg., dados en los actómetros usuales del equipo. Por lo tanto, grupos DIF-AG y DIF-CI, en contraste con lo que ocurría en los grupos IG-AG e IG-CI, transcurrían el entrenamiento en un contexto diferente a aquel de la evaluación. La decisión de utilizar en la evaluación dos ensayos, se debió al hecho de que el tiempo elegido para la exposición durante el entrenamiento (dos horas) no resultaba suficiente para que la memoria de contexto se expresa de una manera inequívoca en solo un ensayo. En efecto, en los experimentos de inhibición latente (Tomsic, Pedreira, Romano, Hermitte & Maldonado, 1998) fueron necesarios 12 hs de exposición para lograr una expresión de memoria contextual en un solo ensayo.

Tabla 1 B: Experimentos de Memoria de Contexto

Grupos	Inyección pre- Sesión de Entrenamiento		Inyección post- Sesión de Evaluación	
	Fase Contextual	Intervalo entre Sesiones	Fase contextual	Fase de estimulación
Grupo Entrenado (IG)	2 horas de permanencia. En el actómetro.	24,72 Horas.	15 minutos.	2 ensayos separados por 171 segundos. En actómetro
Grupo Control (DIF)	2 horas de permanencia. En el cilindro.	24,72 horas.	15 minutos.	2 ensayos separados por 171 segundos. En actómetro

2.2 Inyección

El agua destilada ó la solución de CI se administraban a través de la membrana céfalotorácica-abdominal. En los experimentos en los que la administración se hacía antes del entrenamiento (**preentrenamiento**), la

inyección se daba inmediatamente antes del comienzo de la sesión. En los que la administración se hacía después del entrenamiento (**postentrenamiento**), se inyectaba inmediatamente después de la finalización de la sesión. La cicloheximida era adquirida en SIGMA. Co.

2.3 Análisis de los datos y evaluación del efecto amnésico

En experimentos preliminares del Laboratorio, con entrenamiento de 15 o 30 ensayos con un IEE de 171 seg. y con la sesión de evaluación a 24 o 72 horas, se había encontrado, sin excepción, una diferencia significativa ($\alpha=.05$) entre CT y TR ($n= 20$ o mas animales).

En base a este hecho, se consideró que había efecto amnésico de la CI cuando aplicando un test de Duncan sobre los datos de la evaluación, no surgen diferencias significativas entre los grupos tratados con la CI (CT-CI vs. TR-CI). Se esperaba que con el mismo test no se revelaran diferencias entre los grupos controles (CT-AG vs. CT-CI), excluyéndose así la existencia de un efecto inespecífico de la droga. Por el contrario, el test debería detectar diferencias entre los grupos tratados con agua destilada (CT-AG vs. TR-AG).

En los experimentos preliminares de MCTX con 30 o mas animales por grupo, entrenamiento de 2 horas de permanencia en el contexto asignado, y evaluación a 24 o 72 horas, se había encontrado, sin excepción, una diferencia significativa ($\alpha=.05$) entre los grupos control (DIF) y los grupos entrenados (IG). En base a este hecho, se consideró que había un efecto amnésico cuando aplicando un test de Duncan sobre los datos de evaluación no surgen diferencias significativas entre los grupos tratados con la CI (DIF-CI vs. IG-CI). Se esperaba que con el mismo test, no surgieran diferencias grupos controles (DIF-AG vs. DIF-CI) de cada experimento, descartando así un efecto inespecífico de la droga. Por el contrario, se esperaba que el test detectara las diferencias corrientes entre los grupos tratados con agua destilada (DIF-AG vs. IG-AG).

2.4 Método bioquímico

Para determinar el grado de inhibición de la síntesis de proteínas en el ganglio cerebral y torácico por la administración de CI, se utilizó una mezcla de aminoácidos marcados con C^{14} . Se eligió un tiempo de 2 horas de exposición a la CI (de acuerdo con el tiempo que dura el entrenamiento de 30 ensayos separados por 171 seg.); y otro de 24 horas exposición a la droga. Se comparó la radioactividad específica relativa en los animales tratados con la droga contra los controles inyectados con agua, calculándose así el porcentaje de inhibición para cada grupo.

Se utilizó el siguiente protocolo experimental: Los cangrejos eran inyectados con AG ó CI en dosis de $10\mu\text{g}$ y $20\mu\text{g}$ por animal. Una o veintitrés horas después, se les administraba una mezcla de aminoácidos marcados [$2\ \mu\text{Ci/cangrejo}$, C^{14} (U)] de Dupont-NEN (Boston, Massachusetts) en $50\mu\text{l}$ de agua destilada. Los animales eran ubicados en recipientes individuales con el fondo cubierto con un papel de filtro durante una hora, después se los sacrificaba e inmediatamente luego se les removían los ganglios.

Los ganglios de un mismo grupo (8 ganglios, correspondientes a 4 cangrejos) se trataban en forma conjunta, de manera que cada grupo era representado por una muestra. Los hepatopancreas de los sujetos tratados con CI ó AG 2 horas antes del sacrificio, eran extraídos y tratados en forma similar a los ganglios.

Inmediatamente luego de la extracción, los ganglios eran sumergidos en nitrógeno líquido, homogeneizadas en 0.5 ml de cloroformo:metanol (3:2) frío en un homogeneizador manual de vidrio, y el material suspendido transferido a tubos de centrífuga. El homogeneizador se enjuagaba con 0.5 ml de la misma solución, la que se agregaba al homogenato. Los tubos se centrifugaban a 5000rpm durante 10 minutos. El sobrenadante era cuidadosamente separado para ser utilizado luego en un método de Folch modificado (Quesada-Allué & Belocopitow, 1978). El precipitado se enjuagaba con 1ml de cloroformo:metanol:agua (1:16:16) y se centrifugaba

nuevamente a 5000 rpm durante 10 minutos; el sobrenadante se descartaba y el precipitado se resuspendía en 200 μ l cloroformo:metanol:agua (1:16:16) con un vortex, tomándose una muestra de 10 μ l para la determinación de proteínas usando una versión modificada del método de Bradford (Boccaccio, Quesada-Allué, 1989; Bradford, 1976). Se agregaba tricloroacético al 10% frío a la suspensión y, se filtraba a través de papel de filtro de vidrio GF/C (Whatman) empleando una bomba de vacío. El filtro se secaba bajo una lámpara infrarroja, se transferían a viales de 3 ml de centelleo con líquido de centelleo de tolueno, y se contaba. Los papeles de filtro de la base de los recipientes también eran contados en viales de 20 ml. Los porcentajes de inhibición se calculaban comparando la radioactividad específica relativa en los animales tratados con la droga contra los controles inyectados con agua.

3. RESULTADOS

3.1 Resultados de los experimentos sobre inhibición de la incorporación de aminoácidos marcados.

Dos horas después de la inyección, 10 μ g de CI inhibieron la incorporación de aminoácidos en los ganglios en un 88%, y 20 μ g lo hicieron en un 92%, pero para ambas dosis, no se observaba inhibición 24 horas después de la administración del antibiótico. Los valores de marca en los papeles de filtro de los recipientes contenedores, eran similares al blanco, lo que sugiere que no hubo excreción del material radiactivo durante la hora de espera entre su administración y el sacrificio. La incorporación de marca en proteínas del hepatopancreas fue de un 98%, 2 horas después de la administración de 20 μ g de cicloheximida.

Este grado y duración de la inhibición de síntesis de proteínas coincide con los umbrales amnésicos generalmente informados para CI y anisomicina (Patel, Rose & Stewart, 1988). Sin embargo, debe destacarse que la dosis requerida para producir una inhibición superior al 80% luego de dos horas

(circa 60 $\mu\text{g/g}$), es marcadamente menor que la requerida para obtener un efecto similar por administración sistémica en vertebrados intactos (640 a 3200 μg en ratones, Flood, Bennett, Rosenzeig & Orme, 1972). En realidad, la dosis efectiva en Chasmagnathus resulta mas cercana a la utilizada para inyecciones intracerebrales en ratas (10-20 μg en la amígdala, Bergman, Kesler & Patlow, 1978). Esta diferencia de efectividad puede atribuirse a la ausencia en el cangrejo, de una barrera hematoencefálica endotelial (Abbott, 1992).

3.2 Resultados de experimentos comportamentales.

3.2.1 **La administración de la CI antes del entrenamiento no afecta la actividad exploratoria ni la habituación a corto término (HCT).**

Dos experimentos, uno enfocado a evaluar el efecto de la CI sobre la actividad exploratoria y el otro sobre la respuesta de escape, se llevaron a cabo en forma simultánea, cada uno con dos grupos, uno tratado con AG y el otro con 20 μg de CI. En ambos experimentos, todas las inyecciones eran dadas inmediatamente antes de la ubicación de los cangrejos en los actómetros. Durante el experimento de exploración los animales permanecían 2 horas sin recibir estimulación con la sombra. Su actividad exploratoria se registraba nueve veces durante 20 segundos cada vez, con intervalos de 15 minutos. Durante el experimento de HCT, los cangrejos eran sometidos, luego de 30 minutos de adaptación, a un entrenamiento de 30 ensayos separados por 171 seg.

La **Fig. 3a** muestra la actividad exploratoria de cada grupo, mientras que la **Fig.3b** muestra la respuesta al estímulo de peligro. La gran similitud de la respuesta para cada par de grupos es manifiesta, sugiriendo así que la administración de CI no afecta ni la actividad exploratoria ni la HCT ante un estímulo de peligro. No aparecen síntomas de impedimento durante las primeras horas posteriores a la inyección, dentro de un rango de dosis de CI, i.e. 10, 20, 30, 50, 80, 100 μg por animal. Sin embargo, cuando se usaron

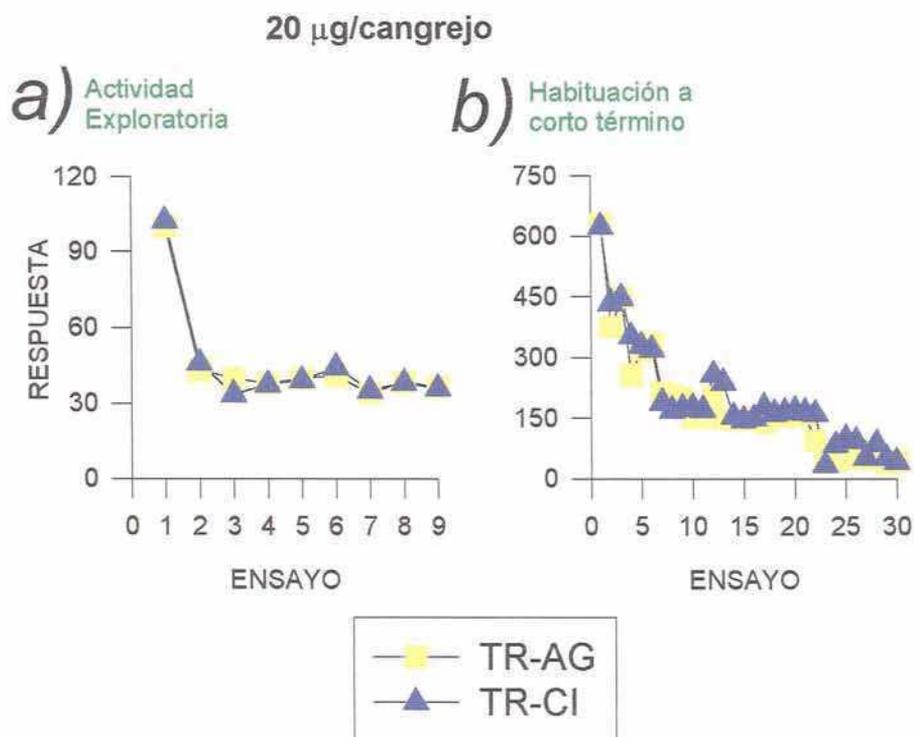


Figura 3: Efecto de la CI sobre la actividad exploratoria y la HCT: Los cuadrados amarillos representan los valores de la respuesta de animales tratados con agua (AG). Los triángulos azules representan los valores de respuesta de animales tratados con cicloheximida (CI). **a)** medición de la actividad exploratoria. Abscisas: ensayos. Ordenadas: valor de la actividad exploratoria. **b)** medición de la HCT. Abscisas: ensayos. Ordenadas: valor de la respuesta de escape

dosis iguales o superiores a 30 μg pudo detectarse una pequeña caída de la respuesta en los últimos ensayos del entrenamiento, y a las 24 horas, muchos animales presentaban pérdidas de apéndices locomotores, fenómeno conocido como autotomía (Fredericq, 1883), así como menor actividad locomotora, registrándose algunas muertes.

El resultado de que la CI no afecte la HCT coincide con lo observado recurrentemente en experimentos con diversas especies (Barraco, Lovell, Eiseinstein, 1981; Bennett, Flood, Orme, Rosenzweig, Jarvik, 1975; Gibbs & Ng, 1977).

3.2.2 Efecto de la cicloheximida, administrada antes del entrenamiento, sobre la habituación a largo término.

A) 72 horas de IES (Tabla 2 A). Se ha argumentado que el grado de amnesia inducido por CI depende, entre otras variables, del intervalo entre sesiones (Davis & Squire, 1984). Por lo tanto, comenzamos este estudio analizando el efecto de CI usando un intervalo mayor a 24 horas, con la intención de reducirlo o prolongarlo en los experimentos siguientes. De acuerdo a lo observado en experimentos pilotos, si se extiende el entrenamiento a 30 ensayos, separados por 171 seg., se obtiene una robusta HLT después de 72 horas.

Conforme al protocolo general (Tabla 1 A), se formaron los 4 grupos usuales: CT-A,G TR-A,G CT-CI y TR-CI. Los grupos CI se les administraba 10 µg de cicloheximida antes del entrenamiento. Después de las 72 hs de intervalo, todos los animales eran sometidos a la sesión de evaluación de un ensayo.

Tabla 2: Programa de experimentos del punto 3.2 del Capítulo 3. Efecto de la cicloheximida (CI) administrada pre-entrenamiento.

Tabla 2 A: Efecto de la CI sobre la Habituaación alargo Término (HLT). 72hs entre sesiones.

Experimento	Grupo	Dosis de CI (µg)	Sesión de entrenamiento		Sesión de evaluación
			Ensayos de la Sesión de Entrenamiento separados por 171segundos	Intervalo entre Sesiones (horas).	Ensayos de la Sesión de Evaluación
1	CT-AG	0	0	72	1
	TR-AG	0	30	=	=
	CT-CI	10	0	=	=
	TR-CI	10	30	=	=
2	CT-AG	0	0	72	1
	TR-AG	0	30	=	=
	CT-CI	20	0	=	=
	TR-CI	20	30	=	=
3	CT-AG	0	0	72	1
	TR-AG	0	30	=	=
	CT-CI	5	0	=	=
	TR-CI	5	30	=	=

Una 2X30 ANOVA de medidas repetidas sobre los datos del entrenamiento no muestran diferencias significativas entre los grupos TR-AG y TR-CI ni interacción de grupo por ensayo ($F=0.25$ y $F=0.6$, respectivamente). Un test de Duncan realizado sobre los datos de la sesión de evaluación (**Fig 4a**), muestra, conforme a las predicciones, una diferencia significativa entre los grupos AG, pero no entre los grupos CI ni entre los grupos controles. Adicionalmente, surge una diferencia significativa entre los grupos entrenados (TR-AG vs TR-CI).

Para evaluar el efecto de CI en una forma dosis dependiente, se realizaron otros dos experimentos, uno con una dosis mayor, 20 μg por cangrejo, y otro con una dosis menor, 5 μg por cangrejo (Tabla 2A, Exps. 2 y 3).

Los resultados con 20 μg fueron similares a aquellos obtenidos con 10 μg de CI (**Fig.4b**). Los datos correspondientes a 5 μg están exhibidos en la **Fig.4c**.

El test de Duncan sobre estos resultados, revela diferencias significativas entre los grupos tratados con agua y los tratados con CI, mientras que no aparecen diferencias entre los controles o entre los entrenados.

Los resultados se pueden resumir en los siguientes dos puntos:

- 1) la administración de 10 o 20 μg de CI antes del entrenamiento, produce un déficit en la retención de la respuesta habituada a 72 hs. Esto no puede ser explicado por un efecto inespecífico depresor o excitador de la droga, ya que no surgen diferencias entre los grupos controles.
- 2) la administración de 5 μg falla en producir una disminución en la retención a 72 hs, mientras que la amnesia inducida por 20 μg es similar a la observada con 10 μg . Así, el umbral efectivo para la CI está alrededor de los 10 μg , mientras que dosis mayores de 30 μg mostraron efectos colaterales que se ponen de manifiesto durante la evaluación. En otros términos, la ventana de dosis efectiva para obtener un efecto

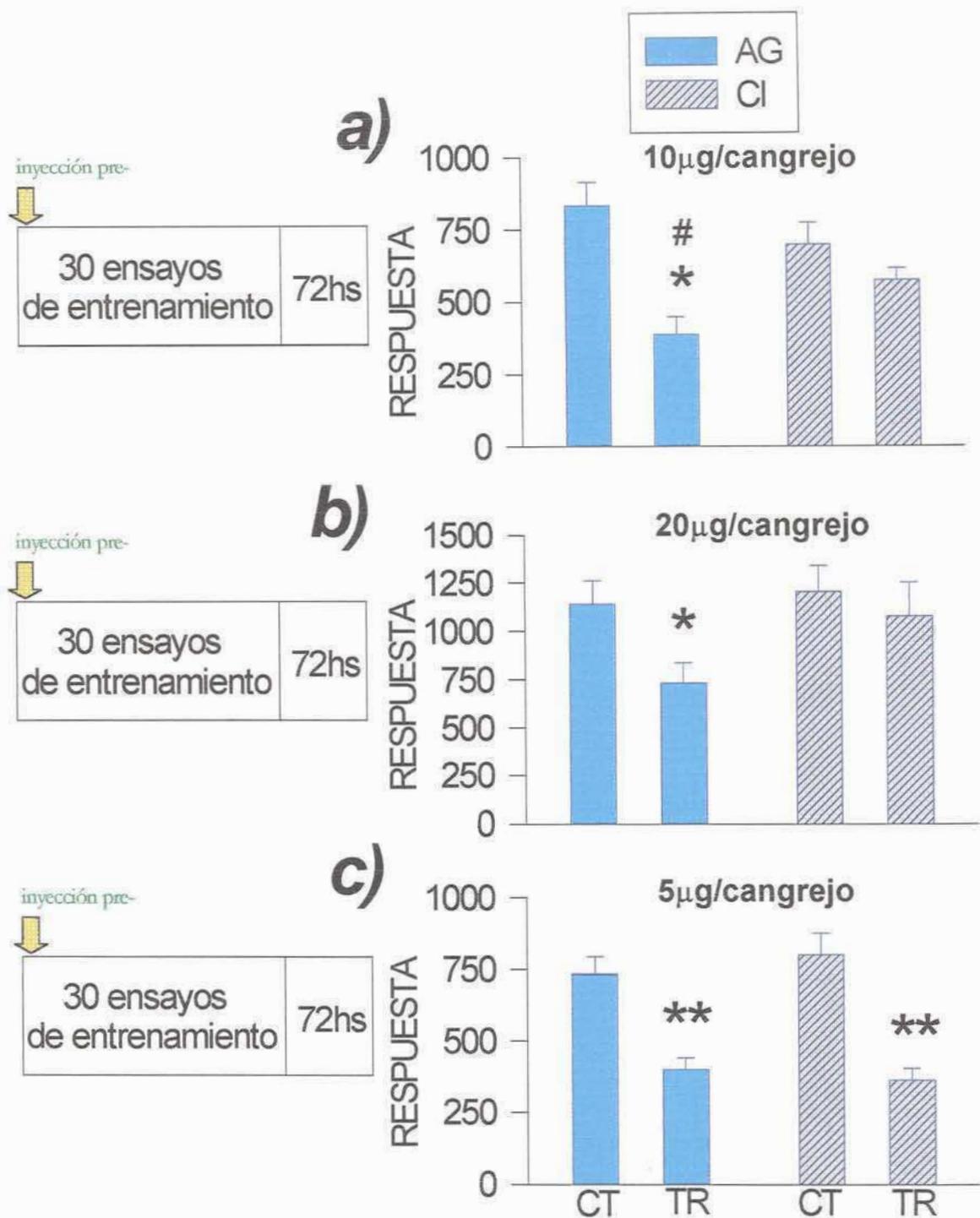


FIGURA 4: Efecto de la cicloheximida (CI), administrada antes del entrenamiento, sobre la habituación a largo término a 72 horas de la sesión de entrenamiento (30 ensayos separados por 171 seg.) a) Grupos-CI inyectados con 10µg/cangrejo.(n=40); b) 20µg de CI/cangrejo (n=35); c) 5 µg de CI/cangrejo (n=35). Las barras celestes representan los grupos inyectados con agua antes del entrenamiento (grupos-AG); las barras grises rayadas con azul representan los grupos inyectados con cicloheximida (grupos-CI). Ordenadas: media del valor de la respuesta de escape por grupo. Abscisas: CT, un grupo control (CT-AG, CT-CI); TR, un grupo entrenado (30 ensayos, TR-AG, TR-CI). Test de Duncan: * convención para $p < 0.05$ y ** para $p < 0.01$, en comparaciones entre grupos-AG o entre grupos-CI; # para $p < 0.05$, en comparaciones entre grupos entrenados (TR-AG vs TR-CI).

amnésico es muy estrecha, resultado consistente con los datos aportados del efecto de esta droga sobre otras especies (Bennett, Rosenzweig & Flood, 1977).

B) 24 horas de intervalo entre sesiones (Tabla 2 B). Se usó el protocolo general para experimentos de habituación (Tabla 1 A), con 15 ensayos de entrenamiento, separados por 171 seg., con un intervalo entre sesiones de 24 horas, y administrando CI antes del entrenamiento y en las dosis que en los experimentos a 72 horas resultaron efectivas (i.e. 10 y 20 μg de CI).

Tabla 2 B: Efecto de la CI sobre la Habituación alargo Término (HLT). 24hs entre sesiones.

Experimento	Grupo	Dosis de CI (μg)	↓	Sesión de Entrenamiento	Intervalo Entre Sesiones (horas).	Sesión de Evaluación
			Ensayos de la Sesión de Entrenamiento separados por 171segundos	Ensayos de la Sesión de Evaluación		
1	CT-AG	0		0	24	1
	TR-AG	0		15	=	=
	CT-CI	10		0	=	=
	TR-CI	10		15	=	=
2	CT-AG	0		0	24	1
	TR-AG	0		15	=	=
	CT-CI	20		0	=	=
	TR-CI	20		15	=	=
3	CT-AG	0		0	24	1
	TR-AG	0		30	=	=
	CT-CI	20		0	=	=
	TR-CI	20		30	=	=
4	CT-AG	0		0	24	1
	TR-AG	0		5	=	=
	CT-CI	20		0	=	=
	TR-CI	20		5	=	=

No se encontró efecto sobre la retención en los grupos tratados con CI (Fig. 5a y Fig.5b). El test de Duncan muestra diferencias significativas entre los grupos tratados con CI y entre los tratados con agua, pero no entre los controles ni entre los entrenados.

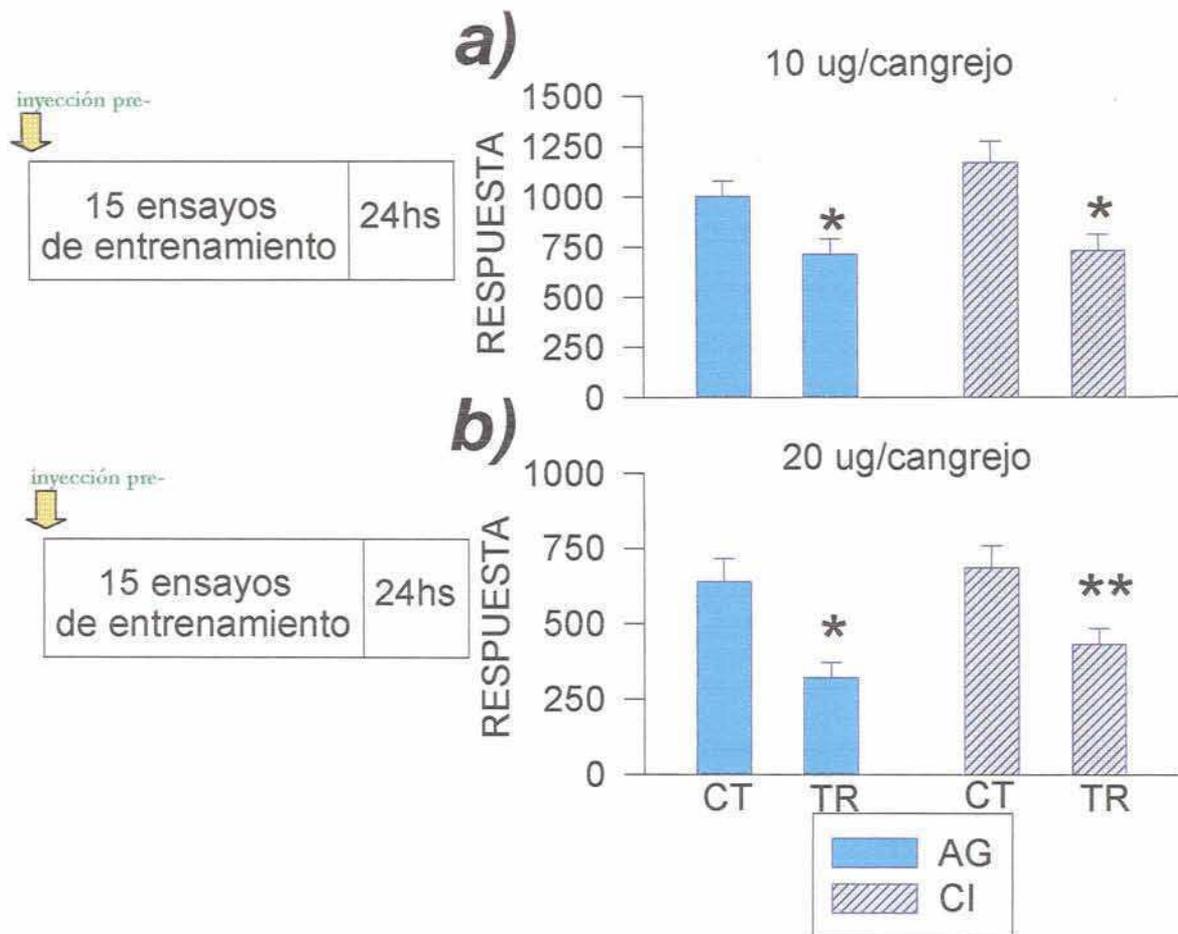


Figura 5: Efecto de la cicloheximida (CI), administrada antes del entrenamiento, sobre la habituación a largo término a 24 horas de la sesión de entrenamiento (15 ensayos separados por 171 seg.) a) Grupos-CI inyectados con 10µg/cangrejo.(n=45); b) 20µg de CI/cangrejo (n=45). Los símbolos son como en la Figura 4.

Antes de discutir si estos resultados apoyan la conclusión de que el efecto amnésico depende aquí también del intervalo entre sesiones, es necesario

probar distintas intensidades de entrenamiento. En efecto, en otros modelos se ha informado sobre la interacción de cantidad de entrenamiento e intervalo entre sesiones, sobre el efecto amnésico de CI (Flood et. al., 1972; Ungerer & Chapoutier, 1975)

Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos adicionales con una dosis de 20 μ g y entrenamientos de 30 y 5 ensayos (Tabla 2 B, Exps. 3 y 4).

Los resultados de la evaluación en el experimento con 30 ensayos (Fig. 6a) y con el 5 ensayos (Fig. 6b) son similares a los obtenidos anteriormente con 15 ensayos (Fig. 5b).

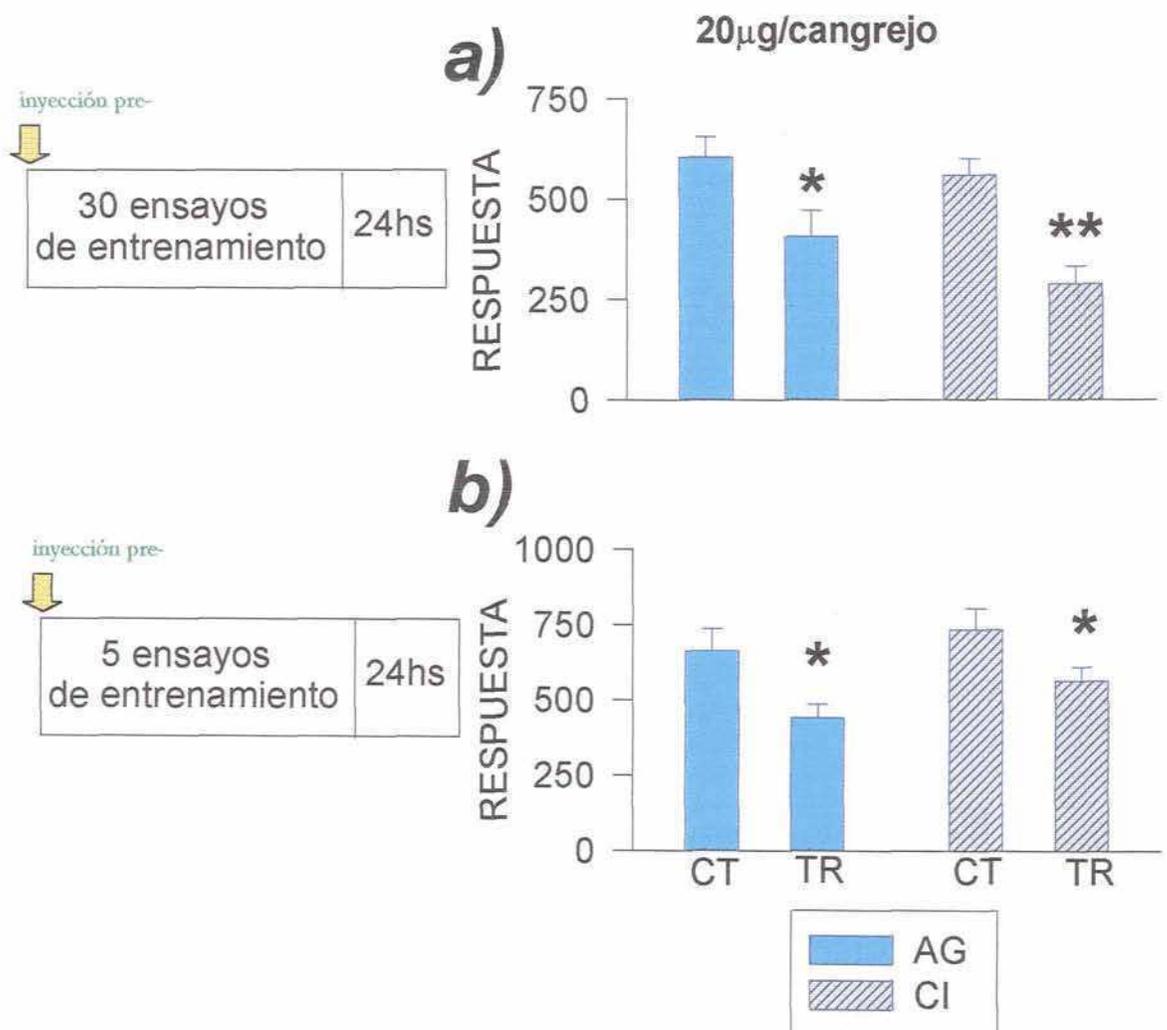


Figura 6: Efecto de la 20 μ g de CI/cangrejo, administrada antes del entrenamiento, sobre la habituación a largo término a 24 horas de la sesión de entrenamiento (30 o 5 ensayos separados por 171 seg.) a) Los grupos entrenados (TR-AG y TR-CI) tuvieron 30 ensayos separados por 171seg durante la sesión de entrenamiento (n=35); b) 5 ensayos separados por 171seg durante la sesión de entrenamiento (n=40). Los símbolos son como en la Figura 4.

Cabe observar que la diferencia obtenida entre grupos AG luego de un entrenamiento tan débil como 5 ensayos es francamente excepcional en los registros del Laboratorio (ver Capítulo 5).

En resumen. A diferencia de lo ocurrido con la inyección preentrenamiento de CI y evaluación del efecto a 72 horas, no se observa pérdida de retención (diferencia CT-TR) en cangrejos tratados de la misma manera, pero evaluados a 24 hs., tanto con 15 ensayos de entrenamiento y dosis de 10 o 20 μg , como entrenados con 5 o 30 ensayos y dosis de 20 μg . Estos resultados parecen apuntalar la conclusión de que el efecto amnésico de CI sobre la habituación a largo término, solo se expresa a intervalos entre sesiones mayores de 24 horas. En otros términos, el efecto amnésico de CI sería gradual, apareciendo entre 24 y 72 horas, y aumentando con intervalos mayores (Flood et al., 1972).

C) 120 hs de intervalo entre sesiones (Tabla 2 C). La hipótesis anteriormente mencionada, según la cual la amnesia inducida por CI se desarrolla gradualmente conforme a la extensión en el intervalo entre sesiones, fue postulada en trabajos con ratas que incluían intervalos de 24 horas o una, dos o tres semanas (Flood et. al, 1972; Squire & Barondes, 1972). Sin embargo, en nuestro caso solo hemos probado hasta ahora solo 2 intervalos, así que no puede excluirse que la falla en la retención observada a 72hs sea el pico máximo del efecto, es decir, que la amnesia inducida desaparezca con intervalos mayores. Por ello, se realizó un experimento con 30 ensayos de entrenamiento, separados por 171 seg., una inyección preentrenamiento de 20 μg de CI, y un intervalo entre sesiones de 120 horas (Tabla 2C, Exp. 1) Se uso 120 hs porque implica el mismo salto (48 hs) que entre 24 y 72 horas.

Durante el intervalo entre sesiones, los animales permanecían como es usual en sus recipientes individuales, pero se realizaba un cambio de agua a los 3 días.

Tabla 2 C: Efecto de la CI sobre la Habituaación alargo Término (HLT). 120hs entre sesiones.

Experimento	Grupo	Dosis de CI (μg)	Sesión de Entrenamiento	Intervalo Entre Sesiones (horas).	Sesión de Evaluación
			Ensayos de la Sesión de Entrenamiento separados por 171segundos		Ensayos de la Sesión de Evaluación
1	CT-AG	0	0	120	1
	TR-AG	0	30	=	=
	CT-CI	20	0	=	=
	TR-CI	20	30	=	=

El resultado que se muestra en la **Fig. 7** fue similar al obtenido para el intervalo de 72 hs con la misma dosis (Fig4), i.e. diferencia CT-TR para AG y no diferencia para CI, sugiriendo que se mantiene el efecto amnésico descrito para las 72 horas. Cabe destacar que este fue el primer experimento en que se demostró la persistencia de la retención después de 5 días (un resultado confirmado posteriormente; ver Capitulo 6).

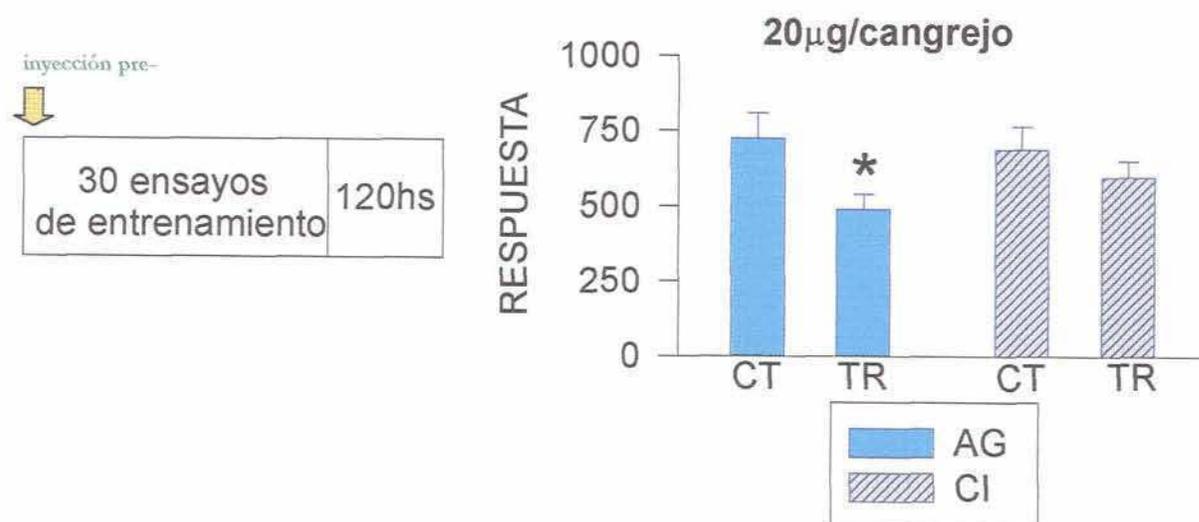


Figura 7: Efecto de la 20 μg de CI/cangrejo, administrada antes del entrenamiento, sobre la habituaación a largo término a 120 horas de la sesión de entrenamiento (30 ensayos separados por 171 seg., n=35). Los símbolos son como en la Figura 4.

3.2.3 Efecto de la CI administrada antes del entrenamiento sobre la memoria de contexto (Tabla 2 D).

Un trabajo previo del laboratorio indica que los cangrejos parecen memorizar el ambiente en donde son entrenados, cuando se lo evalúa a 24hs (Tomsic et. al., 1993). En efecto, cuando se exponen los cangrejos a los actómetros, sin la presentación de la pantalla pasante, exhiben luego, durante la evaluación, un nivel de escape al estímulo de peligro menor que el que muestran los cangrejos pre-expuestos a un contexto claramente diferente. El propósito de los próximos experimentos fue investigar el efecto de la CI administrada antes del entrenamiento sobre esa memoria contextual.

El diseño experimental se basó en el protocolo general para experimentos sobre memoria contextual (Tabla 1, B). En un experimento, el intervalo entre sesiones fue de 24 horas y en otro de 72 (Tabla 2D, Exps 1 y 2); ambos con una dosis de 20 μg de CI. Se formaron los 4 grupos identificados como DIF-AG, IG-AG, DIF-CI y IG-CI.

Tabla 2 D: Efecto de la CI sobre la Memoria de Contexto.

Experimento	Grupo	Dosis de CI (μg)	↓	Sesión de Entrenamiento	Intervalo Entre Sesiones (horas).	Sesión de Evaluación
			Sesión de Entrenamiento 2 horas de Permanencia en el contexto Asignado		Ensayos de la Sesión de Evaluación separados por 171 segundos . En actómetro	
1	DIF-AG	0		Cilindro	24	2
	IG-AG	0		Actómetro	=	=
	DIF-CI	20		Cilindro	=	=
	IG-CI	20		Actómetro	=	=
2	DIF-AG	0		Cilindro	72	2
	IG-AG	0		Actómetro	=	=
	DIF-CI	20		Cilindro	=	=
	IG-CI	20		Actómetro	=	=

La **Fig.8** exhibe el análisis de los resultados obtenidos durante la evaluación, uno a 24 (**Fig.8a**) y el otro a 72 hs (**Fig. 8b**). En ambos experimentos, los grupos AG muestran la esperada diferencia DIF-IG, mientras que no hay disparidad significativa entre los grupos CI, sugiriendo así un deterioro de la memoria contextual por efecto de la droga dada antes del entrenamiento.

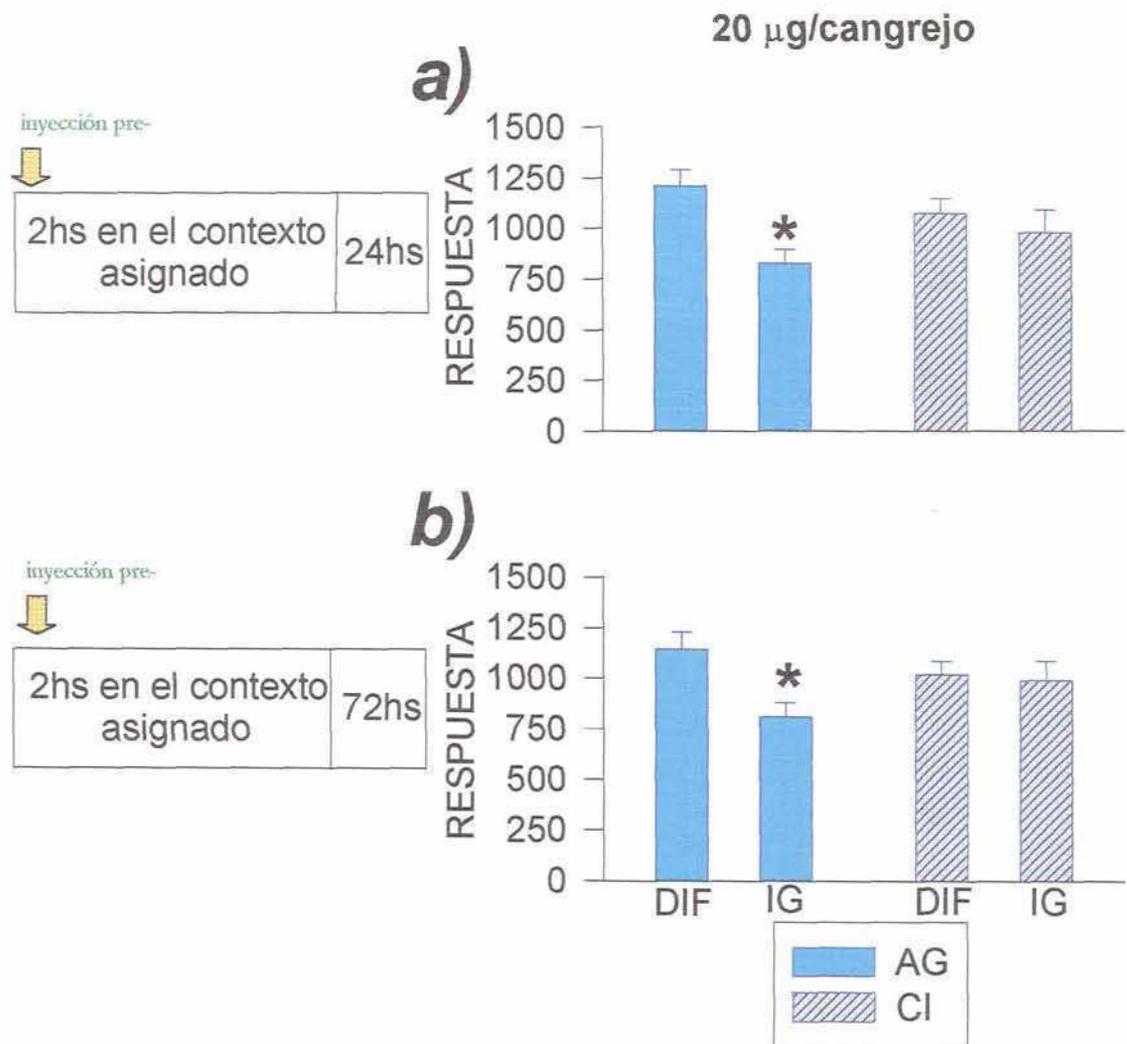


Figura 8: Efecto de 20 μ g de CI/cangrejo, administrada antes del entrenamiento, sobre la Memoria de Contexto a 24 y 72 horas de la sesión de entrenamiento. a) Evaluación a 24 horas (n=40); b) a 72 horas (n=45). Las barras celestes representan los grupos inyectados con agua antes del entrenamiento (grupos-AG); las barras grises rayadas representan los grupos inyectados con cicloheximida (grupos-CI). Ordenadas: media del valor acumulativo de los dos ensayos de la respuesta de escape por grupo. Abscisas: DIF, un grupo que permanece en los cilindros durante el Entrenamiento y son evaluados con 2 ensayos en los actómetros (DIF-AG, DIF-CI); IG, un grupo entrenado y evaluados en los actómetros (IG-AG, IG-CI). Test de Duncan: * para $p < 0.05$ y ** para $p < 0.01$, en comparaciones entre grupos-AG o entre grupos-CI.

Una explicación alternativa basada en un efecto sensibilizador de la droga no se ajusta con los resultados, ya que no surgen diferencias entre los grupos controles (DIF-AG y DIF-CI). Por otro lado, no puede adjudicarse la falta de diferencias a un efecto techo del equipo, ya que en el mismo equipo pero con otro tipo de estímulos (e.g. choques eléctricos) se obtienen registros 3 o 4 veces mas altos que los actuales.

Si se considera estos resultados junto con los obtenidos en los experimentos sobre habituación (3.2.1), ambos con inyecciones dadas antes del entrenamiento, el efecto amnésico de la CI sobre la MCTX y la HLT parece tener diferentes constantes de tiempo. Mientras que la disrupción de la MCTX surge a las 24 hs después de la CI, la HLT se ve afectada solo a las 72 o 120 hs, esto es, la retención del estímulo habituante sería posible sin una memoria del ambiente al que el animal fue preexpuesto.

Estos resultados no se compadecen con los obtenidos previamente en el Laboratorio (Tomsic et. al., 1993), indicativos de que la HLT es contexto específica, esto es, la retención de la respuesta habituada depende de la memoria de las claves contextuales. Sin embargo, antes de profundizar la discusión sobre esta aparente contradicción, es conveniente precisar si el efecto de CI, dado antes del entrenamiento, sobre la memoria contextual a las 24 hs., puede atribuirse a un fenómeno de dependencia de estado.

3.2.4 Evaluación de la dependencia de estado como responsable del efecto amnésico observado de CI sobre la memoria contextual (Tabla 2 E).

Conforme a lo discutido en el punto anterior, es necesario estudiar si los resultados de la droga sobre memoria contextual, se deben a un fenómeno de dependencia de estado (Gibbs & Ng, 1977; Nakajima, 1974; Patterson et. al., 1989). Por este motivo, en el protocolo experimental, idéntico al del punto 3.2.3, la droga (20 μ g) se administró tanto 30 min. antes del entrenamiento como 30 min. antes de la evaluación. Se formaron entonces los grupos: IG- AG.AG, IG-CI.CI, DIF-AG.AG y DIF-CI.CI.

Tabla 2E: Efecto de la CI sobre la Memoria de Contexto. . Evaluación de la dependencia de estado

EXPERIMENTO	Grupo	Dosis de CI (µg)	Inyección ↓ pre-		Inyección ↓ pre-	
			Sesión de Entrenamiento	Intervalo entre Sesiones (horas).	Sesión de Evaluación	
			Sesión de Entrenamiento		Sesión de Evaluación	Ensayos de la Sesión de Evaluación Separados por 171 segundos . En actómetro
1	DIF-AG.AG	0	Cilindro	24		2
	IG-AG.AG	0	Actómetro	=		=
	DIF-CI.CI	20	Cilindro	=		=
	IG-CI.CI	20	Actómetro	=		=

Nota: las inyecciones son administradas 30 minutos antes

Los resultados (**Fig. 9**) fueron similares a los obtenidos cuando se administró la droga una sola vez antes del entrenamiento. El test de Duncan mostró que no hay diferencias significativas entre IG-CI.CI y DIF-CI.CI y los grupos controles DIF-AG.AG y DIF-CI.CI. Por ello, el deterioro en la memoria de contexto observado por la administración de CI antes del entrenamiento parece ser verdadera amnesia, y no una respuesta debida a dependencia de estado, ya que la memoria no se reinstala al igualar las condiciones de tratamiento con la droga antes del entrenamiento y la evaluación.

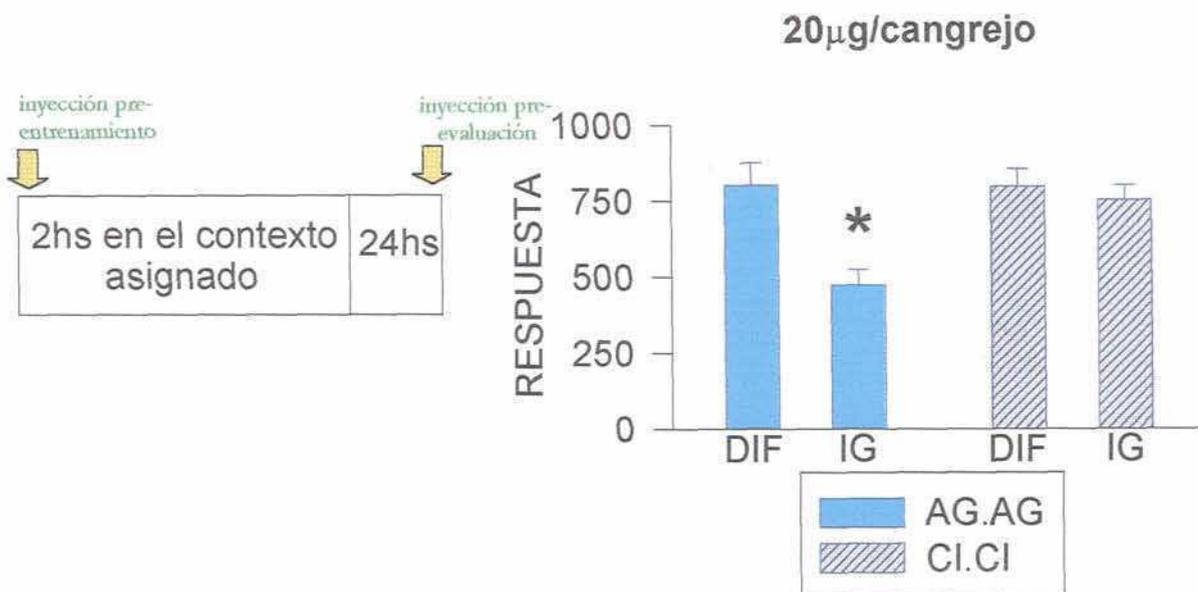


Figura 9: Efecto de 20 μ g de CI/cangrejo, administrada antes del entrenamiento y antes de la evaluación, sobre la Memoria de Contexto a 24 horas de la sesión de entrenamiento. Las barras celestes representan los grupos inyectados con agua 30 minutos antes del entrenamiento y 30 minutos antes de la evaluación (grupos-AG.AG); las barras grises rayadas representan los grupos inyectados con ciclohexitida (grupos-CI.CI). Ordenadas: media del valor acumulativo de los dos ensayos de la respuesta de escape por grupo. Abscisas: DIF, un grupo que permanece en los cilindros durante el entrenamiento y son evaluados con 2 ensayos en los actómetros (DIF-AG.AG, DIF-CI.CI); IG, un grupo entrenado y evaluados en los actómetros (IG-AG.AG, IG-CI.CI). Test de Duncan: * convención para $p < 0.05$ entre grupos-AG.AG o entre grupos-CI.CI.

3.2.5 Efecto a las 24 horas de la CI administrada inmediatamente después del entrenamiento, sobre la habituación a largo termino y sobre la memoria de contexto(Tabla 3, A y B).

La conclusión de que el efecto amnésico de CI (dado antes del entrenamiento), ocurre tanto para la HLT como para la MCTX aunque con diferentes constantes de tiempo, implica aceptar que para un intervalo entre sesiones de 24 horas, puede haber HLT sin memoria contextual (punto 3.2.3). Como ya lo advertimos, esta conclusión está abiertamente en contradicción con otros resultados del Laboratorio que indican que la habituación es contexto-específica (Tomsic, 1993). Sin embargo, puede adelantarse una hipótesis superadora. Concretamente, podría ser que la retención mnésica exhibida por los grupos CI (medida por la diferencia CT-TR) fuese solo aparente. No se debería a una persistencia de la HLT pese a

la droga, sino a un efecto depresor transitorio, producto de la interacción entre un estado interno inducido por CI y la estimulación repetida durante el entrenamiento. Si esta postulación fuese correcta, la CI inyectada inmediatamente **después** del entrenamiento mostraría un efecto amnésico a 24 hs, ya que no se produciría la interacción referida. Por ello, los siguientes dos experimentos fueron realizados con la CI administrada después del entrenamiento.

El protocolo de un experimento fue similar al usado anteriormente para experimentos sobre HLT (Tabla 1, A), mientras que el del otro fue similar al de experimentos sobre memoria contextual (Tabla 1, B), aunque en ambos la dosis de CI fue de 20 ug, la inyección fue dada inmediatamente **después** del último ensayo del entrenamiento o del fin de las 2 horas de exposición al contexto.

Tabla 3: Programa de experimentos del punto 3.2.4 del Capítulo 3. Efecto de la cicloheximida (CI) administrada post- entrenamiento.

Tabla 3 A: Efecto de la CI sobre la Habituaación a largo Término (HLT). 24hs entre sesiones.

Experimento	Grupo	Dosis de CI (µg)	Sesión de entrenamiento	Intervalo entre Sesiones (horas).	Sesión de evaluación
			Ensayos de la Sesión de Entrenamiento separados por 171 segundos		Ensayos de la Sesión de Evaluación
1	CT-AG	0	0	24	1
	TR-AG	0	15	=	=
	CT-CI	20	0	=	=
	TR-CI	20	15	=	=

Tabla 3 B: Efecto de la CI sobre la memoria de contexto (MCTX). 24hs entre sesiones.

Experimento	Grupo	Dosis de CI (μg)	Sesión de Entrenamiento	Intervalo Entre Sesiones (horas).	Sesión de Evaluación
			Sesión de Entrenamiento 2 horas de Permanencia en el contexto Asignado		Ensayos de la Sesión de Evaluación separados por 171 segundos . En actómetro
2	DIF-AG	0	Cilindro	24	2
	IG-AG	0	Actómetro	=	=
	DIF-CI	20	Cilindro	=	=
	IG-CI	20	Actómetro	=	=

La **Fig.10a** muestra los resultados de la evaluación del experimento de la HLT. El test de Duncan realizado sobre estos datos, reveló una diferencia significativa entre los grupos AG pero no entre los CI ni entre los controles, indicando que la droga tiene efecto amnésico a las 24 horas si se administra postentrenamiento. Por su parte, la **Fig.10b** muestra los resultados correspondientes al experimento de memoria de contexto, revelando un deterioro en la retención, ya que no surgen diferencias significativas entre los grupos tratados con CI ni entre los controles.

Por lo tanto, cuando CI es administrada postentrenamiento se obtiene amnesia tanto de la HLT como de la memoria contextual. Estos resultados constituyen una indicación favorable a la hipótesis de que la exhibición de una diferencia CT-TR en los grupos CI, después de 24 horas de una inyección preentrenamiento, no representa una retención sino el producto de la interacción entre droga y entrenamiento.

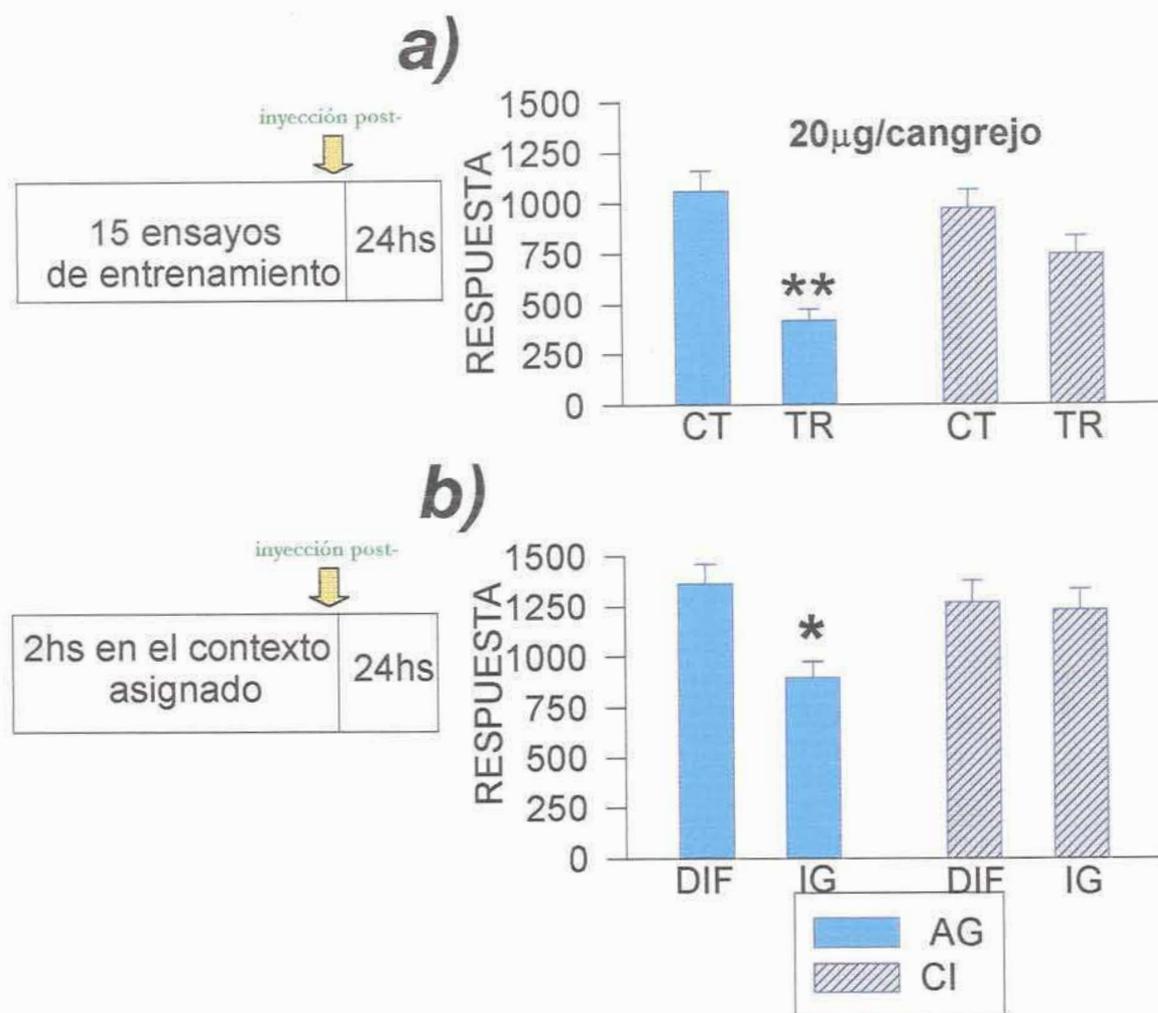


Figura 10: Efecto de la 20µg de CI/cangrejo, administrada después del entrenamiento, sobre la habituación a largo término y la memoria del contexto a 24 horas de la sesión de entrenamiento. a) Experimento de Habitación a largo término (n=35). Los símbolos son como en la Figura 4. b) Experimento de Memoria de contexto (n=35). Los símbolos son como en la Figura 8.

3.2.6 Ventana temporal para el efecto amnésico de CI sobre la HLT (Tabla 3C)

Con el propósito de encontrar la ventana de tiempo del efecto de CI, 2 experimentos más de HLT fueron realizados con la administración de 20 µg de CI 2 y 6 horas después del entrenamiento.

Tabla 3C: Programa del experimento del punto 3.2.5 del Capítulo 3. Efecto de la cicloheximida (CI) administrada postentrenamiento sobre la habituación a largo Término (HLT). Ventana temporal para el efecto de CI

Experimento	Grupo	Dosis de CI (μg)	Sesión de entrenamiento	↓	Sesión de evaluación
			Ensayos de la Sesión de Entrenamiento separados por 171 segundos	Intervalo entre Sesiones (horas).	Ensayos de la Sesión de Evaluación
1 Inyección 2hs después De la Sesión de Entrenamiento	CT-AG	0	0	24	1
	TR-AG	0	15	=	=
	CT-CI	20	0	=	=
	TR-CI	20	15	=	=
2 Inyección 6hs después De la Sesión de Entrenamiento	CT-AG	0	0	24	1
	TR-AG	0	15	=	=
	CT-CI	20	0	=	=
	TR-CI	20	15	=	=

Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. 11**. Se observa que el efecto amnésico surge cuando la CI fue administrada 2 horas después del entrenamiento (**Fig.11a**). En cambio cuando la droga se inyectó 6 horas después del entrenamiento, la retención no se vio afectada por la CI (**Fig.11b**).

Así, la administración de estas dos inyecciones diferidas con respecto a la finalización del entrenamiento, nos permitió establecer una ventana temporal. El límite máximo antes del cual el inhibidor parece tener que ser administrado, esta entre las 2 y 6 horas después del entrenamiento.

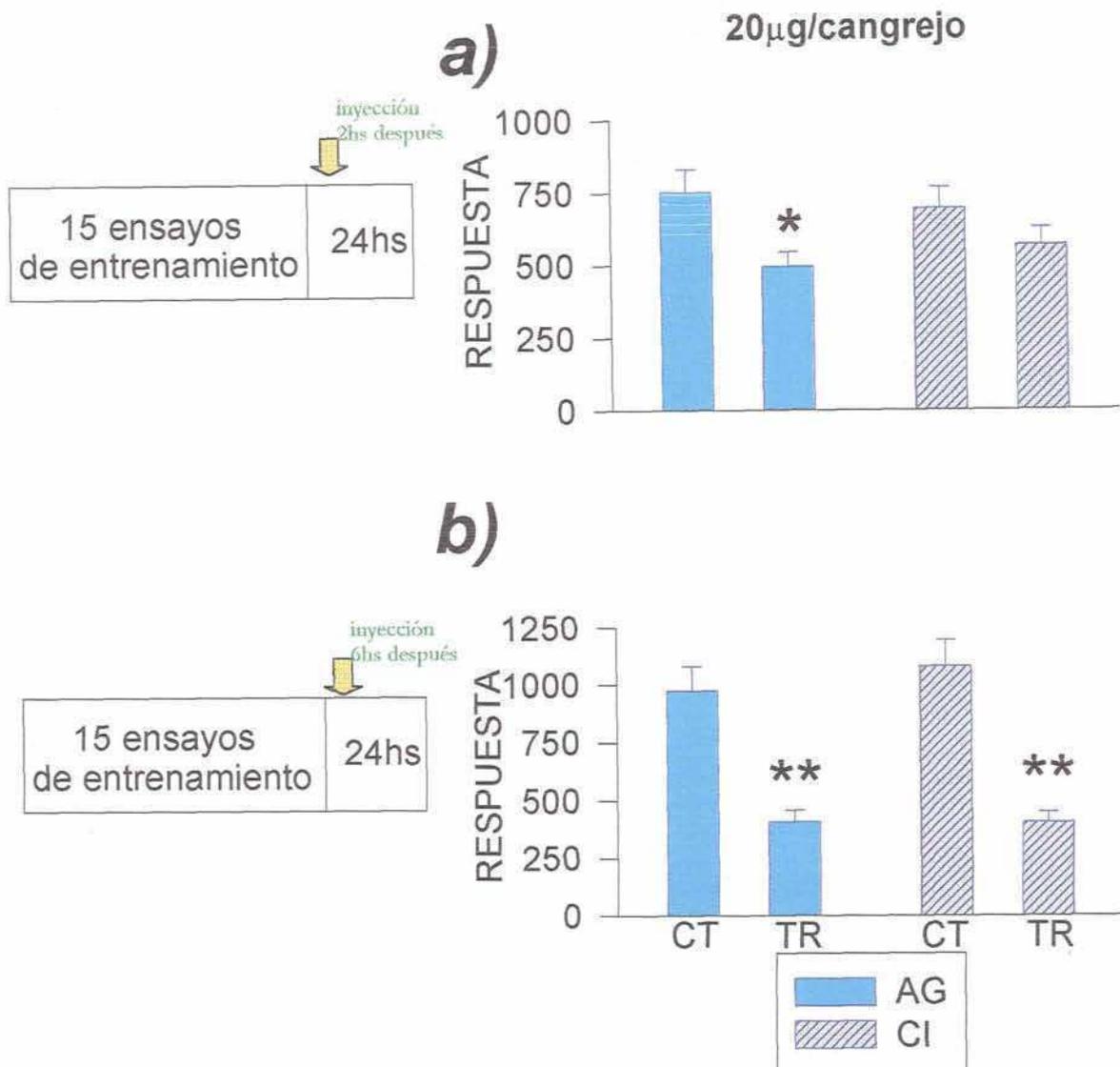


Figura 11: Efecto de la 20 μ g de CI/cangrejo, administrada después del entrenamiento, sobre la habituación a largo término y la memoria del contexto a 24 horas de la Sesión de entrenamiento. a) Experimento de Habitución a largo término (n=40); inyección 2 hs después del entrenamiento. Los símbolos son como en la Figura 4. b) Experimento de Habitución a largo término (n=40); inyección 6 hs después del entrenamiento. Los símbolos son como en la Figura 4.

4. DISCUSION

Una única inyección de 10-20 μ g de CI administrada antes o después del entrenamiento, induce un cambio comportamental que no puede ser explicado en otros términos que no sean los de un efecto amnésico de la

droga. Primero, no se encontraron diferencias significativas entre los controles en ninguno de los experimentos realizados, por lo cual la falta de retención no es atribuible a un efecto incremental inespecífico sobre la respuesta. Segundo, los cangrejos amnésicos exhiben un aumento en el nivel de respuesta, por lo tanto, el efecto de CI no es atribuible a una asociación entre el malestar inducido por la droga y la situación experimental (Nakajima, 1974). Tercero, los animales inyectados con CI antes del entrenamiento, no muestran alteración en la actividad exploratoria espontánea ni la reactividad, descartándose así una explicación en términos de efectos sobre el nivel de motivación (Montarolo et. al., 1986). Cuarto, el deterioro en la memoria se observa cuando la droga es administrada 2 pero no 6 hs después del entrenamiento, un resultado difícilmente compatible con cualquier explicación que atribuya el déficit en la retención a una secuela inespecífica de la inyección de CI. Por último, la exclusión de la dependencia de estado en el aprendizaje como argumentación alternativa, apoya la hipótesis de que el efecto amnésico implica una falla en la formación de la memoria pero no un déficit en la habilidad de recuperar información.

Junto con los efectos amnésicos, la CI produce una inhibición de la síntesis de proteínas que desaparece 24 hs después de la inyección. El límite máximo de la ventana de tiempo durante la cual la administración del inhibidor exhibe efecto amnésico, está entre las 2 y 6 hs después del entrenamiento.

A esta altura del análisis de los resultados, debemos discutir lo que parece ser una excepción a las conclusiones anteriores. Concretamente, 24 horas después de la administración preentrenamiento de CI, se exhibe amnesia de contexto pero no de HLT. Esta disparidad con lo observado después de 72 horas, podría ser explicada por la hipótesis del efecto gradual (Flood et. al., 1972), pero ofrecemos aquí una explicación alternativa. El aparente fracaso de CI preentrenamiento en inducir amnesia administrada a 24 horas, podría deberse a un efecto depresor inespecífico sobre la respuesta de escape. Tal efecto depresor, resultaría de la interacción, durante el entrenamiento, entre el efecto estresante provocado por la

estimulación iterativa y el estado interno inducido por la CI. A favor de ello, está el hecho que se observa retención a 24 horas, cuando el antibiótico es administrado inmediatamente después del entrenamiento, esto es, en ausencia de la interacción entre el entrenamiento y el estado interno inducido por la droga. Resultados similares se obtuvieron en experimentos con Chasmagnathus en donde se induce amnesia por la administración de etanol (Saraco & Maldonado, 1995).

En suma, la amnesia del contexto implica inevitablemente amnesia en la habituación a largo termino, un resultado consistente con la contexto especificidad informada para el modelo (Tomsic et. al. ,1993).

CAPITULO 4

*ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE ACTINOMICINA-D
CON EL DE CICLOHEXIMIDA SOBRE LA HABITUACION A
LARGO TERMINO Y LA MEMORIA CONTEXTUAL.*

1. INTRODUCCION

La demostración de que el almacenaje mnésico requiere síntesis *de novo* de proteínas, representa un hallazgo pivotal en la caracterización a nivel molecular de la memoria a largo termino (Alkon et.al., 1987; Anokhin & Rose, 1991; Bailey et. al., 1992; Campeau et. al., 1991;Montarolo et. al., 1986). El deterioro de la retención debido a la administración de CI, analizado para Chasmagnathus en el Capítulo 3, podría ser tomado como otro ejemplo de dicho requerimiento. Sin embargo, algunos investigadores advierten sobre la posibilidad de que la amnesia producida por la administración de un antibiótico pueda deberse a una acción no correlacionada con la inhibición de la síntesis de proteínas, por ejemplo, el deterioro de la acción de la tiroxina hidroxilasa en vertebrados (Barraco et. al., 1981; Gold & Sternberg, 1978; Lundgren & Carr,1978). De ahí entonces que se plantee la necesidad de evidencias adicionales para aceptar, sin ambigüedades que el efecto amnésico provocado por una droga sea atribuido a la inhibición de la síntesis de proteínas. Una de esas evidencias, sería el hecho que drogas diferentes a la CI, tanto en estructura como en mecanismo de acción, tuviesen igualmente efecto amnésico e inhibidor sobre la síntesis de proteínas (Booth, 1973).

Consecuentemente, el propósito principal de este Capítulo es realizar experimentos paralelos con CI y un inhibidor total de la síntesis de ARN, la Actinomicina-D (AD), y comparar sus efectos amnésicos sobre la HLT y la memoria contextual del cangrejo.

2. METODOS

2.1 Diseño experimental

A lo largo de este Capítulo se llevaron a cabo dos tipos de experimentos: uno orientado a evaluar comparativamente el efecto de CI y ACT sobre la HLT, y el otro, evaluar la acción de las drogas sobre la MCTX.

2.1.1 Experimentos sobre habituación a largo término (Tabla 4, A).

El protocolo general para cada uno de estos experimentos incluía 4 grupos de igual número de animales ($n= 30-40$). Dos grupos eran inyectados con agua (grupos AG) y otros con la droga [actinomicina-D (grupos AD) o cicloheximida (grupos CI)]. A su vez, un grupo de cada par era entrenado (grupo entrenados, TR) mientras que el otro permanecía durante toda la sesión de entrenamiento en los actómetros pero sin recibir la estimulación de la pantalla (grupo control, CT). Por lo tanto, los grupos eran: CT-AG, TR-AG, CT-AD y TR-AD en los experimentos que se evalúa el efecto de la actinomicina-D; mientras que en los experimentos en los que se evalúa la acción de la cicloheximida, los grupos eran: CT-AG, TR-AG CT-CI y TR-CI. En la sesión de entrenamiento los grupos TR recibían 15 ensayos con un intervalo entre ensayos de 171 seg. El intervalo entre sesiones era de 24 horas. La sesión de evaluación consistía en un ensayo.

Tabla4: Protocolo general correspondiente a Experimentos del Capítulo 4

Tabla 4 A: Experimentos de Habituaación a Largo Término.

Grupos	Inyección pre- Sesión de Entrenamiento		Intervalo Entre Sesiones	Inyección post- Sesión de Evaluación	
	Fase contextual	Fase de estimulación		Fase contextual	Fase de estimulación
Grupo Entrenado (TR)	15 minutos	15 ensayos. Separados por 171 segundos	24 horas	15 minutos	1 ensayo
Grupo Control (CT)	60 minutos	-----	24 horas	15 minutos	1 ensayo

2.1.2 Experimentos sobre memoria del contexto (Tabla 4, B).

El protocolo general para estos experimentos incluía 4 grupos de igual número de animales (n= 30-40). Dos grupos eran inyectados con agua (grupos AG) mientras que los otros dos eran inyectados con la droga [actinomicina-D (grupos AD) o cicloheximida (grupos CI)]. A su vez, un grupo de cada par permanecía dos horas en los actómetros usuales durante la sesión de “entrenamiento” (grupo de igual contexto, IG), mientras que el otro permanecía las dos horas en recipientes cilíndricos de plástico transparente con el fondo cubierto por una capa de arena húmeda (cilindros), ubicados en cajas poco iluminadas, es decir, en un contexto de claves visuales y táctiles muy diferentes a los actómetros (grupo de diferente contexto, DIF). Los grupos resultantes eran: DIF-AG, IG-AG, DIF-CI e IG-CI, cuando la droga era CI; o DIF-AG, IG-AG, DIF-AD e IG-AD, cuando la droga es AD.

El intervalo entre sesiones, era de 24 horas. La sesión de evaluación consistía de dos ensayos con un intervalo de 171 seg., dados en los actómetros usuales del equipo. Por lo tanto, grupos DIF-AG, DIF-AD y DIF-CI, en contraste con lo que ocurría en los grupos IG-AG, IG-AD e IG-CI, transcurrían el entrenamiento en un contexto diferente a aquel de la evaluación .

Tabla 4 B: Experimentos de Memoria de Contexto

Grupos	↓ Inyección pre- Sesión de Entrenamiento	Intervalo Entre Sesiones	↓ Inyección post- Sesión de Evaluación	
	Fase contextual		Fase contextual	Fase de Estimulación
Grupo Entrenado (IG)	2 horas de permanencia. En el actómetro.	24 horas.	15 minutos.	2 ensayos separados por 171 segundos. En actómetro
Grupo Control (DIF)	2 horas de permanencia. En el cilindro.	24 horas.	15 minutos.	2 ensayos separados por 171 segundos. En actómetro

2.2 Inyección

El agua destilada ó la solución de AD o de CI, se administraban a través de la membrana céfalotorácica-abdominal. En los experimentos en los que la administración se hacía antes del entrenamiento (**preentrenamiento**), la inyección se daba 15 minutos antes del comienzo de la sesión. En los que la administración era después del entrenamiento (**postentrenamiento**), la inyección se hacía inmediatamente después de la finalización de la sesión. La actinomicina-D y la cicloheximida fue adquirida en SIGMA Co.

2.3 Análisis de datos y evaluación del efecto amnésico

El método de análisis utilizado en este Capítulo fue similar al utilizado en el anterior. Se consideró, que había efecto amnésico debido a un tratamiento cuando aplicando un test de Duncan sobre los datos de la sesión de evaluación, no surgían diferencias significativas entre los grupos tratados con la AD (CT-AD vs. TR-AD ó DIF-AD vs. IG-AD) ó CI (CT-CI vs. TR-CI ó DIF-CI vs. IG-CI). De no haber efecto inespecífico de la droga no se esperaban diferencias entre los grupos controles (CT-AG vs. CT-AD ó CT-AG vs. CT-CI) de cada experimento.

2.4 Método bioquímico

Para determinar el efecto secundario que representa el grado de inhibición de síntesis de proteínas en los ganglios cerebral y torácico, por la administración de AD, se utilizó una mezcla de aminoácidos marcados con C¹⁴. Se eligió el tiempo de 1 hora de exposición a la AD (de acuerdo con el tiempo que dura el entrenamiento de 15 ensayos separados por 171 seg). Se comparó

la radioactividad específica relativa en los animales tratados con la droga contra los controles inyectados con agua, calculándose así el porcentaje de inhibición para cada grupo.

El protocolo experimental utilizado fue el siguiente: Los cangrejos eran inyectados con AG ó AD en dosis de 0.62µg por animal. Una o veintitrés horas después, se les administraba con una mezcla de aminoácidos marcados [2 µCi/cangrejo, C¹⁴ (U)] de Dupont-NEN (Boston, Masachusset) en 50µl de agua destilada. Los animales eran ubicados en recipientes individuales con el fondo cubierto con un papel de filtro durante una hora, se los sacrificaba, e inmediatamente se les removían los ganglios.

Los ganglios de un mismo grupo (8 ganglios, correspondientes a 4 cangrejos) se trataban en forma conjunta, de manera que cada grupo era representado por una muestra.

Inmediatamente luego de la extracción, los ganglios eran sumergidos en nitrógeno líquido, homogeneizadas en 0.5 ml de cloroformo:metanol (3:2) frío en un homogeneizador manual de vidrio, y el material suspendido transferido a tubos de centrifuga. El homogeneizador se enjuagaba con 0.5 ml de la misma solución, la que se agregaba al homogenato. Los tubos se centrifugaban a 5000rpm durante 10 minutos. El precipitado se enjuagaba con 1ml de cloroformo:metanol:agua (1:16:16) y se centrifugaba nuevamente a 5000 rpm durante 10 minutos; el sobrenadante se descartaba y el precipitado se resuspendía en 200 µl cloroformo:metanol:agua (1:16:16) con un vortex, tomándose una muestra de 10µl para la determinación de proteínas usando una versión modificada del método de Bradford (Boccaccio, Quesada-Allué, 1989; Bradford,1976). Se agregaba tricloroacético al 10% frío a la suspensión y, se filtraba a través de papel de filtro de vidrio GF/C (whatman) empleando una bomba de vacío. El filtro se secaba bajo una lámpara infrarroja, se transferían a viales de 3 ml de centelleo con líquido de centelleo de tolueno, y se contaba. Los papeles de filtro de la base de los recipientes también eran contados en viales de 20 ml.

Los porcentajes de inhibición se calculaban comparando la radioactividad específica relativa en los animales tratados con la droga, contra los controles inyectados con agua.

3. RESULTADOS

3.1 Resultados de los experimentos sobre inhibición de la incorporación de aminoácidos marcados.

Una hora después de la administración de AD, la incorporación de precursores en proteínas se vio disminuido en un 59.7%. No se observó inhibición 24 horas después de la administración del antibiótico. Los valores de marca en los papeles de filtro de los recipientes contenedores, fueron similares al blanco, lo que sugiere que no hubo excreción del material radiactivo durante la hora de espera entre su administración y el sacrificio.

3.2 Resultados de experimentos comportamentales.

3.2.1 **Malestar y mortandad luego de la administración de diferentes dosis de actinomicina-D (AD).**

Cuando se les administraba a los cangrejos dosis de 10^{-3} M de CI (20 μ g/ animal) no se presentaban efectos inespecíficos. Una molaridad similar de AD (62.75 μ g/ animal) no mostró tampoco efectos inespecíficos inmediatos, pero si una mortalidad de 98% a 24 horas después de la administración de la droga. El número de muertes mermó a medida que se fue disminuyendo la dosis, no apareciendo efecto letal con 0.62 μ g (**Fig.12**). Los animales que sobrevivían a dosis mayores, mostraron frecuentemente, pérdida de apéndices locomotores,

fenómeno conocido como autotomía (Fredericq, 1883) como así también una disminución en la reactividad ante el pasaje de la pantalla.

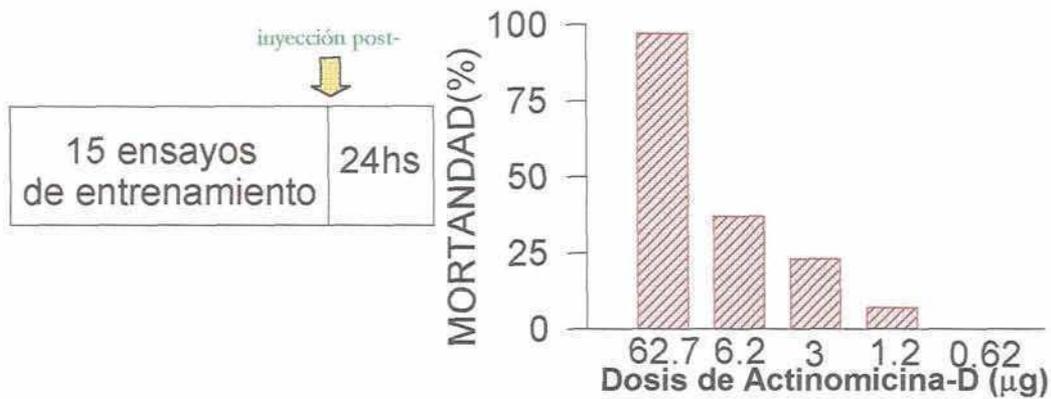


Figura 12: Porcentaje de mortandad producido por diferentes dosis de AD. Ordenadas: mortandad (expresada como porcentaje del total de animales tratados). Abscisas: dosis de actinomicina-D (µg/animal).

3.2.2 La administración de la AD antes del entrenamiento no afecta la habituación a corto término (HCT).

Realizamos un experimento enfocado a evaluar el efecto de la AD sobre la respuesta de escape. Constaba de dos grupos, uno tratado con AG y el otro con 0.62 µg de AD. Luego de la inyección, se sometía a los animales a una sesión de entrenamiento de 15 ensayos separados por 171 seg.

La **Fig.13** muestra los resultados obtenidos durante los 15 ensayos de la sesión. La gran similitud de la respuesta entre grupos es manifiesta, sugiriendo así que la administración de AD no afecta la HCT ante un estímulo de peligro.

Una ANOVA de 2x15 de medidas repetidas realizada sobre estos datos mostró un efecto significativo de los ensayos $F(14,1092)=26.5$ $p < 0.05$, pero no

surgieron diferencias ni entre los grupos ni interacción [$F(1, 78)=3.5$ y $F(14, 1092)= 0.68$, respectivamente].

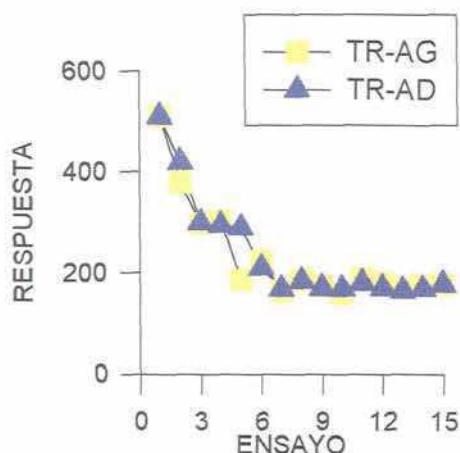


FIGURA13: Efecto de la AD sobre la HCT (n=31): Los cuadrados amarillos representan los valores de la respuesta de animales tratados con agua(AG). Triángulos azules representan los valores de respuesta de animales tratados con actinomicina-D (AD). Medición de la HCT. Abscisas: ensayos. Ordenadas: valor de la respuesta de escape

De acuerdo con esto, y con lo mostrado en el capítulo anterior con CI, podemos concluir que ambos antibióticos no afectan la HCT. Estos resultados coinciden con los obtenidos recurrentemente en otros experimentos con distintas especies animales (Barraco & Stettner, 1976, Bennett et. al, 1975; Gibbs & Ng, 1977).

3.2.3 Efecto a las 24 horas de la AD y de la CI administrada inmediatamente después del entrenamiento, sobre la habituación a largo término y la memoria contextual (Tabla 5).

El propósito de los siguientes cuatro experimentos fue comparar el efecto de AD (0.62 μg /cangrejo) con el de CI (20 μg /animal), ambas administradas inmediatamente después de finalizada la sesión de entrenamiento, sobre la HLT y la MCTX. Elegimos comenzar con las inyecciones postentrenamiento, dado que, con uno de los inhibidores (CI) conocíamos su efecto amnésico sobre ambos procesos mnésicos.

A) Efecto sobre la HLT (Tabla 5 A). Se usó el protocolo general para experimentos de habituación (Tabla 4 A), eligiéndose la dosis de AD que no había mostrado mortandad (3.2.1), y la dosis de CI que resultó efectiva en experimentos anteriores. Conforme a dicho protocolo, se formaron en cada experimento los cuatro grupos usuales: CT-AG, TR-AG, CT-AD y TR-AD para el de actinomicina-D (Ex 1); y, CT-AG, TR-AG, CT-CI y TR-CI para el de cicloheximida (Ex 2). Después de 24 horas de intervalo, todos eran sometidos a la sesión de evaluación de 1 ensayo.

Tabla 5: Programa de experimentos del punto 3.2.3 del Capítulo 4. Efecto de la actinomicina-D (AD) y de la cicloheximida (CI) administrada postentrenamiento.

Tabla 5 A : Efecto de la AD y de la CI sobre la Habituación a largo Término (HLT)

Experimento	Grupo	Dosis de AD ó CI (µg)	Sesión de entrenamiento	Intervalo Entre Sesiones (horas).	Sesión de evaluación
			Ensayos de la Sesión de Entrenamiento separados por 171 segundos		Ensayos de la Sesión de Evaluación
1	CT-AG	0	0	24	1
	TR-AG	0	15	=	=
	CT-AD	0.62	0	=	=
	TR-AD	0.62	15	=	=
2	CT-AG	0	0	24	1
	TR-AG	0	15	=	=
	CT-CI	20	0	=	=
	TR-CI	20	15	=	=

Un test de Duncan realizado sobre los datos de la sesión de evaluación (EX 1, **Fig14a**), mostró, conforme a las predicciones, diferencias significativas entre los grupos AG, pero no entre los grupos AD ni entre los grupos controles. Por otro lado, el análisis de los datos del experimento de CI (EX2, **Fig14b**), concuerda nuevamente con las predicciones, es decir, surgieron diferencias significativas entre los grupos AG, pero no entre los grupos CI.

Estos resultados indican que ambas drogas administradas después del entrenamiento, tienen un efecto amnésico sobre la HLT.

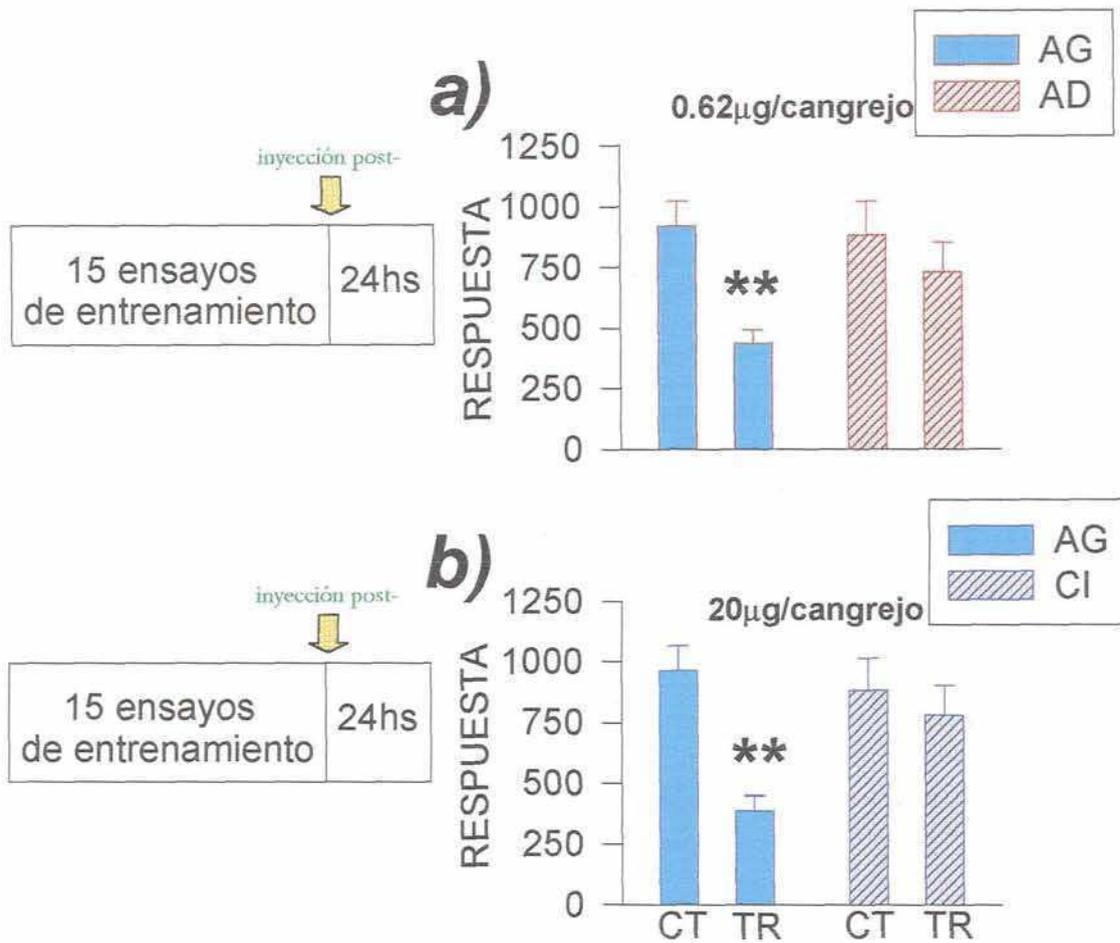


FIGURA 14: Efecto de la actinomicina-D (AD) y de la cicloheximida (CI), administrada después del entrenamiento, sobre la habituación a largo término a 24 horas de la Sesión de entrenamiento (15 ensayos separados por 171 seg. a) Grupos-AD inyectados con 0.62µg/cangrejo. (n=30); b) 20µg de CI/cangrejo (n=35). Las barras celeste representan los grupos inyectados con agua antes del entrenamiento (grupos-AG); las barras grises rayadas con rojo representan los grupos inyectados con actinomicina-D (grupos-AD); las barras grises rayadas con azul representan los grupos inyectados con cicloheximida (grupos-CI). Ordenadas: media del valor de la respuesta de escape por grupo. Abscisas: CT, un grupo control (CT-AG, CT-AD,CT-CI); TR, un grupo entrenado (TR-AG, TR-AD, TR-CI). Test de Duncan: * convención para $p < 0.05$ y ** para $p < 0.01$, en comparaciones entre grupos-AG, entre grupos-AD, o entre grupos-CI.

B) Efecto sobre la MCTX (Tabla 5 B). Se utilizó el protocolo general para experimentos de memoria de contexto (Tabla 5 B), eligiéndose la dosis de AD y de CI que resultó efectiva en experimentos anteriores. Se formaron los cuatro grupos usuales para cada experimento: DIF-AG, IG-AG, DIF-AD y IG-AD para el de actinomicina-D (Ex 1); y, DIF-AG, IG-AG, DIF-CI y IG-CI para el de cicloheximida (Ex 2). Después de 24 horas de intervalo, todos eran sometidos a la sesión de evaluación de 2 ensayos.

B) Efecto de la AD y de la CI sobre la Memoria de Contexto (MCTX)

Experimento	Grupo	Dosis de AD ó CI (µg)	Sesión de Entrenamiento	Intervalo Entre Sesiones (horas).	Sesión de Evaluación
			Sesión de Entrenamiento 2 horas de permanencia en el contexto asignado		Ensayos de la Sesión de Evaluación separados por 171 segundos . En actómetro
1	DIF-AG	0	Cilindro	24	2
	IG-AG	0	Actómetro	=	=
	DIF-AD	0.62	Cilindro	=	=
	IG-AD	0.62	Actómetro	=	=
2	DIF-AG	0	Cilindro	24	2
	IG-AG	0	Actómetro	=	=
	DIF-CI	20	Cilindro	=	=
	IG-CI	20	Actómetro	=	=

Un test de Duncan realizado sobre los datos de la sesión de evaluación (EX 1, **Fig15a**), reveló, conforme a las predicciones, una diferencia significativas entre los grupos AG, pero no entre los grupos AD ni entre los grupos controles. Por otro lado, los resultados del experimento de CI (EX2, **Fig15b**), concuerda nuevamente con las predicciones, es decir, se hallaron diferencias significativas entre los grupos AG, pero no entre los grupos CI. La ausencia de diferencias entre los grupos tratados con los antibióticos en cada

experimento sugiere que en ambos casos se produce un efecto amnésico inducido por la administración de la droga.

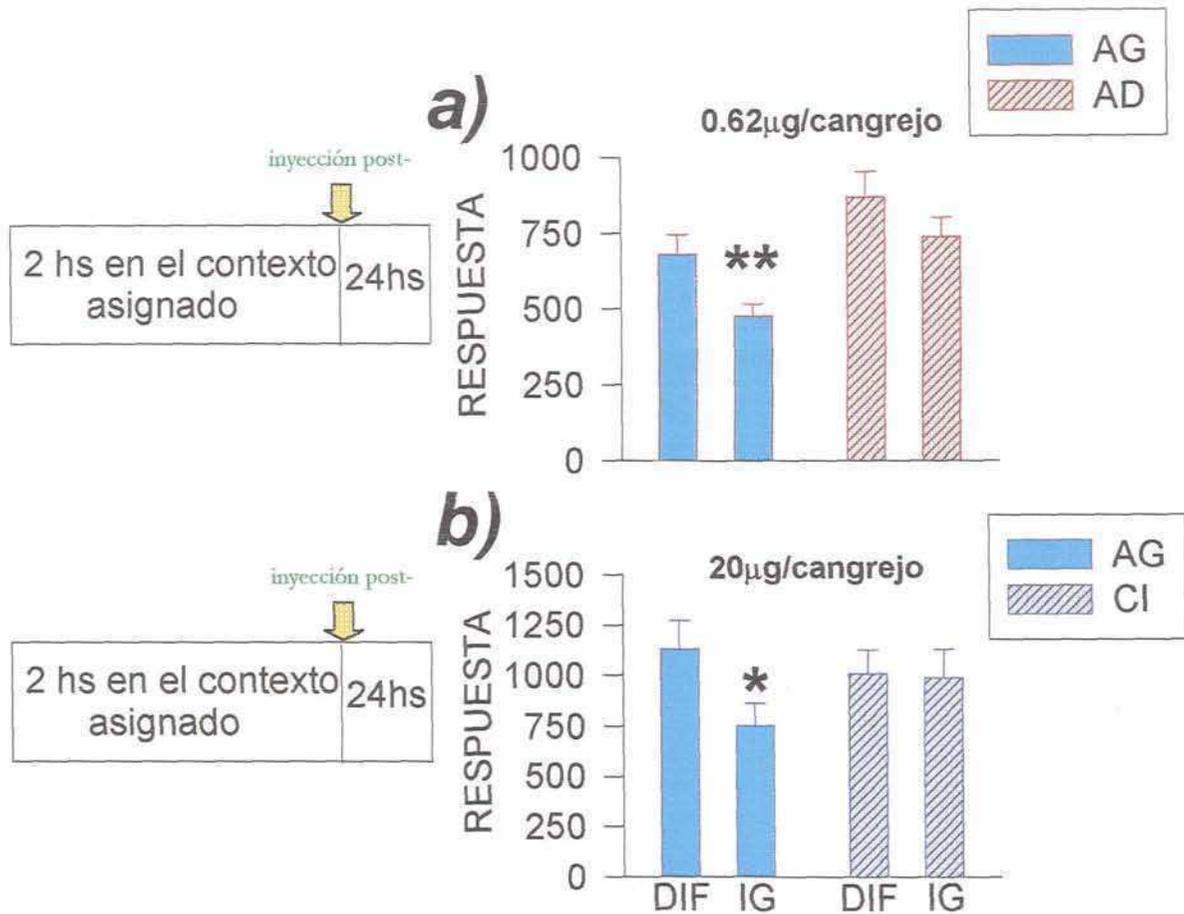


FIGURA 15: Efecto de la AD y de la CI administrada después del entrenamiento, sobre la Memoria de Contexto a 24 horas de la Sesión de entrenamiento. a) Grupos-AD inyectados con 0.62µg/cangrejo.(n=40); b) 20µg de CI/cangrejo (n=33). Las barras celestes representan los grupos inyectados con agua antes del entrenamiento (grupos-AG); las barras grises rayadas con azul representan los grupos inyectados con cicloheximida (grupos-CI); las barras grises rayadas con rojo representan los grupos inyectados con actinomicina-D (grupos-AD). Ordenadas: media del valor acumulativo de los dos ensayos de la respuesta de escape por grupo. Abscisas: DIF, un grupo que permanece en los cilindros durante el Entrenamiento y son evaluados con 2 ensayos en los actómetros (DIF-AG, DIF-AD; DIF-CI); IG, un grupo entrenado y evaluados en los actómetros (IG-AG, IG-AD, IG-CI). Test de Duncan: * convención para $p < 0.05$ y ** para $p < 0.01$, en comparaciones entre grupos-AG , grupos-AD o entre grupos-CI.

Cabe destacar que, coincidentemente con lo obtenido en el Capítulo anterior, las drogas muestran un efecto disruptor sobre ambos procesos mnésicos cuando son administradas después del entrenamiento.

Experimentos previos con la CI, mostraron un resultado inesperado: se obtenía un efecto amnésico de la droga sobre el contexto pero no sobre la HLT cuando se la administrada **antes** del entrenamiento y se evaluaban los grupos a 24 horas. El objetivo de los experimentos siguientes fue analizar si se repetía este patrón de resultados cuando la droga utilizada era la AD.

3.2.4 Efecto a las 24 horas de la AD y de la CI administradas antes del entrenamiento, sobre la habituación a largo término y la memoria contextual (Tabla 6)

A)Efecto sobre la HLT (Tabla 6 A). Con el objetivo de estudiar el efecto de ambas drogas sobre el proceso de HLT, cuando son administradas antes del entrenamiento, se realizaron los dos experimentos siguientes. El diseño experimental (Tabla 4 A) fue similar a los anteriores, salvo que en este caso, las inyecciones se daban antes de que comience la sesión de entrenamiento. Conforme a dicho protocolo se formaron en cada experimento los cuatro grupos usuales: CT-AG, TR-AG, CT-AD y TR-AD para el de actinomicina-D (Ex 1); y, CT-AG, TR-AG, CT-CI y TR-CI para el de cicloheximida (Ex 2). Después de 24 horas de intervalo, todos eran sometidos a la sesión de evaluación de 1 ensayo.

Tabla 6: Programa de experimentos del punto 4.4 del Capítulo 4. Efecto de la actinomicina-D (AD) y de la cicloheximida (CI) administrada preentrenamiento.

Tabla 6 A: Efecto de la AD y de la CI sobre la Habituación a largo Término (HLT).

Experimento	Grupo	Dosis de AD ó CI (µg)	Sesión de entrenamiento	Intervalo entre Sesiones (horas).	Sesión de evaluación
			Ensayos de la Sesión de Entrenamiento separados por 171 segundos		Ensayos de la Sesión de Evaluación
1	CT-AG	0	0	24	1
	TR-AG	0	15	=	=
	CT-AD	0.62	0	=	=
	TR-AD	0.62	15	=	=
2	CT-AG	0	0	24	1
	TR-AG	0	15	=	=
	CT-CI	20	0	=	=
	TR-CI	20	15	=	=

Los resultados de la sesión de evaluación se muestran en la **Fig.16**.

El test de Duncan muestra diferencias significativas tanto entre los grupos AG como entre los tratados con AD, pero no entre los grupos controles, en el primer experimento (EX1, **Fig. 16a**). Surgieron también diferencias significativas entre los AG y entre los grupos CI, pero no entre los controles, en el segundo (EX2, **Fig. 16b**). Así, la administración de AD y de CI antes del entrenamiento parece no provocar una disminución en la retención de la HLT.

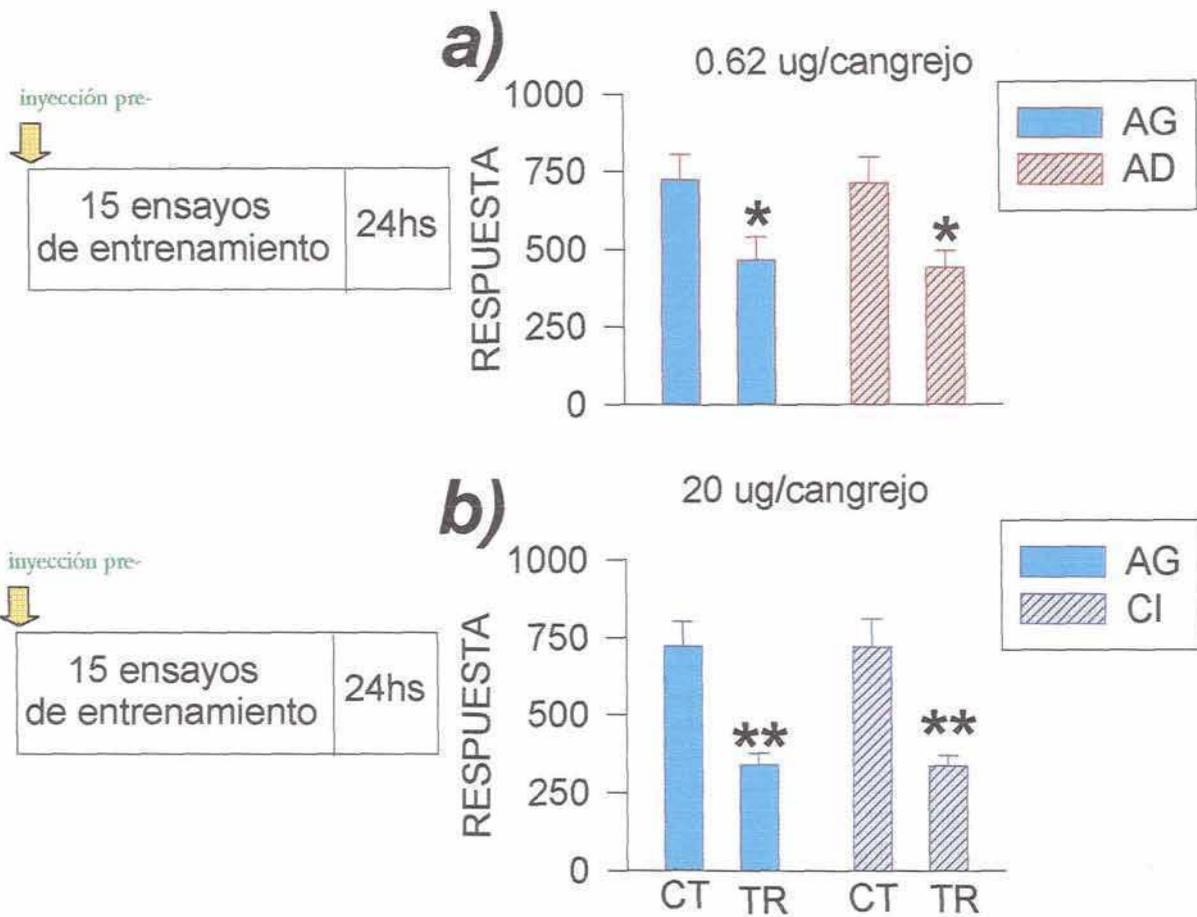


Figura 16: Efecto de la actinomicina-D (AD) y de la cicloheximida (CI), administrada antes del entrenamiento, sobre la habituación a largo término a 24 horas de la sesión de entrenamiento (15 ensayos separados por 171 seg.) a) Grupos-AD inyectados con 0.62µg/cangrejo.(n=31); b) 20µg de CI/cangrejo (n=32). Los símbolos son como en la Fig. 14

B) Efecto sobre la MCTX (Tabla 6B). Se usó el protocolo general para experimentos de memoria de contexto (Tabla 4 B), eligiéndose las dosis iguales a las utilizadas en los experimentos de HLT. Los grupos para cada experimento eran: DIF-AG, IG-AG, DIF-AD y IG-AD para el de actinomicina-D

(Ex 1); y, DIF-AG, IG-AG, DIF-CI y IG-CI para el de cicloheximida (Ex 2). Después de 24 horas de intervalo, todos eran sometidos a la sesión de evaluación de 2 ensayos.

Tabla 6B: Efecto de la AD y de la CI sobre la Memoria de Contexto (MCTX)

Experimento	Grupo	Dosis de AD ó CI (μg)	Sesión de Entrenamiento	Intervalo Entre Sesiones (horas).	Sesión de Evaluación
			Sesión de Entrenamiento 2 horas de permanencia en el contexto asignado		Ensayos de la Sesión de Evaluación Separados por 171 segundos . En actómetro
1	DIF-AG	0	Cilindro	24	2
	IG-AG	0	Actómetro	=	=
	DIF-AD	0.62	Cilindro	=	=
	IG- AD	0.62	Actómetro	=	=
2	DIF-AG	0	Cilindro	24	2
	IG-AG	0	Actómetro	=	=
	DIF-CI	20	Cilindro	=	=
	IG-CI	20	Actómetro	=	=

Un test de Duncan realizado sobre los datos de la sesión de evaluación (EX , **Fig17a**), reveló, conforme a las predicciones, una diferencia significativas entre los grupos AG, pero no entre los grupos AD ni entre los grupos controles. Por otro lado, el análisis de los resultados del experimento de CI (EX2, **Fig17b**), concuerda nuevamente con las predicciones, es decir, se manifestaron diferencias significativas entre los grupos AG, pero no entre los grupos CI. La ausencia de diferencias entre los grupos tratados con los antibióticos en cada experimento sugiere que, en ambos casos, se produce un efecto amnésico inducido por la administración de la droga.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que 0.62 μg /por animal de AD y de 20 μg /por animal de CI parecen impedir la formación de la memoria de contexto a 24 horas, pero fallan en producir un déficit en la retención de la respuesta habituada.

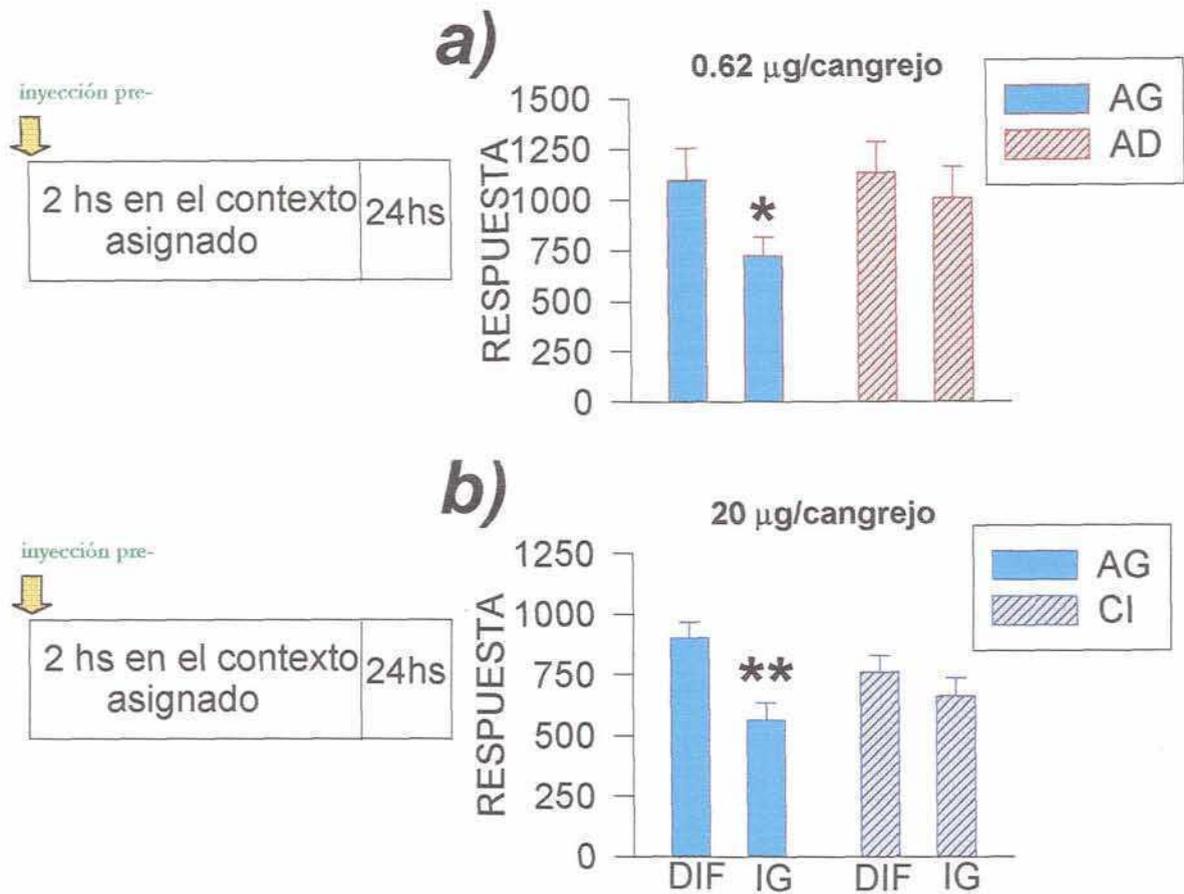


FIGURA 17: Efecto de la AD y de la CI administrada después del entrenamiento, sobre la Memoria de Contexto a 24 horas de la sesión de entrenamiento. a) Grupos-AD inyectados con 0.62 μ g/cangrejo.(n=30); b) Grupos-CI inyectados con 20 μ g de CI/cangrejo (n=35). Las símbolos son como en la Fig.15.

4. DISCUSION

La administración de CI y AD después del entrenamiento, muestra un efecto decremental tanto sobre la HLT como sobre la memoria de contexto, a 24 horas. Los argumentos apoyando la hipótesis de que el efecto decremental de AD representa un caso de amnesia, son similares a los ya dados en el Capítulo 3 en relación a la CI. Por otro lado, no se observa un cambio en la reactividad cuando se administran los antibióticos antes del entrenamiento, resultado que contradice la posible acción de los antibióticos sobre el nivel de motivación (Montarolo et,al., 1986).

Al igual que para CI, cuando se administra AD antes del entrenamiento, se exhibe a las 24 horas amnesia de contexto pero no de HLT. Por el contrario, cuando se inyecta AD después el entrenamiento, se revela amnesia en ambos tipos de memoria. Esta disparidad podría ser explicada en los términos de la hipótesis del Capítulo 3. Es decir, el aparente fracaso de AD inyectada antes del entrenamiento en inducir amnesia a 24 horas, se debería a un efecto depresor, inespecífico y transitorio, sobre la respuesta de escape. Tal efecto depresor, resultaría de la interacción, durante el entrenamiento, entre el efecto estresante provocado por la estimulación iterativa y el estado interno inducido por la AD. Dos líneas de evidencias apoyan esta hipótesis. Primero, los animales muestran una disrupción de la HLT y memoria contextual cuando son evaluadas a 72 horas, después de un entrenamiento precedido por la administración de CI, un resultado que concuerda con el carácter transitorio del efecto depresor. En segundo lugar, la administración de cualquiera de los antibióticos y etanol (Saraco & Maldonado, 1996) inmediatamente después del entrenamiento, impide la formación de **ambas** memorias a 24 horas, un resultado acorde con el hecho de que no hay efecto depresor de la respuesta de escape, ya que, el estado interno inducido por la droga no coexiste con el entrenamiento.

La dosis mínima efectiva para inducir amnesia con AD, a las 24 horas, es de 0.62 $\mu\text{g}/\text{animal}$ (0.04 $\mu\text{g}/\text{g}$). Esta es una dosis notablemente baja, ya que considerando que la hemolinfa representa aproximadamente el 30% del peso

(Glesson, Subkoff, 1977), la administración sistémica lleva la droga a una concentración final de 10^{-7} M. Esta dosis es equivalente a las dosis que son efectivas en vertebrados, solo cuando se las administra intracranealmente o en estudios in vitro. La falta de una barrera endotelial sumado a que la hemolinfa es distribuida por un sistema capilar extendido en varias áreas del cerebro (Abbot, 1970; Abbot, 1992), pueden explicar el bajo umbral para la acción de la droga.

Debe destacarse que la inhibición en la síntesis de proteínas producida a la hora por 0.62 μ g de AD, es de 59.7%, contra un 92% obtenida por 20 μ g de CI. El nivel obtenido con AD es el valor límite mínimo necesario para obtener un efecto amnésico por la administración del antibiótico (Davis & Squire, 1984).

Aparte de su efecto amnésico, la AD y la CI solo tienen en común el efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas. La CI actúa directamente sobre la traducción mientras que la AD lo hace en forma indirecta, bloqueando la transcripción de RNA total. Por esto, los resultados obtenidos sostienen la hipótesis de que la memoria a largo término en Chasmagnathus depende de la síntesis *de novo* de proteínas.

CAPITULO 5

*EFECTO DE LA DISTRIBUCION TEMPORAL DE LOS
ENSAYOS DE ENTRENAMIENTO SOBRE LA HABITUACION A
LARGO TERMINO.*

1. INTRODUCCION

Diferentes experimentos con diferentes especies animales, han demostrado lo que parece ser una propiedad universal en la formación de la memoria, es decir, que el entrenamiento espaciado produce una memoria mas robusta y mas persistente que el entrenamiento masivo (Carew et. al., 1972; Frost et. al., 1985, Hintzman,1974). Ultimamente hay un interés renovado en este aspecto del aprendizaje, centrado en analizar el hecho que en formas multi-fásicas de memoria, se ha demostrado que fases separables son afectadas diferencialmente por diversas distribuciones temporales del entrenamiento. Por ejemplo, la memoria consolidada de la evitación olfatoria en Drosophila, consiste en dos componentes de memoria funcionalmente independientes: una memoria resistente a la anestesia (ARM) y una memoria a largo término (LTM). La ARM declina dentro de los cuatro días y puede ser obtenida tanto por entrenamiento espaciado como masivo, mientras la LTM es inducida únicamente por el entrenamiento espaciado, ya sea junto con o en ausencia de ARM (Tully et. al., 1994). En el condicionamiento olfatorio del reflejo de extensión de la probocis, en abeja, la estabilidad de la memoria a largo término depende en forma no monotónica del intervalo entre ensayos (Gerber et. al., 1998). Ratones CREB $\alpha\Delta$ -mutantes presentan deficiencia en la memoria a largo término en diversos paradigmas (condicionamiento contextual de miedo, laberinto acuático de Morris, y reconocimiento social), pero si se extiende el intervalo entre ensayos durante el entrenamiento, se logra eliminar el déficit (Kogan et. al, 1996).

Se ha demostrado que la administración sistémica de diversos agentes facilitatorios de la HLT en Chasmagnathus, como activadores de la PKA o angiotensinas (Romano et. al, 1996; Delorenzi, Pedreira, Romano, Pirola, García, Nahamod & Maldonado, 1996), impactan principalmente en la fase inicial de la evaluación (= **primer ensayo**) con un efecto menos pronunciado en la fase posterior. Estos resultados sugieren la posibilidad de que dos

componentes de memoria estén involucrados en la HLT, es decir, un componente que se expresa principalmente en la primera fase (**primer ensayo** de evaluación), y un segundo componente que lo hace en la última fase (bloque de 2 al 6 ensayo= **reentrenamiento**). Por lo tanto, el propósito del presente capítulo será no solo explorar la relación entre distribución temporal de los ensayos de entrenamiento y el nivel de retención de HLT, sino también, determinar si diferentes distribuciones temporales se expresan en diferentes fases de la evaluación. Finalmente, se intentará establecer hasta que punto la HLT depende de la concordancia entre las frecuencias de estimulación de ambas sesiones, dado que resultados previos han sugerido la presencia del componente de *timing* en la memoria de Chasmagnathus (Lozada, 1993).

2. METODOS

2.1 Diseño experimental

Conforme al esquema básico, sostenido a lo largo de esta Tesis, cada experimento incluía un grupo control (CT) que permanecía en el actómetro durante la primera sesión sin ser estimulado, y otro grupo entrenado (TR). Todos los animales eran sometidos a una **sesión de preentrenamiento**, que consistía en dos ensayos con un intervalo de 9 seg. Los animales eran asignados a cada grupo teniendo en cuenta su nivel de respuesta en el preentrenamiento, de tal modo que resultaba una misma línea base de reactividad para cada grupo del mismo experimento. Aparte del preentrenamiento, otras dos fases estaban presentes en el entrenamiento (Tabla 7): la **fase contextual** en la cual los sujetos permanecían en el actómetro sin recibir estimulación alguna, y la **fase de estimulación** en la cual los animales entrenados eran confrontados con la pantalla pasante. Durante la **fase de estimulación** cada grupo recibía un número fijo de ensayos, separados por un intervalo entre ensayos (IEE) de 0, 9, 27, 45, 81, 135 o 171 seg., de tal modo que el tiempo empleado para esta fase variaba de acuerdo al intervalo utilizado para la estimulación. La fase contextual, entre

preentrenamiento y fase de estimulación, se agregaba para asegurar que el tiempo total de permanencia en el actómetro durante el entrenamiento era igual a la de su grupo control correspondiente. El grupo control no tenía fase de estimulación, por lo tanto, luego del preentrenamiento, el resto de la sesión de entrenamiento estaba solo ocupada por la fase contextual.

La sesión de evaluación era la misma para todos los grupos, y consistía en una fase contextual de 15 min., seguida por una fase de estimulación de 6 ensayos con una frecuencia igual o no a la utilizada anteriormente, según el experimento. Cada experimento constaba de 20 animales.

Tabla7: Protocolo general correspondiente los experimento del Capítulo 5

Sesión de entrenamiento			Sesión de evaluación	
Fase de preentrenamiento	Fase contextual	Fase de estimulación	Fase Contextual	Fase de Estimulación
2 ensayos (IEE=9seg.)	X min.	5,10,15,30, 60,120 o300 ensayos	15 min.	Fase inicial: ensayo1 Fase de reentrenamiento: ensayos 2-6
2 ensayos (IEE=9seg.)	X min.		15 min.	Fase inicial: ensayo 1 Fase de reentrenamiento: ensayos 2-6

Nota: El Intervalo entre Sesiones es de 24 horas

El nivel de respuesta del grupo control en el primer ensayo de la sesión de evaluación era a veces, diferente al obtenido en el primer ensayo del preentrenamiento. Sin embargo, estas diferencias nunca llegaban a ser significativas, y no se observaban tendencias consistentes de aumento o disminución de la respuesta a través de los experimentos.

2.2 Análisis de datos

En experimentos preliminares del Laboratorio, con un entrenamiento de 15 o 30 ensayos y un IEE de 171 seg., se encontró, sin excepción, en la sesión de evaluación a 24 horas, conforme al protocolo de la Tabla 7, una diferencia significativa ($\alpha=.05$) entre CT y TR ($n= 20$ o mas animales). Este tipo de protocolo experimental es considerado un protocolo de **entrenamiento fuerte**, contrastando con el de 10 ensayos o menos, que muy excepcionalmente producían habituación. De acuerdo con esto, las predicciones señalan diferencias significativas durante la evaluación entre CT-TR, excepto cuando la memoria resulta perjudicada por un tratamiento que introduzca algún cambio en las condiciones paramétricas del protocolo fuerte. Por lo tanto, los resultados de la evaluación de este estudio fueron analizados mediante comparaciones planeadas, medias-pesadas por análisis de varianza (ANOVAs) con $\alpha=.05$ (Howell, 1987; Rosenthal & Rosnow, 1985) entre el grupo control y cada grupo entrenado.

Con respecto al análisis de los resultados de la evaluación, se tuvo en cuenta una distinción entre el **primer ensayo** y el bloque de los cinco ensayos restantes (**fase de reentrenamiento**). Este distinguo parece pertinente, ya que los niveles de respuesta en el reentrenamiento, a diferencia de lo que ocurre en el primer ensayo, parecen influenciados por el efecto recordatorio del primer ensayo (Campbell & Jaynes, 1966) y por la congruencia entre el espaciamiento de las dos sesiones. Además, la mayoría de los experimentos sobre HLT muestran que el nivel de respuesta de escape en el primer ensayo de evaluación parecen más sensibles que el del reentrenamiento a cambios en la cantidad de entrenamiento (Tomsic et al, 1993), así como a los agentes amnésicos o hipermnésicos (Pedreira, Dimant, Quesada-Allué & Maldonado, 1995; Pedreira, Dimant & Maldonado, 1996; Romano et. al. 1996^a; Romano et. al., 1996b; Saraco & Maldonado,1995). De acuerdo con esto, las comparaciones en los resultados de la evaluación fueron hechas en forma separada para cada fase, esto es , para el **primer ensayo** y para los cinco siguientes (**reentrenamiento**).

3. RESULTADOS

3.1. Efecto de la variación en el número de ensayos de entrenamiento sobre ambas fases de la evaluación, manteniendo constante el intervalo entre ensayos (IEE=171 seg.)

El IEE de 171 seg. fue utilizado en forma extensiva en nuestro laboratorio (Lozada et. al., 1990; Pedreira et. al., 1995). El propósito de la presente Sección fue evaluar el efecto de diferentes números de ensayos en el entrenamiento con IEE=171 seg., sobre el nivel de respuesta en ambas fases. Se realizaron cuatro experimentos distintos con animales provenientes de diferentes capturas (Tabla 8). Cada experimento incluyó un grupo control CT y un grupo entrenado TR que recibía 30, 15, 10, 5 ensayos en la sesión de entrenamiento, con un IEE de 171 seg. en ambas sesiones. A cada grupo control se lo designó como CT-171 y a cada entrenado 171-171.

Tabla 8: Programa de experimentos correspondientes al punto 3.1. Efecto de la variación del número de ensayos, manteniendo el IEE constante (171 seg.)

	Grupo	Número de Ensayos de entrenamiento	Sesión de Entrenamiento			IEE(seg.) de evaluación
			Intervalo entre ensayos IEE (seg.)	Fase contextual (min.)	Fase de estimulación (min.)	
EXPERIMENTO	1 CT-171	-	-	90	0	171
	171-171	30	171	0	90	171
	2 CT-171	-	-	45	0	171
	171-171	15	171	0	45	171
	3 CT-171	-	-	30	0	171
	171-171	10	171	0	30	171
	4 CT-171	-	-	15	0	171
	171-171	5	171	0	15	171

Los resultados se presentan en la **Fig.18**. Un t-test sobre los datos de 30 y 15 ensayos de entrenamiento (**Fig. 18a** y **Fig. 18b**) revelan diferencias significativas entre CT y TR, tanto para el primer ensayo [$F(1,38)=9.0$, $p<.005$, y $F(1,38)=7.4$, $p<.01$, respectivamente] como para la fase de reentrenamiento

[$F(1,38)=14.0$, $p<.001$, y $F(1,38)=12.5$, $p<.001$, respectivamente]. En cambio, no se hallaron diferencias significativas en algunas de las fases de la evaluación tanto para 10 como para 5 ensayos de entrenamiento (Fig. 18c y Fig. 18d).

Así, centrando el análisis de datos en ambas la fases, primer ensayo y reentrenamiento, el resultado que se obtiene invariablemente en el laboratorio fue confirmado: la HLT se obtiene solo cuando se les da a los cangrejos entrenamientos de 15 o 30 ensayos, esto es, cuando se usa un protocolo fuerte.

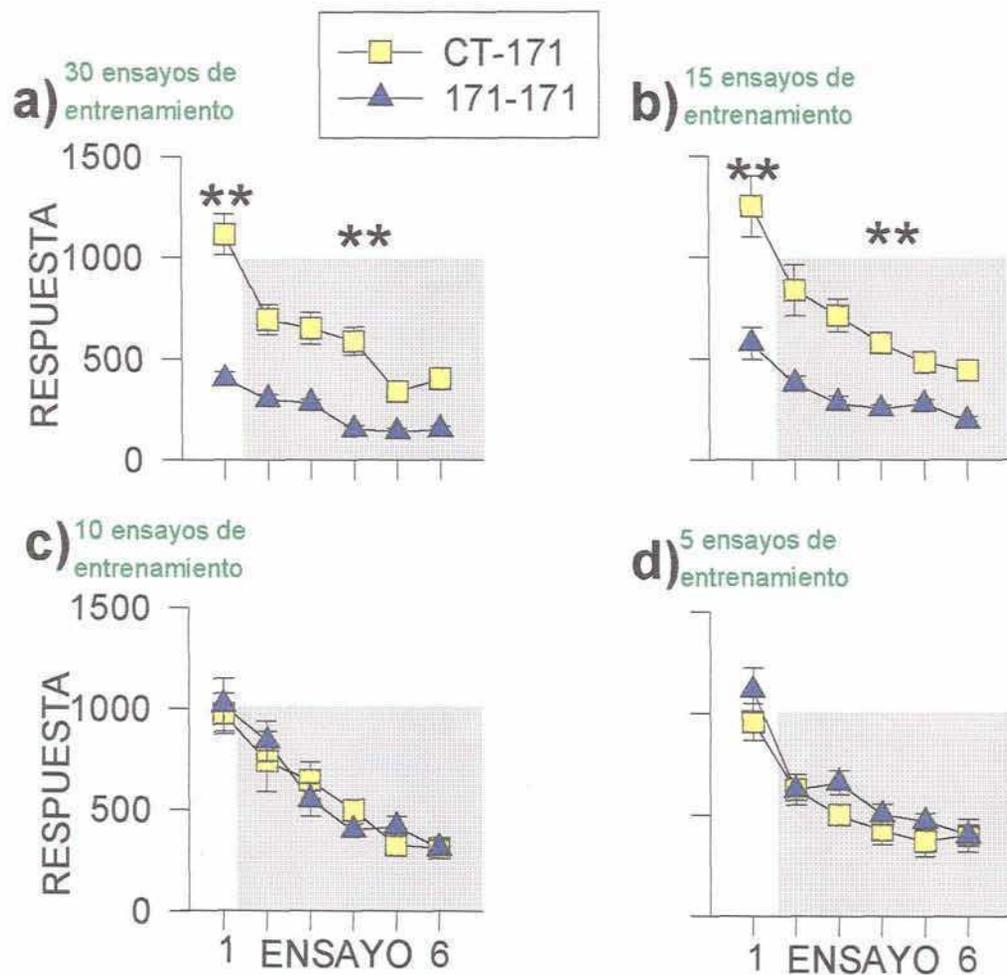


Figura 18: Efecto de diferente número de ensayos de entrenamiento, con el mismo intervalo entre ensayos (171 seg.) sobre la HLT. Resultados de Evaluación. a) Experimento 1, 30 ensayos de entrenamiento; b) experimento 2, 15 ensayos de entrenamiento; c) experimento 3, 10 ensayos de entrenamiento; d) experimento 4, 5 ensayos de entrenamiento. Intervalo entre ensayos (IEE)=171 seg. en ambas sesiones. Cuadrados amarillos para los grupos CT. Triángulos azules para los grupos TR. Ordenadas: media de respuesta de escape por ensayo. Abscisas: 6 ensayos de evaluación. ** $p<.025$.

Cabe destacar, que aparte del número de ensayos de entrenamiento, otros parámetros definen el protocolo, específicamente, el IEE, la congruencia entre el IEE del entrenamiento y el de evaluación, y la duración de la fase contextual y de estimulación durante la sesión de entrenamiento para los grupos entrenados (ej. 15 min. y alrededor de 90 min., respectivamente, cuando se dan 30 ensayos).

La siguiente serie de experimentos se orientó a averiguar en qué medida estos parámetros influyen la HLT cuando el número de ensayos de la sesión de entrenamiento se mantiene constante (30 ensayos).

3.2 Efecto de la variación de los intervalos entre ensayos (IEE) sobre ambas fases de la evaluación, manteniendo constante el número de ensayos.

El propósito de los experimentos de esta Sección fue evaluar si un IEE en el entrenamiento menor de 171 seg. (9, 27 o 81 seg.) era capaz de inducir HLT. Otro propósito fue analizar hasta que punto la congruencia entre el IEE de las dos sesiones era necesaria para asegurar la retención. Cada experimento (Tabla 9) comprendía un grupo control y tres grupos entrenados a los que se les daban 30 ensayos en el entrenamiento, separados por 9, 27, o 81 seg. de IEE; evaluando los grupos con un IEE de 9 seg. (Experimento 1), 27 seg. (Experimento 2) y 81 seg. (Experimento 3). La sesión de entrenamiento duraba para los cuatro grupos de cada experimento 45 min., y, como consecuencia de ello, la duración de las fases contextuales y de estimulación era diferente para cada grupo (Tabla 9).

Tabla 9: Programa de experimentos correspondientes al punto de la primera serie de experimentos 3.2. Efecto de la variación del IEE, manteniendo constante el número de ensayos

	Grupo	Número de Ensayos de Entrenamiento	Intervalo Entre Ensayos IEE (seg.)	Sesión de entrenamiento (45min.)		IEE(seg.) de evaluación	
				Fase Contextual (min.)	Fase de Estimulación (min.)		
EXPERIMENTO	1	CT-9	-	-	45	0	9
		9-9	30	9	36	9	9
		27-9	30	27	27	18	9
		81-9	30	81	0	45	9
	2	CT-27	-	-	45	0	27
		9-27	30	9	36	9	27
		27-27	30	27	27	18	27
		81-27	30	81	0	45	27
	3	CT-81	-	-	45	0	81
		9-81	30	9	36	9	81
		27-81	30	27	27	18	81
		81-81	30	81	0	45	81

Los resultados se muestran en las Fig. 19a, 19b, y 19c. En cada panel de un experimento dado, la curva de respuesta del grupo control se muestra junto con la de cada grupo entrenado. Una inspección de la Fig.19 centrada en los valores de los grupos control (CT-9, CT-27, y CT-81), sugiere que el patrón para las distintas curvas es similar, a pesar de que se usaron tres distintos IEE. Este hallazgo no concuerda con la visión generalmente aceptada de que para IEE mas cortos la HCT es mas pronunciada (Thompson et. al.,1973), aunque, ese efecto del IEE se hace evidente en *Chasmagnathus* cuando el nivel de respuesta alcanza la asíntota, es decir, generalmente después del ensayo 7-8 (Lozada, 1993). Cabe destacar, además, que el nivel de respuesta en el primer ensayo del preentrenamiento fue bastante similar para todos los grupos (datos no mostrados), lo que representa un resultado esperable ya que los animales de los tres experimentos provenían de la misma captura.

La Fig. 19a (Experimento 1) presenta las curvas de respuesta en la sesión de evaluación correspondientes a los TRs, comparada con la de CT-9. Las comparaciones planeadas mostraron diferencias significativas en el primer ensayo solo para CT-9 vs. 27-9 y CT-9 vs. 81-9 [$F(1,76)=4.5$ y 4.8 , respectivamente, $p \leq .05$]. No se hallaron diferencias significativas en ninguno

de los contrastes, cuando se compararon las fases de reentrenamiento. El análisis de los datos del experimento 2 (**Fig. 19b**) muestra resultados similares al anterior, esto es, diferencias significativas solo en el primer ensayo, comparaciones CT-27 vs. 27-27 y CT-27 vs. 81-27 [$F(1,76)=5.6$ $p \leq .05$ y $F(1,76)= 6.8$ $p \leq .01$, respectivamente]. Con respecto a la fase de reentrenamiento no se revelaron diferencias significativas en los contrastes entre CT-27 vs. 9-27 y CT-27 vs. 81-27, pero sí para CT-27 vs. 27-27, aunque la diferencia cae en el límite de la significancia [$F(1,76)=3.5$, $.06 \geq p \geq .05$]. En una replicación de este experimento las diferencias alcanzaron claramente a ser significativas. Finalmente, el análisis de los datos evaluados con 81 seg. de IEE (**Fig. 19c**, Experimento 3) demostraron diferencias significativas para CT-81 vs. 27-8, como para CT-81 vs. 81-81 en el primer ensayo [$F(1,76)=4.4$ $p \leq .05$ y $F(1,76)= 5.3$ $p \leq .025$, respectivamente] y en el reentrenamiento de 81-81 [$F(1,76)= 4.8$ $p \leq .05$].

En resumen, el IEE de 9 seg. falla en inducir HLT en ambas fases de evaluación cuando los animales son entrenados y evaluados con la misma u otra frecuencia. Por el contrario, la IEE de 27- o de 81- seg. en el entrenamiento producen HLT en ambas fases de evaluación cuando se utiliza la misma frecuencia en ambas sesiones, o en el primer ensayo cuando el IEE no es congruente. Se ha visto en otros experimentos del laboratorio que frecuencias apenas menores de 27 seg. (e.i. 18 seg.), fallan en producir HLT, lo que sugiere que 27 seg. sería un valor crítico del espaciamiento entre ensayos. En otras palabras, no se observa HLT en la fase de reentrenamiento cuando el IEE del entrenamiento es distinto al de la evaluación o cuando el intervalo utilizado en el entrenamiento es menor de 27 seg.

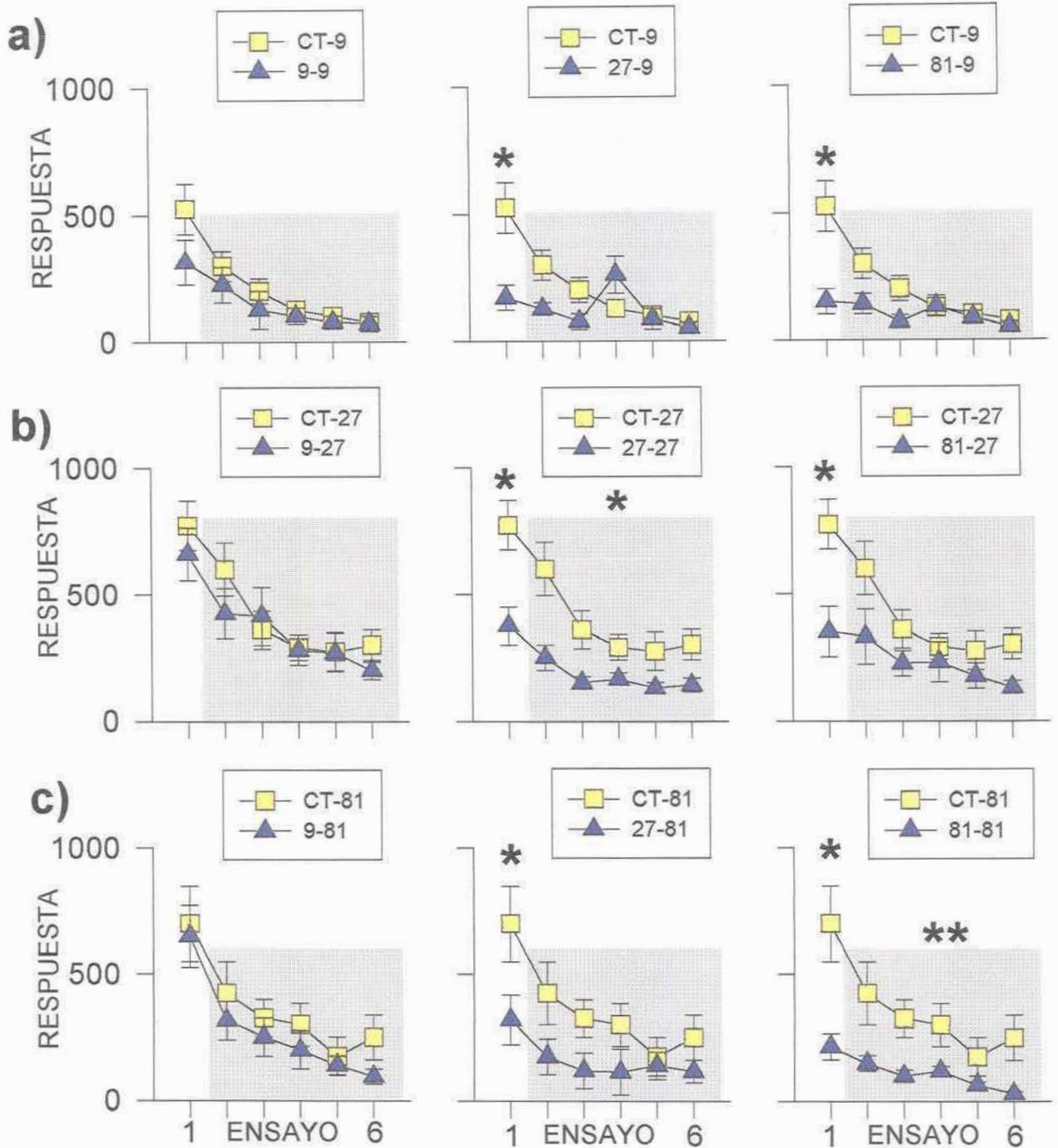


Figura 19: Efecto de diferentes intervalos entre ensayos, manteniendo constante el número de ensayos (30), sobre la HLT. Resultados de la evaluación. a) Experimento 1, evaluación con 9 seg.; Panel izquierdo, entrenados con 9 seg. de IEE; panel medio, entrenados con 27 seg. de IEE; Panel derecho, entrenados con 81 seg de IEE. b) Experimento 2, evaluación con 27 seg.; Panel izquierdo, entrenados con 9 seg. de IEE; panel medio, entrenados con 27 seg. de IEE; Panel derecho, entrenados con 81 seg de IEE. c) Experimento 3, evaluación con 81 seg.; Panel izquierdo, entrenados con 9 seg. de IEE; panel medio, entrenados con 27 seg. de IEE; Panel derecho, entrenados con 81 seg de IEE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.025$. Los símbolos son como en la Figura 18. Los resultados correspondientes a los grupos control (CT) de cada experimento se muestran en cada uno de los tres paneles.

Por lo anteriormente expuesto, podía concluirse que un aumento en extensión del IEE de entrenamiento induce un incremento en la expresión de la HLT en la evaluación, una conclusión que concuerda esencialmente con resultados obtenidos en distintos laboratorios y usando modelos bastantes disímiles (Carew et. al., 1972; Davis , 1970; File, 1973; Marlin & Miller, 1981). Sin embargo, podría argumentarse que los cangrejos entrenados con el IEE más corto (9 seg.) no alcanzaron a adquirir la HLT debido simplemente a la mayor extensión de la fase contextual del entrenamiento (36 min.) que precede la fase de estimulación (Tabla 9), y no al hecho de que el IEE sea extremadamente corto. En otras palabras, sería atendible una explicación en términos de inhibición latente.

Para analizar esta explicación alternativa, se realizó otro experimento con los siguientes cuatro grupos: CT-9, 9-9, (AD)CT-9 y (AD)9-9. Los dos primeros grupos recibieron el mismo tratamiento que en el experimento 1, mientras que el (AD)-CT-9 tiene solo 9 min. de fase contextual, y el (AD)9-9 tiene solo 9 min. de fase de estimulación (Tabla 10).

Tabla 10: Programa del experimento alternativo correspondientes al punto 3.2. de experimentos. Evaluación del posible efecto de inhibición latente en los grupos de IEE de 9 seg.

Grupo	Número de Ensayos de entrenamiento	Intervalo Entre Ensayos IEE (seg.)	Sesión de entrenamiento(45min.)		IEE(seg.) De Evaluación
			Fase contextual (min.)	Fase de estimulación (min.)	
CT-9	-	-	45	0	9
9-9	30	9	36	9	9
(AD)CT-9	-	-	9	0	9
(AD)9-9	30	9	0	9	9

La Fig. 20 presenta las curvas de respuesta de la sesión de evaluación para cada grupo entrenado comparado con su control respectivo. Las comparaciones planeadas no revelaron diferencias significativas para ningún contraste; esto es para CT-9 vs. 9-9 o (AD)CT-9 vs. (AD)9-9 o entre los controles. Así, los cangrejos no alcanzaron a adquirir la HLT con 9 seg. de IEE

en el entrenamiento, a pesar de que se eliminó la preexposición al contexto en los animales entrenados. Cabe destacar que este resultado no es irreconciliable con el concepto de que la HLT puede ser perjudicada por inhibición latente, dado que este efecto se encuentra con 12 hs de preexposición al actómetro (Tomsic et. al., 1998).

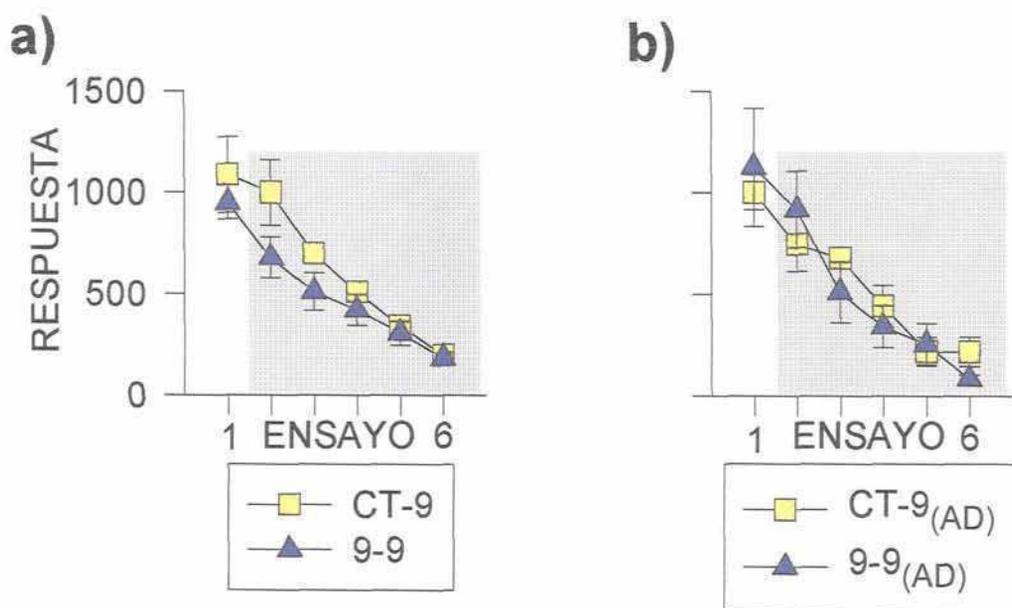


Figura 20: Evaluación de la inhibición latente para los grupos de 9 seg. de IEE. Panel izquierdo, evaluación del rendimiento de los grupos CT-9 y 9-9 (como los de la figura 20a, panel izquierdo); panel derecho, evaluación del rendimiento de los grupos (AD)CT-9 (9 minutos de fase contextual en la sesión de entrenamiento) y (AD)9-9 (9 minutos de fase estimulación en la sesión de entrenamiento). Los símbolos son como en la Figura 18.

Los resultados de esta Sección (Fig.19) muestran que los animales entrenados y evaluados con 81 o 27 seg. de IEE exhiben HLT en la fase de

reentrenamiento, pero no aquellos entrenados con 81 o 27 seg. y evaluados con un IEE diferente, lo que nos lleva a la posibilidad de que la HLT sea frecuencia-específica, al menos en este rango de frecuencias.

Los experimentos de la Sección siguiente fueron orientados a reexaminar esta posibilidad, pero utilizando IEE mayores.

3.3 Efecto de la incongruencia entre el IEE de la sesión de entrenamiento y el de evaluación.

Para demostrar que la HLT es IEE-específica, sería necesario probar que la retención mostrada en la fase de reentrenamiento cuando las frecuencias son congruentes entre sesiones, desaparece si se produce un cambio importante en el valor de uno de los IEE, cualquiera sea la dirección de ese cambio.

Con este propósito, IEEs de 135 y de 45 seg. fueron elegidos, manteniéndose la relación de tres veces utilizada en el caso anterior. Dos experimentos (Tabla 11) fueron llevados a cabo, cada uno con tres grupos: CT-45, 45-45 y 135-45 para el Experimento 1, y CT-135, 45-135 y 135-135 para el Experimento 2. La sesión de entrenamiento duró 72 min. para los 3 grupos de cada experimento, y, como consecuencia de ello, la duración de la fase contextual y de estimulación es diferente para cada grupo. Los cangrejos de cada experimento provenían de diferentes capturas.

Tabla 11: Programa de experimentos correspondientes al punto 3.3. Evaluación del efecto de la incongruencia entre el IEE de entrenamiento y el de evaluación

	Grupo	Número de Ensayos de entrenamiento	Intervalo Entre Ensayos IEE (seg.)	Sesión de entrenamiento (72min.)		IEE(seg.) de Evaluación	
				Fase Contextual (min.)	Fase de Estimulación (min.)		
EXPERIMENTO	1	CT-45	-	-	72	0	45
		45-45	30	45	45	27	45
		135-45	30	135	0	72	45
	2	CT-135	-	-	72	0	135
		45-135	30	45	45	27	135
		135-135	30	135	0	72	135

Las comparaciones planeadas (**Fig.21**) mostraron diferencias significativas para ambas fases de la evaluación en los casos en que coinciden las frecuencias entre sesiones: CT-45 vs. 45-45 [**Fig. 21a, panel izquierdo**, $F(1,76)=6.2$, $p \leq .025$, para el primer ensayo; $F(1,76)=9.8$, $p \leq .005$, para el reentrenamiento] y CT-135 vs. 135-135 [**Fig. 21b, panel izquierdo**, $F(1,76)=5.6$, $p \leq .025$, para el primer ensayo; $F(1,76)=7.4$, $p \leq .01$, para el reentrenamiento]. En cambio, cuando el IEE es diferente entre sesiones, la retención aparece sólo en el primer ensayo: CT-45 vs. 135-45 [**Fig. 21a, panel derecho**, $F(1,76)=5.6$, $p \leq .025$] y CT-135 vs 45-135 [**Fig. 21b, panel derecho**, $F(1,76)=5.2$, $p \leq .025$]. Con el objetivo de comparar los grupos entrenados durante el reentrenamiento de cada experimento (ej., 45-45 vs.135-45, y 135-135 vs. 45-135), se realizaron separadamente dos 2X5 ANOVAs de medidas repetidas sobre los valores de los bloques de 5 ensayos (del 2 al 6). Este análisis reveló un efecto principal significativo entre los grupos [Experimento 1, $F(1, 38)=4.4$, $p \leq .05$; Experimento 2 , $F(1, 38)=8.8$, $p \leq .005$] y entre ensayos [Experimento 1, $F(4, 152)=2.8$, $p \leq .05$; Experimento 2 , $F(4, 152)=4.4$, $p \leq .05$] pero no se halló interacción grupoXensayo. Una ANOVA de dos factores (entrenamiento y evaluación) sobre los datos de los grupos entrenados: reveló en ambos experimentos que no hay efecto del factor entrenamiento, que sí hay

efecto del factor evaluación [$F(1,76)=4.9, p \leq .05$], y una interacción significativa entre entrenamiento y evaluación [$F(1,76)=11.0, p \leq .005$]. Así, la comparación cruzada de los experimentos reveló el efecto de la congruencia de IEEs entre sesiones, sobre la retención en el reentrenamiento.

El cambio de IEE entre entrenamiento y evaluación parece perjudicar la retención en la última fase de la evaluación, lo que sugiere que la HLT en el reentrenamiento puede ser frecuencia-específica, al menos dentro del rango de

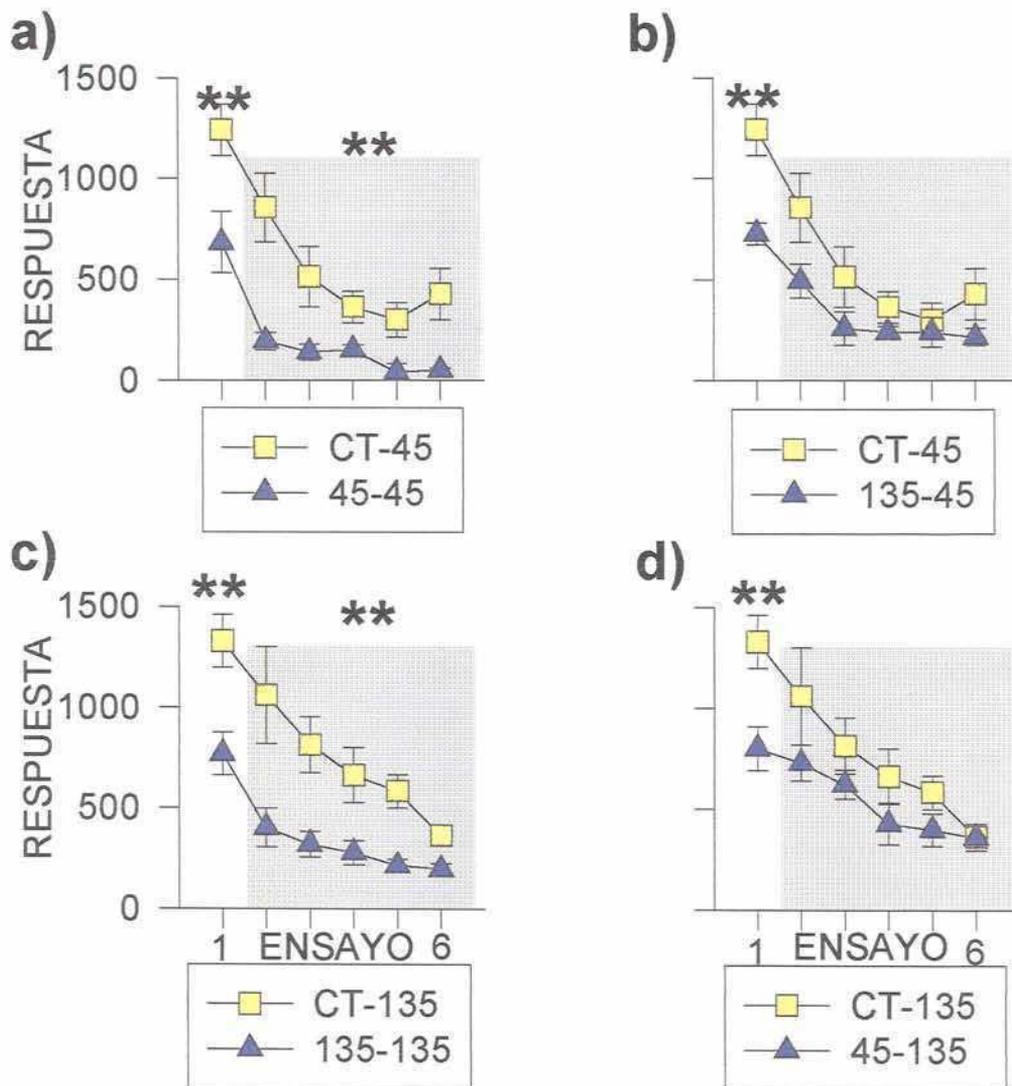


Figura 21: Especificidad del espaciamento entre ensayos en la fase de reentrenamiento. a) Evaluación con 45 seg. b) Evaluación con 135 seg. Los símbolos son como en la Figura 18. Los resultados correspondientes a los grupo control (CT) para cada experimento se muestran en los respectivos paneles.

valores intermedios de IEE usados aquí (entre 27 y 135 seg.) y cuando la relación entre IEEs se mantiene cerca de 3. Una explicación alternativa en términos de diferencias en la fuerza de el reentrenamiento es poco probable, dado que el perjuicio sobre la retención se da sin importar el sentido del cambio.

3.4 Efecto de la variación del número de ensayos de entrenamiento con IEE breves, sobre ambas fases de la evaluación.

Durante los experimentos previos, el efecto de disminuir la extensión del IEE durante el entrenamiento, sobre la HLT, se analizó manteniendo constante el número de ensayos de entrenamiento (30 ensayos). Este análisis permitió concluir que si la frecuencia de entrenamiento es igual o mayor que 27 seg. , la HLT se expresa en ambas fases de la evaluación, pero si el ITI se reduce a 9 seg. el protocolo de entrenamiento falla en inducir HLT en ambas fases de la evaluación. En este punto, una pregunta parece pertinente: ¿es posible compensar un IEE corto por el aumento del número de ensayos durante el entrenamiento y así obtener la HLT?

Para contestar esta pregunta dos líneas experimentales distintas se llevaron adelante.

El primer lugar se analizó si la HLT puede ser producida con un ITI de 9 seg. aumentando el número de ensayos aplicados. El experimento incluye dos grupos: (60)9-9 y (60)CT-9 (Tabla 12).

Tabla 12: Programa de experimentos correspondientes al punto 3.4. Efecto de la variación del número de ensayos con IEE de entrenamiento breves sobre la retención.

Grupo	Número de Ensayos de entrenamiento	Intervalo Entre Ensayos IEE (seg.)	Sesión de entrenamiento (45min.)		IEE(seg.) de Evaluación
			Fase Contextual (min.)	Fase de estimulación (min.)	
(60)CT-9	-	9	18	0	9
(60)9-9	60	9	0	18	9

Los resultados se exhiben en la **Fig. 22**. Un t-test sobre la evaluación no alcanzó a mostrar diferencias significativas entre los grupos en el primer ensayo, pero estos difirieron significativamente en la fase de reentrenamiento [$F(1,38)(8.5, p \leq .005)$].

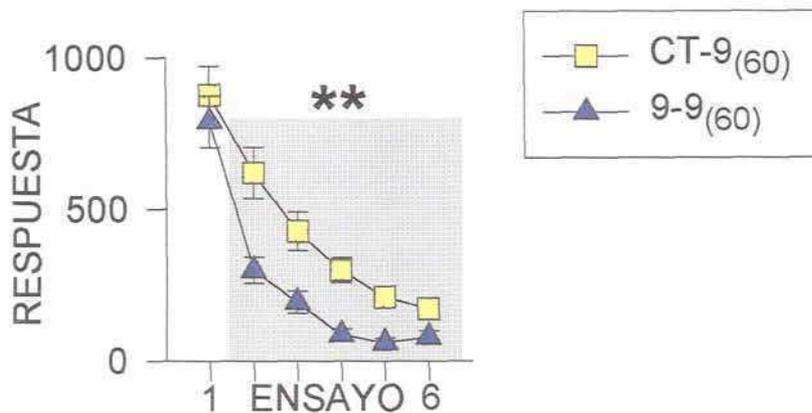


Figura 22: La HLT en la fase de reentrenamiento depende de la cantidad de entrenamiento. Rendimiento en la evaluación luego de 60 ensayos de entrenamiento. IEE=9 seg., para ambas Sesiones. Los símbolos son como en la Figura 18

Este resultado sugiere que cualquier intento de producir HLT en el primer ensayo podría fallar si el entrenamiento se suministra en forma masiva,

en otras palabras, la retención en la fase inicial de la evaluación requeriría necesariamente de un entrenamiento espaciado. Con el objetivo de evaluar dicha posibilidad, otra serie de cuatro experimentos se efectuaron usando un intervalo de 0 seg., es decir, un **entrenamiento masivo**. Cada experimento incluyó un grupo entrenado que recibió 30, 60, 120, 300 ensayos en la sesión de entrenamiento, con 0 seg. en ambas sesiones, y su respectivo grupo control con una evaluación con 0 seg. de IEE. Los grupos resultantes fueron: (30)CT-0 y (30)0-0 en el Experimento 1; (60)CT-0 y (60)0-0 en el Experimento 2; (120)CT-0 y (120)0-0 en el Experimento 3; y (300)CT-0 y (300)0-0 en el Experimento 4 (Tabla 13). Los cangrejos de los diferentes experimentos provenían de diferentes capturas.

Tabla 13: Programa de experimentos correspondientes al punto 3.4. Efecto de la variación del número de ensayos con IEE=0seg. de entrenamiento sobre la retención.

	Grupo	Número de Ensayos de entrenamiento	Intervalo Entre Ensayos IEE (seg.)	Sesión de entrenamiento		IEE(seg.) de Evaluación
				Fase contextual (min.)	Fase de estimulación (min.)	
EXPERIMENTO	1 (30)CT-0	-	-	4.5	0	0
	(30)0-0	30	0	0	4.5	0
	2 (60)CT-0	-	-	9	0	0
	(60)0-0	60	0	0	9	0
	3 (120)CT-0	-	-	18	0	0
	(120)0-0	120	0	0	18	0
	4 (300)CT-0	-	-	45	0	0
	(300)0-0	300	0	0	45	0

En la **Fig. 23** se muestran los resultados correspondientes a la sesión de evaluación. Como era de esperar, no se hallaron diferencias significativas (t-test $p \leq .05$) entre (30)CT-0 y (30)0-0 ya sea en el primer ensayo o en la fase de reentrenamiento (**Fig. 23a**). La HLT tampoco se produjo cuando el número de ensayos del entrenamiento se duplicó (**Fig. 23b**); sin embargo, cuando el

entrenamiento se aumentó en 4 o 10 veces, una diferencia significativa surgió para CT vs. TR únicamente en la fase de reentrenamiento [$F(38)=5.3$, $p \leq .025$. para (120)CT-0 vs. (120)0-0, **Fig. 23c**; $F(38)=5.2$, $p \leq .025$. para (300)CT-0 vs. (300)0-0, **Fig. 23d**].

Un entrenamiento de 300 ensayos de 0 seg. de IEE representa una estimulación continua de 45 minutos durante la primera sesión (Tabla 13). Este intervalo de estimulación es similar al correspondiente a 15 ensayos con un intervalo de 171 seg. (Tabla 8), pero los resultados fueron contrastantes: en un caso, se obtuvo una robusta retención en ambas fases de la evaluación (**Fig. 18b**), mientras que en el otro, la HLT se expresa únicamente en la fase de reentrenamiento (**Fig. 23d**).

Una conclusión general puede realizarse a partir de estos resultados: La HLT en diferentes fases de la evaluación depende en forma crítica del espaciamiento entre ensayos. El **entrenamiento masivo** produce HLT en la fase de reentrenamiento pero no en la inicial, a pesar que el número de ensayos se haya aumentado un forma dramática; por el contrario, el **entrenamiento espaciado** produce una HLT en la fase inicial y en la de reentrenamiento cuando se administra un número suficiente de ensayos.

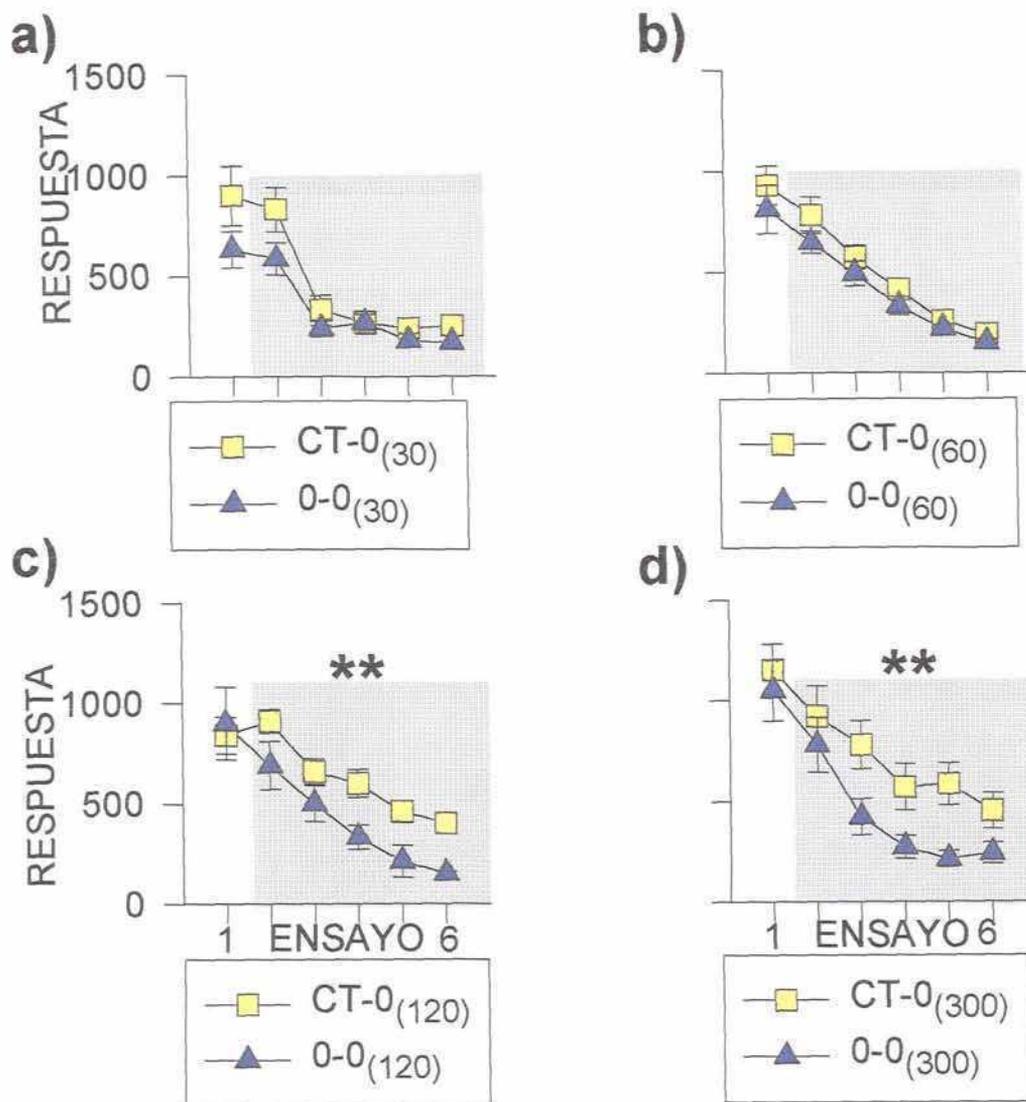


Figura 23: La HLT en el reentrenamiento depende de la cantidad de entrenamiento, IEE=0seg. para ambas Sesiones. Rendimiento en la Evaluación. a) Experimento 1, 30 ensayos de entrenamiento: (30)CT-0=control; (30)0-0= grupo entrenado; b) experimento 2, ensayos de entrenamiento: (60)CT-0=control; (60)0-0= grupo entrenado; c) experimento 3, 120 ensayos de entrenamiento: (120)CT-0=control; (120)0-0= grupo entrenado; d) experimento 4, 300 ensayos de entrenamiento: (300)CT-0=control; (300)0-0= grupo entrenado. Los símbolos son como los de la Figura 18.

4. DISCUSIÓN

Un resultado saliente de este Capítulo está dado por la relación entre entrenamiento masivo o espaciado y la fuerza de la HLT en dos fases diferentes de la evaluación. El entrenamiento masivo sólo produce habituación en la fase de reentrenamiento, esto es, no se obtienen diferencias CT-TR en la fase inicial, aunque que se aumente notablemente el número de ensayos de entrenamiento. Por lo tanto, podría pensarse que nos hallamos ante dos tipos de memoria netamente diferentes: un memoria producida por el entrenamiento masivo que se expresa sólo en la fase de reentrenamiento; y otra producida por el espaciado que se expresa en ambas fases: en el primer ensayo de evaluación y en el reentrenamiento.

Sin embargo, podría ofrecerse una explicación alternativa. Concretamente, podría argumentarse que el entrenamiento masivo va acompañado de un efecto secundario (una sensibilización) que pasará a ser una parte crítica del contexto de habituación. En el primer ensayo de la evaluación, ese componente del contexto estaría ausente; pero se reinstalaría durante el reentrenamiento, de tal manera que terminaría expresando la HLT por efecto del masivo. En otra palabras, el entrenamiento espaciado y el masivo compartirían un mismo mecanismo mnésico, pero durante el masivo surgiría un componente secundario que al incluirse en el contexto modificaría los requerimientos para la expresión mnésica durante la evaluación.

Para poder aceptar la hipótesis de las dos memorias sería necesario que experimentos comportamentales y farmacológicos, caractericen diferencialmente a la HLT obtenida por masivo de aquella que resulta del espaciado.

Otro resultado notable de este Capítulo, en consonancia con lo previamente descrito por Lozada (1993), es que la HLT resulta perjudicada cuando se utilizan diferentes IEE por sesión. El cambio de IEE disminuye o suprime la retención en la fase de reentrenamiento, sin importar el sentido del

cambio, tanto hacia intervalos más breves o más extensos (Sección 3.3). Se ha demostrado que algunos animales pueden llevar "cuenta del tiempo", cuando la duración de un evento les sirve como un estímulo discriminativo (Davis & Memmott, 1982; Meck & Church, 1983). Si aceptamos este planteo para nuestro modelo, los cangrejos serían capaces de registrar el tiempo, utilizándolo como parámetro discriminatorio entre estímulos. Esta capacidad de responder en base a la información temporal encontrada en especies animales muy diferentes, sería aplicable también a nuestro modelo. Se trata de una aptitud que resulta valiosa desde el punto de vista adaptativo, ya que se correlaciona muy bien con el hecho de que los estímulos en el ambiente no se presentan en forma azarosa e independiente entre ellos. Por el contrario, muchos aspectos del ambiente involucran patrones temporalmente ordenados de estimulación (Domjan & Burkhard, 1986).

CAPITULO 6

*CARACTERIZACIÓN COMPARATIVA DE LAS PROPIEDADES
DE LA HLT ESPACIADO-DEPENDIENTE CON LAS DE LA HLT
MASIVO-DEPENDIENTE.*

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en los Capítulos anteriores, toma cuerpo la hipótesis de que el proceso mnésico de Chasmagnathus, definido hasta ahora, comprensivamente, como **habituación a largo término** (HLT), encierra en realidad dos procesos diferentes y claramente distinguibles de memoria, aunque todavía los estemos denominando como **componentes** distintos del mismo proceso. En un caso, la HLT se produce solamente después de un entrenamiento **espaciado**, i.e. 15 o 30 ensayos separados por 27 o mas segundos, y se expresa luego de 24 horas tanto en el primer ensayo de evaluación como en la fase de reentrenamiento. En el otro caso, la HLT se produce solamente después de un entrenamiento **masivo**, i.e. al menos 300 ensayos, sin intervalo entre ensayos, y se expresa luego de 24 horas exclusivamente en la fase de reentrenamiento. Dicho en otras palabras, **el entrenamiento masivo, a diferencia del espaciado, es incapaz de producir retención de la respuesta habituada (retención= diferencia CT-TR significativa) en el primer ensayo de evaluación.**

Además de estos caracteres distintivos de cada **componente**, otros trabajos del Laboratorio o de Capítulos anteriores de esta Tesis, han demostrado propiedades peculiares de la espaciado-dependiente. **1)** Desde el punto de vista comportamental : a) Tomsic et. al. (1993, 1998) revelaron que esta HLT no solo contexto-específica sino que además, que se ve afectada por fenómenos como inhibición latente y extinción, permitiéndoles concluir que se trata de un proceso mediado por una asociación entre el contexto y la señal (estímulo fásico o de peligro). b) Los resultados del Capítulo 3 de la Tesis, demostraron que la retención de la HLT estaba presente luego de 5 días. **2)** Desde el punto de vista farmacológico: a) Los trabajos de los Capítulos 3 y 4, avalaron la hipótesis de que la HLT espaciado-dependiente requiere de la síntesis *de novo* de proteínas. b) Los trabajos de Romano et. al.(1996^a, 1996^b) señalaron la participación en este proceso de la vía de transducción de señales cAMP dependiente. c) Los resultados de Delorenzi et. al. (1995, 1996, 1997)

indicaron que neuropéptidos como-angiotensinas jugaban un papel facilitador en la formación de la HLT espaciado-dependiente.

Sin embargo, era indispensable un estudio sistemático dirigido a lograr una caracterización **comparativa** de los componentes de la HLT, ya que solo el conocimiento de la propiedades determinantes de cada uno de ellos, nos permitirá decidir si se trata o no de dos mecanismos mnésicos diferentes. Tal ha sido el propósito del presente Capítulo.

2. METODOS

2.1 Diseño experimental

Todos los experimentos incluyeron una sesión de entrenamiento y una de evaluación separadas por intervalos de 24, 48, 120 horas.

Sesión de entrenamiento: Cada experimento incluyó 2 pares de grupos: un grupo control (CT) que permanecía en los actómetros durante la sesión sin ser entrenado, y un grupo entrenado (TR) que recibía el programa de estimulación previsto para cada caso. A todos los animales se los sometió a un **preentrenamiento** consistente en dos ensayos de 9 seg. con un IEE 9seg. (Tabla 14). Los animales eran asignados a cada uno de los cuatro grupos teniendo en cuenta su nivel de respuesta en el preentrenamiento, de tal modo que se obtenía para cada grupo una reactividad basal promedio. Otras dos fases se incluyen en la sesión de entrenamiento: la **fase contextual** (15 min.), en la que los cangrejos permanecían en los actómetros sin ser entrenados y la **fase de estimulación** (45 min.), la cual incluía el tiempo total de ensayo más los intervalos entre los mismos. Durante la fase de estimulación los animales recibían 15 ensayos separados por 171 seg. (entrenamiento espaciado, **ES**) o 300 ensayos sin IEE (entrenamiento masivo, **MS**). Como los grupos control no reciben estimulación, estos sujetos eran expuestos a una fase contextual de 60 min., después del preentrenamiento.

Sesión de evaluación: Era la misma para los dos grupos en el mismo experimento y consistía en una **fase contextual** de 15 min. y una de **estimulación** de 6 ensayos, separados por el mismo IEE que fue usado en el entrenamiento. Por lo tanto, los grupos entrenados con el espaciado de 171 seg. tenían una fase de estimulación de 18 min., mientras que los grupos entrenados con el masivo tienen una fase de estimulación de 54 seg. Cada grupo experimental constaba de 30 a 40 animales.

Tabla14: Protocolo general correspondiente los experimento del Capítulo 6

		Sesión de entrenamiento			Sesión de evaluación		
Fase de pre-entrenamiento		Fase contextual	Fase de Estimulación	IES (horas)	Fase Contextual	Fase de Estimulación	
						Inicial E1 Reentrenamiento E 2-6	
Grupo	entrenado TR	2E IEE=9seg.	15 min.	45 min. ES=15 ensayos (IEE=171seg.) MS=300 ensayos (IEE=0seg.)	24,48 o 120	15min.	6ensayos ES=18min (IEE=171seg.) MS=54seg. (IEE=0seg.)
	control CT	2E IEE=9seg.	60min.	-----	24,48 o 120	15min.	6ensayos ES=18min (IEE=171seg.) MS=54seg. (IEE=0seg.)

2.2 Experimentos con CI: preparación de dosis e inyección

Como vehículo se usó la solución salina de crustáceos (Hoeger & Florey, 1989). La CI fue diluida a partir de una solución concentrada de agua destilada. Cincuenta µl de solución salina o de CI eran administrados a través de la membrana céfalotorácica- abdominal, con una profundidad de penetración de 4

mm, asegurándose que la solución inyectada era liberada en el centro del saco pericárdico. La CI era adquirida en Sigma Co.

2.3 Experimentos de cambio de contexto

Para evaluar la influencia del cambio de claves visuales entre la sesión de entrenamiento y de evaluación sobre la HLT, un anillo (20 X 7 cm) con bandas alternadas negras y blancas de 2 cm, se ubicó sobre el contenedor del actómetro para ser usado así como el contexto alternativo.

2.4 Análisis de datos

El nivel de retención a largo término (diferencia CT-TR) fue estimado mediante el análisis de datos de la sesión de evaluación. De acuerdo con la distinción propuesta previamente (Capítulo 5), las comparaciones entre los grupos CT y TR se efectuaron en forma separada para cada fase de la sesión de evaluación, es decir, sobre la media correspondiente al primer ensayo de evaluación y sobre el promedio de respuestas acumulativas que resultan de los siguientes cinco ensayos (reentrenamiento).

En todos los experimentos previos sin excepción, se encontró una diferencia significativa ($t\text{-test}=.05$) entre CT y TR a 24 horas después del entrenamiento en ambas fases de evaluación, cuando se usaron grupos de 20 o más animales que fueron entrenados con 15-30 ensayos separados por 171 seg. Asimismo, una diferencia significativa se exhibió en la fase de reentrenamiento para grupos entrenados con 300 ensayos sin IEE. De acuerdo con esto, se predicen diferencias significativas para ambas fases entre CT y TR en el entrenamiento espaciado y solo para el reentrenamiento en el caso de entrenamiento masivo. De ahí entonces que a lo largo del Capítulo, el análisis de los resultados se hará mediante comparaciones planeadas *a priori*, ponderadas con un ANOVA $\alpha=.05$, de acuerdo con el método discutido por Howell (1987) y Rosenthal y Rosnow (1985). Las comparaciones planeadas incluyeron 3 contrastes para cada experimento: Un primer contraste entre los

grupos control cuyas respuestas se espera que resulten similares; y otros dos contrastes para cada grupo entrenado frente a los controles sumados. No se intentaron comparaciones entre los grupos sometidos a un entrenamiento masivo contra otro sometido a un entrenamiento espaciado dada la gran diferencia en los protocolos de evaluación (Tabla 14).

3. RESULTADOS

3.1 Efecto del cambio entrenamiento-evaluación de las claves contextuales

Los siguientes dos experimentos apuntaron a analizar el efecto del cambio de contexto entre sesiones sobre los dos componentes de memoria de la HLT. Los cangrejos de una misma captura eran utilizados en ambos experimentos.

En cada experimento (Tabla15), cangrejos de un par de grupos CT-TR pasaban ambas el **mismo actómetro**, es decir, sin cambios contextuales entre sesiones (CT-IG y TR-IG, respectivamente). Contrariamente, los otros CT-TR tuvieron el entrenamiento en los actómetros con el anillo de bandas, y la sesión de evaluación en el mismo actómetro pero sin el patrón de bandas, es decir, en **diferentes contextos** (CT-DIF y TR-DIF). En el experimento 1 (EX1, n=40), los animales de los grupos entrenados recibieron entrenamiento espaciado (15 ensayos IEE=171 seg.), mientras que en el experimento 2 (EX2, n=35), los grupos entrenados recibieron un entrenamiento masivo (300 ensayos sin IEE).

Los resultados de la evaluación correspondientes a los grupos IG del EX 1 se presentan en la **Fig. 24 a**, panel izquierdo. Estos grupos presentan un patrón de curvas similar al observado usualmente para este tipo de entrenamiento, es decir, una clara diferencia en ambas fases de evaluación. Sin embargo, el patrón aparece profundamente alterado por el cambio de contexto en los grupos DIF (**Fig. 24 a** panel derecho.) ya que no surgen

diferencias entre las curvas de CT- y TR-DIF. Las comparaciones planeadas confirmaron estas observaciones. Los resultados de cada grupo entrenado fueron comparados con los controles sumados dado que no surgieron diferencias significativas entre ambos en la evaluación. Este análisis reveló diferencias significativas para CTs vs el TR-IG en el primer ensayo y el reentrenamiento [$F = (1, 156) = 12.5$, $p \leq .005$; $F = (14.4, p \leq .005)$] pero no para CTs vs TR-DIF en ambas fases de la evaluación.

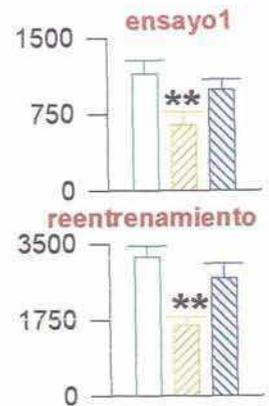
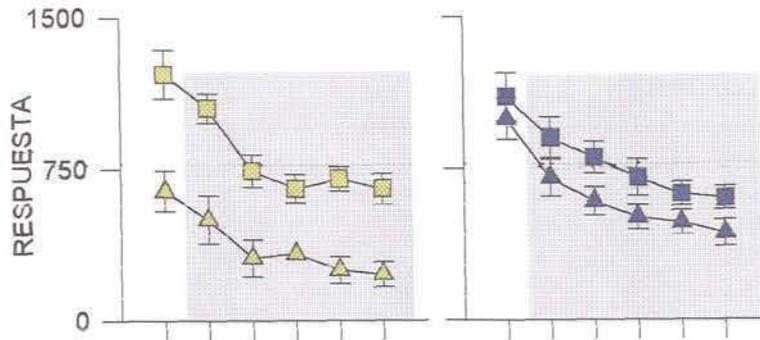
Tabla 15: Programa de experimentos del punto 3.1. Efecto del cambio entrenamiento-evaluación de las claves contextuales

Experimento	Grupo	Ensayos De entrenamiento	Contexto de entrenamiento (actómetro)	Ensayos De evaluación	Contexto de evaluación (actómetro)
1 ES (IEE=171seg)	CT-IG	-	Sin bandas	6	Sin bandas
	TR-IG	15	Sin bandas	=	=
	CT-DIF	-	Con bandas	=	=
	TR-DIF	15	Con bandas	=	=
2 MS (IEE=0seg)	CT-IG	-	Sin bandas	6	Sin bandas
	TR-IG	300	Sin bandas	=	=
	CT-DIF	-	Con bandas	=	=
	TR-DIF	300	Con bandas	=	=

Nota: el IES es de 24hs

Los resultados correspondientes a los experimentos con el entrenamiento masivo se muestran en la **Fig. 24 b** (Ex 2). El patrón de diferencias entre los grupos IG era como el esperado, es decir, las diferencias entre CT y TR están en la fase de reentrenamiento y no en la inicial. Las comparaciones planeadas no mostraron diferencias entre los grupos CT, ni entre la suma de CTs contra los grupos TR-IG y TR-DIF en el primer ensayo; mientras que, en la fase de reentrenamiento surgieron diferencias significativas entre la suma CTs vs TR-IG ó vs TR-DIF [$F (1,136) = 7.0$, $p \leq .01$; y $F = 8.5$, $p \leq .01$, respectivamente].

**a) Grupos TR
15 ensayos
IEE=171seg.**



**b) Grupos TR
300 ensayos
IEE=0seg.**

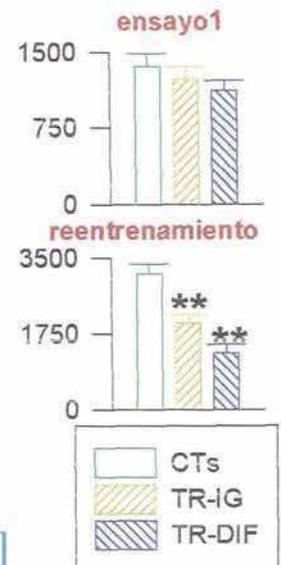
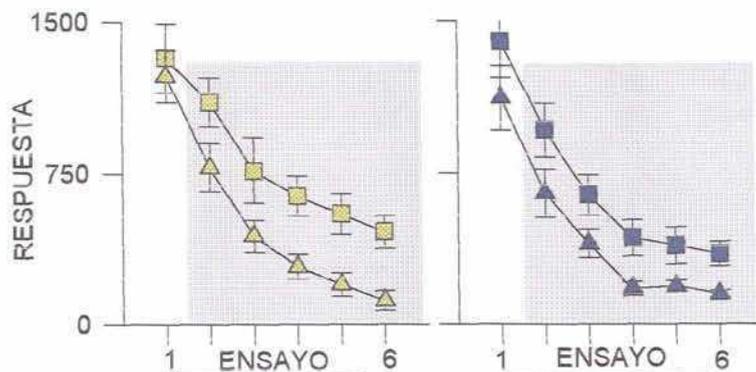


Figura 24: Efecto del cambio de contexto sobre la HLT. **a)** Resultados de evaluación del entrenamiento espaciado (15 ensayos, IEE=171seg.). Panel izquierdo: los símbolos ocres corresponden a los grupos entrenados y evaluados en el mismo contexto (sin bandas); los azules a los grupos entrenados y evaluados en contextos diferentes (con bandas); cuadrados=controles; y triángulos= grupos entrenados. Ordenadas: media de la respuesta de escape. Abscisas: 6 ensayos de evaluación. Los ensayos correspondientes a la fase de reentrenamiento se encuentran en la zona sombreada. $* < .05$, $** < .01$. Histogramas: rendimiento de cada grupo entrenado comparados contra los controles sumados. Las comparaciones se realizaron sobre el primer ensayo, y sobre los valores acumulativos de los ensayos 2 al 6 (reentrenamiento). Barras ocres, grupos igual contexto; azules, grupos de contexto diferente; verdes, grupos controles sumados. **b)** Resultados de evaluación del entrenamiento masivo (300 ensayos, IEE=0seg.). Los símbolos son como en a).

Se pueden sacar dos conclusiones esenciales a partir de los resultados de estos experimentos: Primero, la expresión de la HLT adquirida con el entrenamiento espaciado es bloqueada por el cambio contextual producido por la variación de las claves visuales tanto en el primer ensayo como en la fase de reentrenamiento. La imposibilidad de recuperación de la HLT luego del entrenamiento espaciado confirma los resultados previos del Laboratorio (Tomsic et al, 1993) que mostraban la supresión de la HLT con un cambio multimodal de contexto (cambio de claves visuales y no- visuales) introducidas entre las sesiones. Por otro lado, HLT luego de un entrenamiento masivo, se expresa en la fase de reentrenamiento a pesar del cambio en las claves visuales. Por lo tanto, HLT luego de un entrenamiento espaciado es contexto-específica, mientras que luego de un entrenamiento masivo parece ser solo estímulo-específica (Lozada et. al., 1990), es decir, parece implicar la representación del estímulo fásico. Segundo, el hecho de que uno de los componentes de la HLT requiera de la invarianza de las claves contextuales está de acuerdo con las predicciones de la teoría asociativa de Wagner con respecto a la habituación (Whitlow & Wagner, 1984). Mas aún, otros resultados muestran que los tratamientos de inhibición latente y extinción también impiden la retención de la respuesta habituada luego de un entrenamiento espaciado (Tomsic et al, 1998), sugiriendo que el componente de la HLT espaciado-dependiente implicaría, a diferencia del componente de la HLT masivo dependiente, un proceso de aprendizaje asociativo.

3.2 Efecto comparativo de CI sobre la HLT luego de un entrenamiento espaciado y luego de uno masivo.

En los experimentos previos (Capítulo 3 y 4) se demostró que la CI bloquea la HLT producida por entrenamiento espaciado en el primer ensayo, ya que el análisis se limitó a en la fase inicial. Es decir, no se tenía información

del efecto de esta droga sobre la fase de reentrenamiento en la HLT espaciado-dependiente, ni sobre la HLT masivo-dependiente.

Por lo tanto, los experimentos siguientes se realizaron con el objeto de determinar en que medida los componentes de la HLT dependen de la síntesis *de novo* de proteínas.

Los experimentos no se corrieron en forma simultanea, pero los cangrejos de cada par de experimentos (1-2, 3-4, 5-6) fueron obtenidos de una misma captura. Cada experimento consistió de un par CT-TR inyectado con salina y un par CT-TR inyectado con CI.

Los experimentos 1 y 2 (EX1, EX2, Tabla 16) los animales fueron inyectados inmediatamente después del entrenamiento. El par con CI recibió 15 μ g de la droga. En el Ex1 ambos grupos fueron con el espaciado (15 ensayos IEE=171 seg.) y en el EX2 con el masivo (300 ensayos sin IEE). Luego de 24 horas, los cangrejos eran evaluados con el mismo IEE usado en el entrenamiento.

La administración post-entrenamiento de CI no tuvo efecto sobre la respuesta en la evaluación de los grupos control (CT-SAL y CT-CI), ya que los valores alcanzados son similares para ambos experimentos (**Fig. 25 a**, Ex1; **Fig. 25b**, EX2), resultado acorde a los ya mostrados en los experimentos previos con este antibiótico. Las comparaciones planeadas no mostraron diferencias significativas entre los controles en ninguna de las dos fases de la evaluación.

La **Fig. 25 a** muestra los resultados de la evaluación del EX1. Las curvas de respuesta de los grupos tratados con solución salina revelan el patrón de CT-TR usualmente encontrado luego de un entrenamiento espaciado, esto es, una diferencia conspicua en el primer ensayo y en el reentrenamiento. CI tuvo efecto sobre el primer ensayo ya que desapareció la diferencia entre CT-TR. Las comparaciones planeadas realizadas sobre estos datos confirman estas observaciones. En el primer ensayo, se reveló una diferencia significativa para la suma de controles CTs vs el grupo entrenado y tratado con salina [$f(1,116)=6.8, p(.01)$] pero no para CTs vs TR tratado con CI; mientras que en el reentrenamiento, ambos grupos entrenados resultaron estadísticamente

diferentes de la suma de controles CTs [F=7.5, $p \leq .01$; o F=4.5, $p \leq .05$, respectivamente].

Tabla 16: Programa de experimentos del punto 3.2. Efecto comparativo de CI sobre la HLT luego de un entrenamiento espaciado y luego de un masivo.

Experimento	Grupo	Dosis de CI(μ g)	Inyección	Ensayos De entrenamiento	IES horas	Ensayos De Evaluación
1 ES IEE=171seg	CT-SAL	-	Post-entrenamiento	-	24	6
	TR-SAL	-	=	15	=	=
	CT-CI	15	=	-	=	=
	TR-CI	15	=	15	=	=
2 MS IES=0seg	CT-SAL	-	Post-entrenamiento	-	24	6
	TR-SAL	-	=	300	=	=
	CT-CI	15	=	-	=	=
	TR-CI	15	=	300	=	=
3 ES IES=171seg	CT-SAL	-	Pre-entrenamiento	-	48	6
	TR-SAL	-	=	15	=	=
	CT-CI	15	=	-	=	=
	TR-CI	15	=	15	=	=
4 MS IES=0seg	CT-SAL	-	Pre-entrenamiento	-	48	6
	TR-SAL	-	=	300	=	=
	CT-CI	15	=	-	=	=
	TR-CI	15	=	300	=	=
5 ES IES=171seg	CT-SAL	-	Pre-entrenamiento	-	48	6
	TR-SAL	-	=	15	=	=
	CT-CI	25	=	-	=	=
	TR-CI	25	=	15	=	=
6 MS IES=0seg	CT-SAL	-	Pre-entrenamiento	-	48	6
	TR-SAL	-	=	300	=	=
	CT-CI	25	=	-	=	=
	TR-CI	25	=	300	=	=

Los resultados de la evaluación del EX2 se muestran en la **Fig. 25b**. El patrón de diferencias entre los grupos contrasta con el obtenido para el experimento anterior. Como esperábamos, el rendimiento de los grupos tratados con salina no difirieron en la respuesta en el primer ensayo pero sí en la fase de reentrenamiento (**Fig. 25b**). Como en el EX1, la HLT en la fase de

reentrenamiento parece ser insensible al tratamiento con el antibiótico (Fig. 25b).

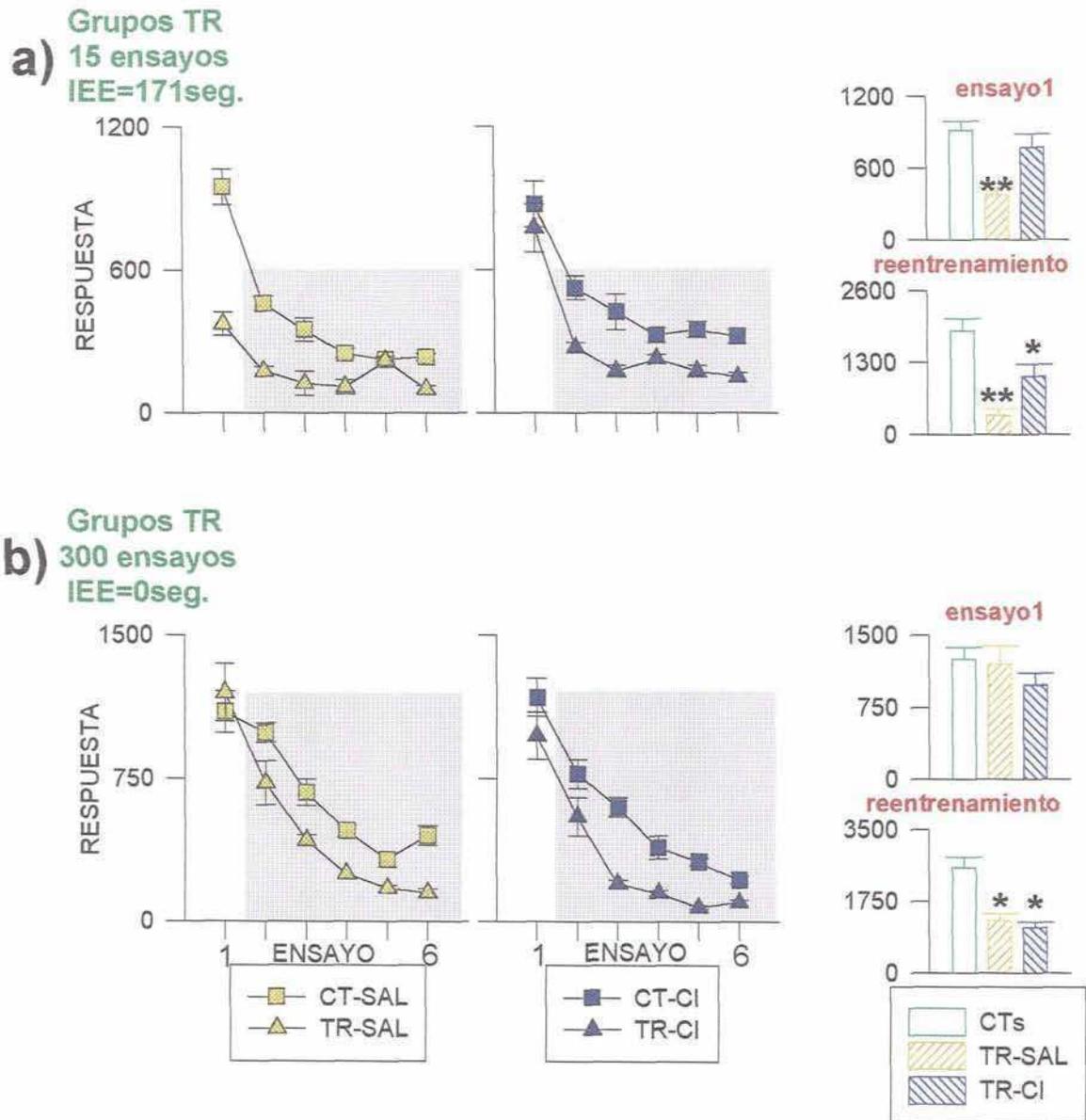


Figura 25: Efecto de cicloheximida (15 μ g) inyectada postentrenamiento sobre la HLT. Intervalo entre Sesiones 24 hs. **a)** Resultados de evaluación del entrenamiento espaciado (15 ensayos, IEE=171seg.). Panel izquierdo: los símbolos ocres corresponden a los grupos inyectados con solución salina; los azules corresponden a los grupos inyectados con cicloheximida; cuadrados=controles (CT); y triángulos=grupos entrenados (TR). Ordenadas: media de la respuesta de escape. Abscisas: 6 ensayos de evaluación. Los ensayos correspondientes a la fase de reentrenamiento se encuentran en la zona sombreada. * $<.05$, ** $<.01$. Histograma: rendimiento de cada grupo entrenado comparados contra los controles sumados. Las comparaciones se realizaron sobre el primer ensayo, y sobre los valores acumulativos de los ensayos 2 al 6 (reentrenamiento). Barras ocres, grupos tratados con salina; azules, grupos tratados con cicloheximida; verdes, grupos controles sumados. **b)** Resultados de evaluación del entrenamiento masivo (300 ensayos, IEE=0seg.). Los símbolos son como en **a)**.

Las comparaciones planeadas no revelaron diferencias significativas CT-TR en el primer ensayo, tanto para los grupos tratados con salina o como con CI, mientras que en la otra fase surgieron diferencias significativas para CTs vs TR inyectados con salina o con CI [$F(1,116)=4.3$, $p \leq .05$; y $F=4.7$, $p \leq .05$, respectivamente].

El diseño experimental de los experimentos 3 y 4 (EX3, EX4, $n=34$) fue similar a los dos anteriores, excepto que la inyección se daba justo antes del primer ensayo del entrenamiento (estrictamente antes del comienzo de la fase de estimulación y después del pre-entrenamiento) y el intervalo entre sesiones era de 48 hs (Tabla16). La razón para extender el intervalo cuando la CI se administra antes del entrenamiento, se ha dado en los Capítulos 3 y 4. La administración de CI (AD o etanol) seguido, por la presentación iterativa del estímulo, tiene un efecto depresor inespecífico transitorio sobre la respuesta de escape a 24 hs, efecto que desaparece con la extensión del intervalo.

En consonancia con resultados anteriores de esta Tesis, no se hallaron durante el entrenamiento, diferencias significativas en la respuesta de los grupos TR tratados con CI o SAL (datos no mostrados). Los resultados de la evaluación para los grupos entrenados con 15 ensayos, IEE=171 seg. , se muestran en la **Fig. 26 a**. Los grupos SAL presentan las curvas usuales de diferencias entre CT-TR para este protocolo de entrenamiento. Sin embargo, la HLT parece ser afectada por la CI en el primer ensayo, aunque no en el reentrenamiento. Las comparaciones planeadas evidenciaron diferencias significativas entre la suma de los controles CTs vs TR tratados con salina [$F(1,132)=1.6$], pero no para CTs vs TR tratado con CI; mientras que en la fase de reentrenamiento surgieron diferencias tanto para CTs vs TR salina como para CTs vs TR-CI [$F(1,132)=7.25$, $p \leq .01$; y $F=12.9$, $p \leq .001$, respectivamente].

La **Fig. 26 b** muestra los resultados para los animales entrenados con 300 ensayos sin intervalo. Los grupos salinos difieren como se esperaba únicamente en la fase de reentrenamiento, y esta diferencia no es afectada por el tratamiento con CI. Para el primer ensayo, las comparaciones planeadas no revelaron diferencias significativas entre CTs y los TR, sí para el

reentrenamiento, en ambos grupos [F(1,132)=4.3, $p \leq .05$ para los entrenados tratados con salina; y F=7.0, $p \leq .01$ para los entrenados tratados con CI].

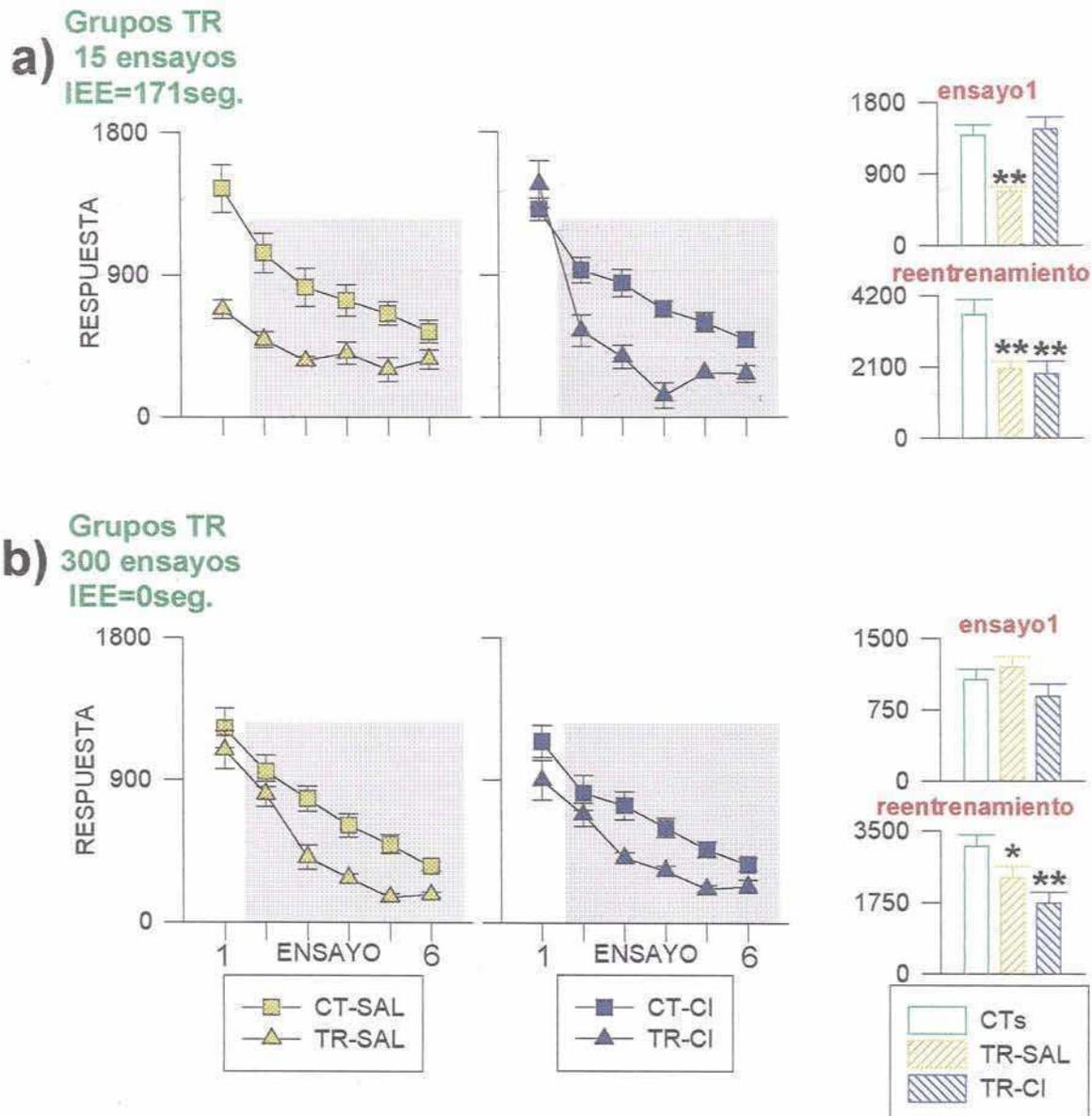


Figura 26: Efecto de cicloheximida (15 μg) inyectada preentrenamiento sobre la HLT. Intervalo entre Sesiones 48 hs. **a)** Resultados de evaluación del entrenamiento espaciado (15 ensayos, IEE=171seg.). Los símbolos son como en la Fig. 25. **b)** Resultados de evaluación del entrenamiento masivo (300 ensayos, IEE=0 seg.) Los símbolos son como en la Fig. 25.

Así, 15 μg de CI administrados tanto antes como después del entrenamiento, tienen un efecto amnésico sobre la HLT adquirida con entrenamiento espaciado, pero no con masivo. Sin embargo, este efecto está limitado al primer ensayo, sugiriendo así que la CI es incapaz de impedir la

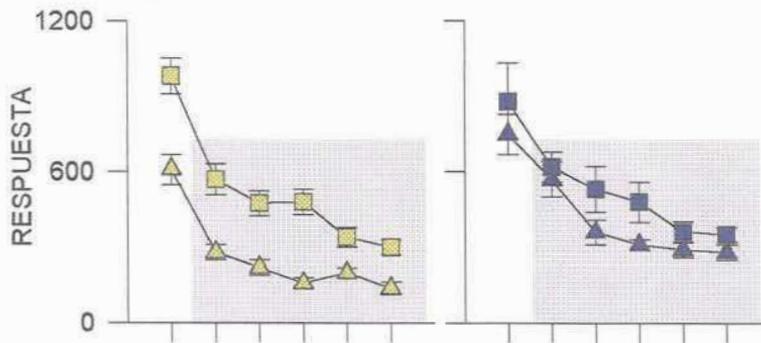
expresión del componente la HLT espaciado-dependiente en el reentrenamiento. Es posible que esta falla pueda ser atribuida a la dosis del antibiótico utilizada, de manera que los experimentos próximos se realizaron usando una dosis mayor.

El diseño experimental de los experimentos 5 y 6 (EX5, EX6, n=30 y 40, respectivamente) fue como el utilizado en los 3 y 4, salvo que con una dosis de CI de 25 μ g (Tabla 16). Como antes, no surgen diferencias entre los grupos entrenados durante la sesión de entrenamiento, y no se observan efectos de la droga sobre la respuesta en la sesión de evaluación de los grupos controles.

Los resultados de la evaluación correspondientes al entrenamiento espaciado se muestran en la **Fig. 27a**. Los grupos salinos muestran las diferencias usuales tanto en la fase inicial como en la de reentrenamiento. La HLT parece ser afectada por CI tanto en el primer ensayo como en la fase de reentrenamiento. Las comparaciones planeadas revelaron diferencias significativas entre CTs vs los entrenados tratados con salina [$F(1,116)=7.1$, $p \leq .01$ y $F=1.9$, $p \leq .005$; respectivamente] pero no para CTs vs entrenados tratados con CI en el primer ensayo o en la fase de reentrenamiento.

La **Fig. 27 b** presenta los resultados de la evaluación para los grupos entrenados con el masivo, 300 ensayos sin IEE. Los grupos salinos difieren en la fase de reentrenamiento, y esta diferencia no es afectada por el tratamiento con CI. En el primer ensayo, las comparaciones planeadas no evidenciaron diferencias significativas entre CTs vs TR en ningún contraste, mientras que en el reentrenamiento, diferencias entre CTs-TR se hallan para ambos tratamientos [$F(1,156)=12.8$, $p \leq .005$ para los entrenados tratados con SAL; y $F=13.9$, $p \leq .005$ para los entrenados tratados con CI].

**a) Grupos TR
15 ensayos
IEE=171seg.**



**b) Grupos TR
300 ensayos
IEE=0seg.**

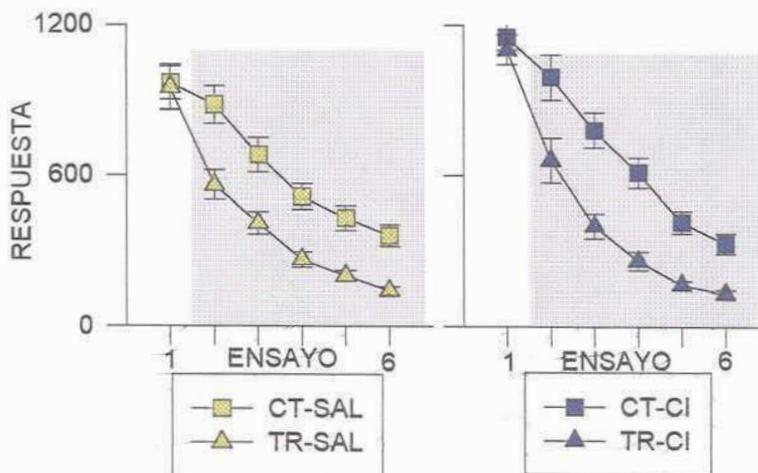


Figura 27: Efecto de cicloheximida (25 μ g) inyectada preentrenamiento sobre la HLT. Intervalo entre Sesiones 48 hs. **a)** Resultados de evaluación del entrenamiento espaciado (15 ensayos, IEE=171seg.). Los símbolos son como en la Fig. 25. **b)** Resultados de evaluación del entrenamiento masivo (300 ensayos, IEE=0 seg.) Los símbolos son como en la Fig. 25.

En resumen, tanto la CI como el cambio de contexto bloquean la expresión de la HLT espaciado-dependiente en ambas fases de la evaluación. Considerando que con estas dosis de CI el porcentaje de inhibición de síntesis

es de alrededor del 90% (Capítulo 3), se concluye que solo la HLT basada en el entrenamiento espaciado requiere la síntesis *de novo* de proteínas.

3.3 Duración de la HLT espaciado-dependiente y de la masivo-dependiente

Una propiedad comportamental aparentemente universal es que el entrenamiento espaciado produce una memoria mas fuerte y a mas largo plazo que la obtenida con el entrenamiento masivo (Carew, 1974; Frost et.al, 1985). Se puede esperar entonces que la HLT espaciado-dependiente sea más persistente que la obtenida con el entrenamiento masivo. Para investigar esta predicción, se hicieron los dos experimentos siguientes.

El protocolo (Tabla 17) del experimento 1 (EX1, n=30) incluía 4 grupos : 2 grupos eran sometidos a un entrenamiento espaciado (15 ensayos, IEE=171seg.) y los otros dos eran sus respectivos controles. Un par CT-TR tuvo un intervalo entre sesiones de 24 hs. y el otro par un intervalo de 120 hs. Se seleccionó este intervalo ya que teníamos el antecedente de haber tenido una buena retención con entrenamiento espaciado. El experimento 2 (Ex 2) tuvo un diseño similar, pero los grupos TR recibieron un entrenamiento masivo (300 ensayos sin IEE). Los animales de los dos experimentos provenían de una misma captura.

Tabla 17: Programa de experimentos del punto3.3.Duración de la HLT espaciado-dependiente y de la masivo-dependiente

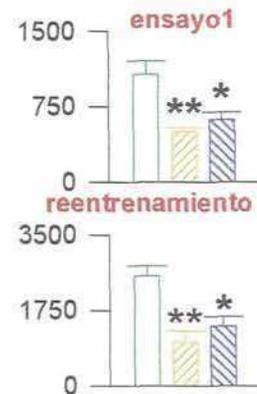
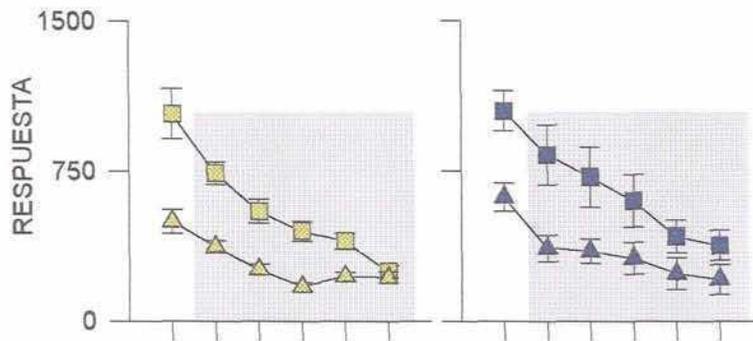
Experimento	Grupo	Ensayos de entrenamiento	IES Horas	Ensayos de Evaluación
1 ES IES=171seg.	CT-24hs	-	24	6
	TR-24hs	15	24	=
	CT-120hs	-	120	=
	TR-120hs	15	120	=
2 MS IES=0seg.	CT-24hs	-	24	6
	TR-24hs	300	24	=
	CT-120hs	-	120	=
	TR-120hs	300	120	=

Los resultados de la evaluación del EX1 se muestran en la **Fig. 28a**. La relación entre las curvas CT y TR muestran el patrón usual para ambos intervalos entre sesiones. Las comparaciones planeadas sobre los datos del primer ensayo mostraron diferencias significativas entre CTs vs TR luego de 24 horas [$f(1,116)=7.1$, $p \leq .01$] y vs TR luego de 120 horas [$F=4.5$, $p \leq .05$]; y sobre los datos del reentrenamiento, para la suma de controles CTs vs TR tanto luego de 24 como de 120 horas [$F=6.9$, $p \leq .01$; $F=5.3$, $p \leq .025$].

La **figura 28 b** exhibe los resultados del Ex 2. A 24 horas, CT-TR muestra el clásico patrón de curvas para el entrenamiento masivo, pero para 120hs las diferencias entre los grupos desaparece. Las comparaciones planeadas exhibieron diferencias significativas sólo para la suma de CTs vs TR a 24 horas en la fase de reentrenamiento [$F(1,116)=6.7$, $p \leq .01$].

Dos conclusiones principales se pueden sacar de estos resultados: Primero, en la fase inicial de la evaluación, la HLT espaciado-dependiente persiste por lo menos por 120 horas. En segundo lugar, en la fase de reentrenamiento, la HLT espaciado-dependiente persiste por mas tiempo que la retención lograda para la misma fase por el entrenamiento masivo (300 ensayos IEE= 0 seg.).

a) Grupos TR
15 ensayos
IEE=171seg.



b) Grupos EXP
300 ensayos
IEE=0seg.

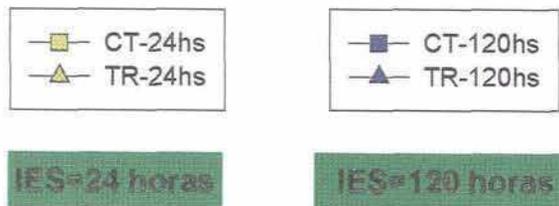
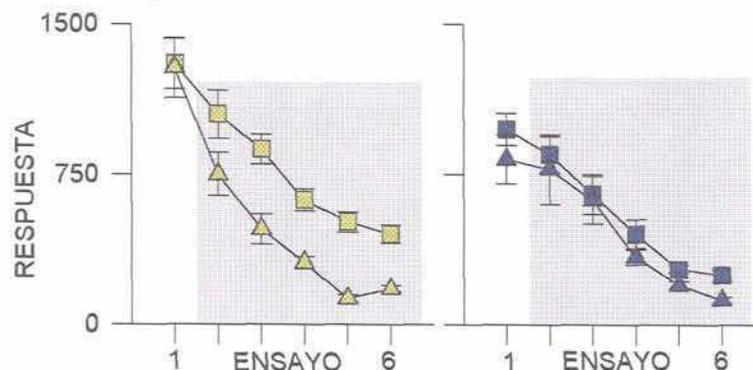


Figura 28: Duración de la HLT producida por un entrenamiento espaciado y la producida por un entrenamiento masivo. **a)** Resultados de evaluación del entrenamiento espaciado (15 ensayos, IEE=171seg.). Panel izquierdo: los símbolos ocres corresponden a 24 horas entre sesiones; los azules corresponden a 120 horas entre sesiones; cuadrados=controles (CT); y triángulos= grupos entrenados (TR). Ordenadas: media de la respuesta de escape. Abscisas: 6 ensayos de evaluación. Los ensayos correspondientes a la fase de reentrenamiento se encuentran en la zona sombreada. *<.05, **<.01. Histogramas: rendimiento de cada grupo entrenado comparados contra los controles sumados. Las comparaciones se realizaron sobre el primer ensayo, y sobre los valores acumulativos de los ensayos 2 al 6 (reentrenamiento). Barras ocres, grupos de 1 día de intervalo entre sesiones; azules, grupos de 5 días de intervalo entre sesiones; verdes, grupos controles sumados. **b)** Resultados de evaluación del entrenamiento masivo (300 ensayos, IEE=0seg.). Los símbolos son como en **a)**.

4. DISCUSION

La observación saliente de este Capítulo es que el entrenamiento espaciado produce una HLT dependiente del contexto (i.e. **contexto-específica**), sensible a la CI y de larga duración (al menos por 120 hs), mientras que el entrenamiento masivo produce una HLT independiente del contexto (solo dependiente de la señal, o sea **señal-específica**; Lozada, 1990), insensible a la CI y de duración intermedia (entre 2 y 5 días). Estas propiedades son realmente contrastantes e implican diferencias muy fundamentales en las características de los mecanismos implicados. En efecto, el hecho de que para una HLT sea indispensable la síntesis *de novo* de proteínas, mientras que la otra pueda formarse y persistir por un período intermedio sin síntesis, está marcando grandes diferencias a nivel de los mecanismos celulares y moleculares que sirven a cada tipo de memoria. Procesos de memoria, o fases de un mismo proceso, que tienen poca persistencia temporal se los considera independientes de la secuencia de eventos que conduce a la producción de proteínas nuevas (ej. Ng & Gibbs, 1991; Goelet et al, 1986). Por ello, resulta muy coherente que la HLT masivo-dependiente sea al mismo tiempo insensible a los inhibidores de la síntesis de proteínas y tenga una duración intermedia. La confirmación de que sólo la HLT espaciado-dependiente es contexto-específica, sugiere fuertemente que este tipo de memoria, a diferencia de la inducida por el entrenamiento masivo, es mediada por un proceso asociativo contexto-señal (Tomsic et. al., 1998; Wagner, 1976, 1978, 1979).

CAPITULO 7

DISCUSIÓN GENERAL.

1. Habitación a largo término en *Chasmagnathus*: Conclusiones a partir del análisis de las tres propiedades universales de los procesos mnésicos.

El estudio del proceso de la habitación a largo término en *Chasmagnathus*, desde el punto de vista de lo que se considera las tres propiedades universales de toda memoria, nos conduce a una profunda reconsideración de la identificación y caracterización del proceso mnésico en cuestión.

1.1 La consolidación depende de la síntesis de proteínas. En los Capítulos 3, 4 y 6 se presentan evidencias concluyentes de que la memoria de *Chasmagnathus*, inducida por la presentación espaciada de estímulo de peligro (la pantalla pasante), es deteriorada por interrupciones en el proceso de síntesis *de novo* de proteínas. El efecto amnésico es revelado tanto por interferencias directas (cicloheximida) como indirectas (actinomicina D), y esta coincidencia (conclusión Capítulo 4) nos permite asegurar que la síntesis es un paso necesario en la cascada de eventos bioquímicos relacionados con la formación de la memoria a largo término. La amnesia así inducida parece ser irreversible, puesto que su efecto se manifiesta aún hasta 120 horas después del entrenamiento. Los resultados no descartan sin embargo la existencia de una memoria residual, ya que los animales tratados no presentan una recuperación total de la respuesta; un hecho que no sorprende puesto que los porcentajes de inhibición, estimados bioquímicamente, no superan el 92 %.

El efecto amnésico de CI parece expresarse en forma diferente respecto a las fases de evaluación. Como se observa en los resultados del Capítulo 6, la dosis mínimas efectivas de la CI afectan la retención en el primer ensayo y no durante el reentrenamiento. Solo con dosis mayores, cercanas al límite tolerable sin secuelas inespecíficas, la amnesia se expresa en ambas fases. Este "orden de aparición" del efecto puede estar relacionado con la forma en que los mecanismos responsables de la evocación mnésica son activados—un tema que trataremos luego en esta misma Discusión.

Se demostró asimismo que la memoria del contexto *per se* resulta también afectada por los inhibidores de la síntesis de proteínas. Este hecho,

junto a resultados anteriores demuestran que la HLT es contexto-específica, constituye una sólida evidencia en apoyo a la idea de que este proceso mnésico es fuertemente dependiente del contexto.

1.2 La retención de la memoria depende de un período de consolidación que sigue al entrenamiento o se inicia durante el mismo. La determinación del período de consolidación en los procesos mnésicos es de especial relevancia para la comprensión de los mecanismos que los sirven. Una idea generalmente aceptada es que la síntesis *de novo* de proteínas constituye un paso decisivo en la formación de una memoria estable (Goelet et al, 1986; Patterson, Alvarado, Warner, Bennett & Rosenzweig, 1986). De ahí entonces que se recurra habitualmente al empleo de inhibidores de esa síntesis para marcar la frontera entre memoria lábil y memoria consolidada (Ng & Gibbs, 1991; Rose & Jork, 1987). Respecto a la HLT formada por entrenamiento espaciado, el límite estaría entre 2 y 6 horas después de la administración de cicloheximida. Sin embargo, cuando se estudió este extremo de la ventana de tiempo con otras drogas, se encontró un valor más pequeño. Concretamente, se demostró amnesia de la HLT no más allá de 1 hora postentrenamiento, con agentes tan diversos como escopolamina (Berón de Astrada 1999), inhibidores de PKA (Romano et. al, 1996^a, 1996) o saralacina (Delorenzi 1996), y por otro lado, se ha encontrado un tiempo similar para los efectos facilitadores de angiotensina (Delorenzi et. al, 1995, 1996) o de activadores de PKA (Romano et. al. 1996^a, 1996b). Esta disparidad entre el límite temporal máximo para efecto amnésico de cicloheximida (entre 2 y 6 horas), y el que se estima para los agentes ya mencionados, podría ser interpretado a la luz de la hipótesis del "time-locked" (Davis & Squire, 1984; Gibbs & Ng, 1979), según la cual el proceso de consolidación de memoria consiste en una serie de etapas secuencialmente dependientes. En otros términos, las drogas que demostraron tener una ventana temporal más acotada, estarían actuando en un estado temprano del período de consolidación, mientras que la acción de la cicloheximida ocurriría en un estado tardío de la secuencia de eventos (Schoeley, Rose, Zamani, Bock & Schachners, 1993). Relacionado con este

tema, están los recientes resultado del Laboratorio con el HLT en Chasmagnathus, indicando que después de un entrenamiento espaciado, pero no después de un entrenamiento masivo, se demuestra la activación del factor de transcripción Rel/ κ B en dos etapas diferenciadas, posteriores al fin del entrenamiento, i.e. una temprana inmediatamente después, y una tardía, a las 4 horas (Freudenthal et. al,1997, y datos no publicados). No se descarta entonces la posibilidad de que en correspondencia con las dos etapas de activación del factor, existan dos olas de síntesis de proteínas (Freeman, Rose & Scholey, 1995; Tiunova, Anokhin, Schachner & Rose, 1998) ya que podrían incluirse dentro del intervalo máximo estimado hasta el momento para la ventana.

1.3 El nivel y duración de la retención de la memoria depende del intervalo entre ensayos de entrenamiento. La primera conclusión de los estudios del Capítulo 5 es que el nivel, la duración y la modalidad de expresión de la retención de la HLT dependen del espaciamiento entre los ensayos de entrenamiento. En un primer análisis, esta conclusión resulta simplemente confirmatoria de una extensa bibliografía sobre el efecto diferencial del intervalo entre ensayos. Sin embargo, a medida que se profundiza en el estudio de estos resultados, comienza a percibirse que estamos enfrentando un caso en que la relación entre retención de la memoria y tipo de entrenamiento es extremadamente compleja. Para un mejor acercamiento al tema, recordamos sucintamente los puntos salientes de los resultados:

- a) Si se mantiene constante el IEE (171 seg.), **entrenamiento espaciado**, y se disminuye la cantidad de entrenamiento (desde 30 ensayos), hay un punto de inflexión ($15 > pdi > 10$) desde donde no se obtiene retención en ninguna de las dos fases de evaluación.
- b) Si se mantiene constante el número de ensayos (30) y se disminuye el IEE (desde 171 seg.), hay un punto de inflexión ($27 < pdi > 9$ seg.) desde donde no se obtiene retención en ninguna de las dos fases de evaluación.

- c) Si se da un entrenamiento sin intervalo (IEE=0) **entrenamiento masivo**, y se aumenta la cantidad de entrenamiento, hay un punto de inflexión ($120 < \text{pdi} > 60$) por encima del cual se obtiene retención en la fase de reentrenamiento, pero no en el primer ensayo de evaluación.

- d) Aparentemente, el aumento en la cantidad de ensayos no permite que un entrenamiento masivo produzca retención en el primer ensayo de evaluación. En los experimentos del Capítulo 5, se llegó a 300 ensayos sin lograr la diferencia CT-TR para el primer ensayo, y experimentos recientes del laboratorio (Hermitte, comunicación personal) demostrarían que tampoco se mostró retención después de 1000 ensayos, i.e. después de casi tres horas de entrenamiento masivo.

- e) Si entre entrenamiento y evaluación, se introduce un aumento o una disminución sustancial (1:3) en el valor de IEE, en el rango 27-135, se observa un deterioro en la retención en la fase de reentrenamiento.

La consideración comprehensiva de estos puntos, nos llevó a postular que los diferentes tipos de entrenamiento (espaciado vs. masivo) comprenden dos clases de **mecanismos** mnésicos diferentes en la HLT. La especulación de que dos componentes discernibles, producidos por diferentes requerimientos de estimulación, concuerda con el modelo de habituación propuesto por Dafters (Dafters, Odber, Miller, 1988) y con los resultados obtenidos con otros modelos y paradigmas ya citados (e.g. *Drosophila*, Tully et. al, 1994; *Apis*, Gerber et. al, 1998).

2. Dos mecanismos mnésicos diferentes cuya activación depende de la distribución temporal de los ensayos durante el entrenamiento.

Los experimentos realizados en el Capítulo 6 vinieron a en apoyo de la hipótesis planteada en el punto anterior. El mecanismo desencadenado por el entrenamiento espaciado depende de la invarianza del contexto, lo que junto con los resultados indicativos de que es también afectado por inhibición latente y extinción (Tomsic, 1998), permite concluir que el mecanismo implica un proceso asociativo contexto-señal. En contraste, la retención inducida por el entrenamiento masivo en la fase de reentrenamiento, resulta indiferente al cambio en las claves contextuales, descartando así la posibilidad de un proceso asociativo contexto-señal. Por el otro lado, la inhibición de la síntesis *de novo* de proteínas en un porcentaje mayor al 92 % bloquea la retención basada en el entrenamiento espaciado, en ambas fase de la evaluación, pero no incide en la retención en el reentrenamiento inducida por el entrenamiento masivo. Finalmente, la retención producida por el entrenamiento espaciado es de largo término mientras que la basada en el masivo es de duración intermedia.

Una manera de concebir el funcionamiento de los dos mecanismos estaría dada por la teoría asociativa de la habituación (Wagner 1976, 1978, 1979). De acuerdo a esta teoría, que es una extensión de la de evocación diferencial (Wagner, Rudy & Whitlow, 1973), un estímulo resulta actualizado ("puesto a disposición") durante la sesión de evaluación, cuando su representación memorial ha sido trasladada desde una memoria de largo término (*long-term storage*) a una de corto término (*short-term storage*), de tal manera que el estímulo es "esperado" al momento de la presentación del primer ensayo. Veamos a continuación cómo funcionarían los dos mecanismos en el caso concreto que estamos estudiando, considerando que aquí el estímulo es la señal (estímulo de peligro).

Cuando los cangrejos recibieron entrenamiento espaciado, la evocación resulta de la exposición de esos animales, durante la etapa de adaptación de la

evaluación, a las mismas claves contextuales a las que ya habían sido expuestos durante el entrenamiento. Esta posibilidad de evocación se atribuye, entonces, al hecho de que el intervalo entre ensayos de entrenamiento fue suficientemente extenso como para permitir una asociación contexto-señal (Whitlow & Wagner, 1984). Durante el reentrenamiento, los ensayos sucesivos permiten el fortalecimiento de la representación memorial de la señal que ya estaba instalada en la memoria a corto término por la evocación contextual. Si entre entrenamiento y evaluación, se introduce un cambio drástico en las claves contextuales, o si el porcentaje de inhibición producida por los antibióticos es suficientemente alto como para impedir la consolidación de la representación del contexto, no es posible el traslado de esa representación desde la memoria de largo término a la de corto término. Como consecuencia, desaparece la retención de la respuesta habituada en ambas fases de la evaluación. Por otro lado, si el cambio contextual no es drástico o la dosis de los antibióticos no produce un alto porcentaje de inhibición, la representación de la señal resulta solo parcialmente re-instalada durante la pre-fase de la evaluación, de tal manera que si bien la retención desaparece en el primer ensayo, la reiteración de la señal en los ensayos sucesivos posibilita el surgimiento de la retención en el reentrenamiento.

Cuando los cangrejos reciben un entrenamiento masivo, la brevedad del intervalo entre estímulos impide la asociación contexto-señal, resultando entonces solamente una representación de la señal. La reinstalación de esta representación durante la evaluación no depende ya de una exposición al mismo contexto durante el período de adaptación, sino de la presentación de la señal durante el primer ensayo. De ahí entonces, que no exista nunca retención en el primer ensayo y que el cambio de contexto no afecte la retención.

3. Postulación del modelo: dos tipos de memoria y un mismo estímulo de peligro.

El hecho que la inhibición de la síntesis de proteínas afecte la retención producida por entrenamiento espaciado y no por el masivo, indica que las diferencias entre los dos mecanismos no se limitan a disparidades en la expresión comportamental, sino que comprenden también otras a nivel de los componentes de los mecanismos. Consecuente con esta diferencia mecanística está el hecho de que la retención inducida por el entrenamiento espaciado sea a largo-término y la correspondiente al entrenamiento masivo sea de duración intermedia.

Una serie de resultados en el Laboratorio han agregado nuevos ejemplos de diferencias mecanísticas entre ambos procesos. Se sugiere que el proceso basado en el entrenamiento espaciado, a diferencia del masivo, involucra la vía de transducción de señales c-AMP dependiente (Romano et. al., 1996 a,b), la activación del factor de transcripción como Rel/ κ B (Freudenthal.et. al., 1997), la participación del sistema colinérgico muscarínico (amnesia por escopolamina y facilitación por oxitremorina; Berón de Astrada & Maldonado, 1998; Torres C, resultados no publicados) y la facilitación por angiotensinas (facilitación por angiotensina II y amnesia por saralasin; Delorenzi et. al., 1995,1996,1997; y Delorenzi, comunicación personal).

Estas notables diferencias entre los procesos basados en entrenamientos con diferentes intervalos entre ensayos, nos llevan a proponer que cada mecanismo estaría sirviendo a un tipo de memoria diferente. La memoria producida por el entrenamiento espaciado, a la que llamamos **memoria contexto-señal (MCS)**, y la producida por el entrenamiento masivo, a la que llamamos **memoria señal (MS)**. Para cada uno de estos tipos de memoria, se viene definiendo en el Laboratorio propiedades distintas, tanto desde el punto de vista comportamental como mecanístico, las que resumimos en el siguiente cuadro:

Memoria contexto- señal (MCS)	Memoria señal (MS)
<p>Adquisición únicamente por entrenamiento espaciado (ej. 30 ensayos separados por 81 seg.)</p>	<p>Adquisición únicamente por entrenamiento masivo (ej. ≥ 300 ensayos separados por 0 seg.)</p>
<p>La retención de la memoria es expresada tanto en el primer ensayo de evaluación como en el reentrenamiento</p>	<p>La retención de la memoria es expresada únicamente durante la fase final de la evaluación (reentrenamiento)</p>
<p>Memoria asociativa entre contexto y señal (la respuesta condicionada resulta disminuida por un cambio contextual, así como por inhibición latente o extinción) La retención de la memoria persiste al menos por cinco días.</p>	<p>Memoria no asociativa (habitución). La respuesta habituada no es disminuida por un cambio contextual. La retención de la memoria no persiste por mas de 48 horas.</p>
<p>La retención de la memoria depende de la síntesis <i>de novo</i> de proteínas (Es sensible a cicloheximida y actinomicina-D)</p>	<p>La retención de la memoria no es afectada por el bloqueo de la síntesis proteica (Es insensible a cicloheximida)</p>
<p>La vía de transducción de señales c-AMP dependiente está involucrada (La memoria es facilitada por activadores de PKA y disminuidas por inhibidores)</p>	<p>La vía de transducción de señales c-AMP dependiente parece no estar involucrada (inhibidores o activadores de PKA no parecen afectar esta memoria)</p>
<p>Después del entrenamiento espaciado se revela un mayor nivel de actividad del factor de transcripción Rel/κB-like en extractos nucleares de cerebro</p>	<p>Después del entrenamiento masivo no se revela un mayor actividad del factor de transcripción Rel/κB-like</p>
<p>Mecanismos colinérgicos muscarínicos están involucrados en la memoria contexto-señal (La MCS es bloqueada por escopolamina y facilitada por oxtremorina)</p>	<p>No es afectada por escopolamina</p>

A esta altura de nuestro análisis, es oportuno discutir qué es lo que permite decir que una memoria es diferente de otra. **Una memoria se define por la tarea aprendida.** Es decir, si un proceso mnésico, cualquiera sea el número de fases distintas que lo integran, conduce a la construcción de una misma tarea, se trata entonces de una sola memoria. Así, por ejemplo, en el paradigma extensamente usado por Tully y colaboradores (1994) con Drosophila, la llamada “memoria resistente a la anestesia” y la “memoria de largo término” son fases de una sola memoria, aquella que corresponde a la tarea “evitar un cierto olor”. No se trata entonces de dos memorias sino de dos componentes de una misma memoria.

Nuestra hipótesis de las dos memorias ha recibido últimamente un fuerte apoyo experimental. Resultados obtenidos por Pereyra y publicados en sendos trabajos han permitido concluir, mediante análisis de imágenes desde filmaciones sistemáticas de las respuestas del cangrejo al estímulo de peligro, (Pereyra et. al., 1998; Pereyra Gonzalez Portino & Maldonado, 1999), lo siguiente:

a) Durante el entrenamiento espaciado la respuesta de escape es reemplazada por una de congelamiento (*freezing*), que sería entonces la respuesta condicionada de la **MCS**. Esta respuesta se mantiene al menos por 24 horas.

b) Durante el entrenamiento masivo, la respuesta de escape se desvanece sin ser reemplazada por *freezing*. La ausencia de respuestas defensivas constituye la respuesta habituada de la **MS** que se mantiene al menos por 24 horas.

El hecho que la presentación repetida de un mismo estímulo de peligro produzca dos tipos diferentes de memoria según el intervalo entre presentaciones, constituye un hecho totalmente novedoso en la bibliografía.

4. Ubicuidad de los dos tipos de memoria dentro de las categorías ofrecidas por la Psicología Experimental.

Aceptada la conclusión de que estamos ante dos tipos diferentes de memoria, cabe preguntarse acerca de la caracterización de cada uno de esos dos procesos. No parece haber dificultad en identificar la **MS** como un ejemplo de habituación clásica. Es decir, el cangrejo aprende a ser indiferente al estímulo iterativo. Respecto a la **MCS**, sin embargo, la caracterización ofrece más dificultad. Se ha demostrado que el *freezing*, exhibido a las 24 horas por los animales entrenados con espaciamiento es contexto-específico (Pereyra et al., 1999), por lo que podría suponerse que se trata de un caso de condicionamiento contextual, es decir, un condicionamiento a claves del entorno en ausencia de un estímulo condicionado discreto (Fanselow & Tighe, 1988). Un ejemplo típico de tal proceso es el del condicionamiento contextual de miedo (*contextual fear conditioning*) en ratas, donde el estímulo incondicionado es dado en un contexto diferenciado, sin contingencia con un estímulo condicionado discreto, de tal manera que el congelamiento es provocado por las claves del entorno (e.g. Fanselow, DeCola & Young, 1993; Fanselow & Tighe, 1988). No obstante, no es posible encuadrar la **MCS** como *contextual fear conditioning*, puesto que los trabajos de Pereyra (1999) demostraron que el contexto por sí solo no evoca el *freezing* de *Chasmagnathus*. Los cangrejos muestran congelamiento únicamente cuando el estímulo de peligro está presente en el contexto condicionado, es decir, el congelamiento no es una respuesta al contexto sino a la señal presentada en el contexto específico. Esto ilustra la dificultad de tipificar el aprendizaje asociativo que conduce a **MCS** dentro de las categorías establecidas por la Psicología Experimental.

5. Memoria del *timing*: La retención de la HLT en *Chasmagnathus* se ve afectada cuando se cambia el IEE entre entrenamiento-evaluación.

Hemos demostrado en varios de los experimentos del Capítulo 5, que para frecuencias intermedias en una proporción de 1:3, uno de los parámetros que definen al estímulo es el intervalo entre ensayos. Es decir, el animal está tomando como dato que distingue a esa señal que aparece repetidamente, el

6. Valor adaptativo de los dos tipos de memoria. Posible relación con los estímulos ambientales.

Ante las características tan diferentes de la *MS* y la *MCS*, podría suponerse que la presentación iterativa del estímulo de peligro cobra un significado diferente para *Chasmagnathus* según sea masiva o espaciada. Esta interpretación tiene sólo una base especulativa, pero vale la pena ensayarla con un doble propósito. En primer lugar, demostrar la posibilidad de suponer que dos patrones distintos de espaciamiento pueden actuar señalizando peligros diferentes, y segundo, entender el valor adaptativo del tipo de memoria que cada patrón induce. La presentación espaciada significaría para el cangrejo la aparición reiterada de un predador tenaz, mientras que la misma estimulación pero a intervalos muy breves, representaría las oscilaciones continuadas de la densa vegetación que constituye su hábitat (Tomsic et. al., 1993). La sostenida presencia de un predador (entrenamiento espaciado) induciría al animal a usar, en lugar de la huida, una defensa mas críptica y energéticamente más económica (Pereyra et al, 1998). Por el contrario, la casi ininterrumpida estimulación que naturalmente se produce por las oscilaciones de la vegetación durante una tormenta de viento, produce una abrupta caída de la respuesta de escape sin ser reemplaza por otra estrategia defensiva.

7. Propuesta de un modelo interpretativo. Funcionamiento de los mecanismos que producen los dos tipos de memoria. (Figura 29).

Durante la presentación repetida del estímulo de peligro en la sesión de entrenamiento, se activan dos mecanismos mnésicos diferentes, a los que identificamos como mecanismo de "repetición" y mecanismo de "intervalo". Cada mecanismo procesa información relacionada con prámetros distintos del mismo entrenamiento. El mecanismo de "repetición" es activado por la reiteración de los ensayos, computando el numero de estímulos (señales) presentados. El mecanismo de "intervalo" es activado por la existencia de lapsos entre ensayos y produce la asociación contexto-símbolo durante los intervalos sucesivos.

El resultado de la actividad del mecanismo de "repetición" es la representación memoria de la señal, es decir **la memoria de la señal**, cuya fuerza es función del número de presentaciones (ensayos) durante el entrenamiento. Su evocación se produce por una nueva presentación del estímulo (primer ensayo de la evaluación), de modo que la expresión de esa memoria (retención) se evidencia sólo en el reentrenamiento. El resultado de la actividad del mecanismo de "intervalo" es la representación memorial de la asociación del contexto y el estímulo, es decir **la memoria contexto-señal**, cuya fuerza es función de la integración de los valores de asociación en cada intervalo (Wagner, 1976, 1978, 1979). Su evocación se produce por la sola exposición al contexto de entrenamiento, de modo que la expresión de esta memoria (retención) se evidencia en el primer ensayo de evaluación y en el reentrenamiento.

Por lo tanto, con la actividad de cualquiera de los dos mecanismos se obtiene retención en la fase de reentrenamiento. Sin embargo, el valor de la retención depende en un caso de la fuerza de la memoria de la señal, mientras que en el otro de la fuerza de la memoria contexto-señal.

Puesto que puede haber diferentes números de ensayo de entrenamiento y diferentes extensiones del intervalo entre ensayos, es posible concebir distintas grados de participación de los dos mecanismos durante un mismo entrenamiento. Sin embargo, los protocolos de entrenamiento masivo y entrenamiento espaciado usados en esta Tesis, deben considerarse como casos extremos, es decir, casos en los que está actuando uno solo de los mecanismos propuesto: el mecanismo de "repetición" para el masivo y el de "intervalo" para el espaciado.

tiempo que transcurre entre una presentación y la siguiente. Cuando se varió el intervalo entre ensayos, del entrenamiento a la evaluación, y sin importar el sentido del cambio, el animal deja de reconocer al estímulo y no muestra retención en la fase de reentrenamiento. En Lozada (1993) se había demostrado la estímulo-especificidad respecto del tamaño y orientación de la presentación de la señal. En este caso, lo que comprobamos es el peso que tiene en la caracterización del estímulo, el tiempo que transcurre entre las apariciones iterativas del estímulo. Indicando que estamos estaríamos frente a un caso de frecuencia-especificidad Este análisis nos suponer plantear que Chasmagnathus posee un "contador temporal" capaz de medir el tiempo transcurrido entre ensayos, de manera tal que el tiempo representa un parámetro más en la definición del estímulo. Un antecedente que podemos citar para nuestro modelo son los resultados de Lozada (1993), en los que se exhibía retención en la evaluación (un bloque de 15 ensayos) cuando los grupos entrenados con un intervalo de 27 seg., eran evaluados con la misma frecuencia, pero, no cuando se los evaluaba con una frecuencia altamente superior (720 seg.). Un resultado interesante se obtuvo cuando el cruce de frecuencias se hizo en el otro sentido, es decir, animales entrenados con un IEE de 720 seg., mostraban retención al ser evaluados tanto con 720 como con 27 seg. Una explicación posible de esta aparente generalización de 720 a 27 seg. es que para un espaciamiento tan grande como 720 seg., el "contador" se ve superado por el tiempo transcurrido entre los ensayos, y, no estaría tomando como característica de la señal la distribución temporal de los ensayos de entrenamiento. Es decir, el entrenamiento sería considerado como una sucesión de eventos aislados que no guardan relación temporal uno con otro, de tal manera que cuando el animal vuelve a ser confrontado con el estímulo durante la evaluación, reconoce la señal solo por sus otras cualidades, y, no surgen entonces diferencias entre la señal del entrenamiento y de la evaluación.

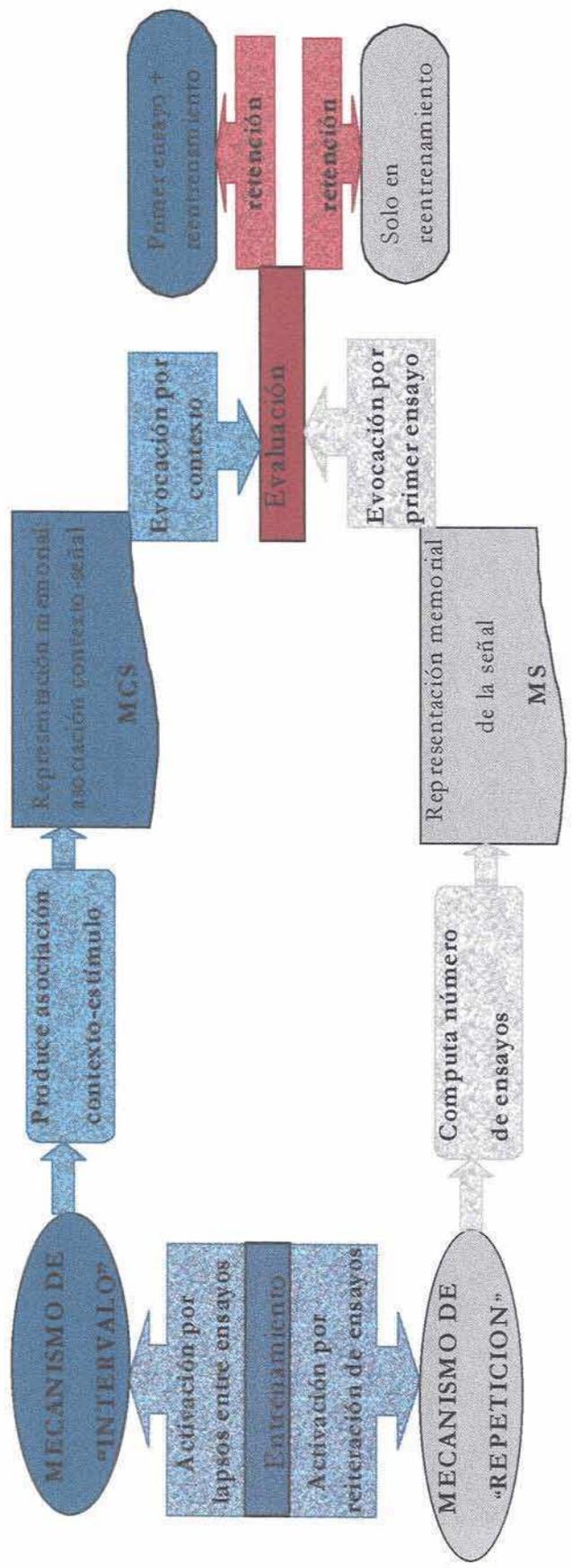


Figura 29: Modelo interpretativo. Funcionamiento de los mecanismos que producen los dos tipos de memoria en el proceso de habituación de *Chasmagnathus*.

REFERENCIAS

- Abbott J. Comparative physiology of the blood-brain barrier (pp 371-396). En MWB Bradbury (ed). Physiology and pharmacology of the blood-brain barrier. Springer Verlag : Berlin (1992).
- Abbott J. Absence of blood-brain barrier in the crustacean, *Carcinus maenas*. Nature. 225:291-293 (1970).
- Agar W.E. The regulation of behavior in water-mites and some other arthropods, J. Comp. Psychol. 7 : 39-74,1927
- Aggio J., Rakitin A. & Maldonado H. Serotonin-induced short- and long-term sensitization in the crab Chasmagnathus. Pharmacol. Biochem. & Behav. 53:441-448 (1996).
- Alkon J.F., Bank B., Natio S., Chung C., Ram J. & Rasmusen H.. Protein synthesis inhibition prolongs Ca²⁺ mediated reductions of K⁺ currents. Proc. Natl. Acad. of Sci. USA. 84:6949-6952 (1987).
- Anderson J.R. & Bower G.H. Human associative memory. Washington DC: Wiston (1973).
- Anokhin K.V. & Rose S.P.R. Learning-induced increase of immediate early gene messenger RNA in the chick forebrain. Eur J. Neurosci. 3:162-167 (1991)
- Anokhin K.V., Mileusnic R., Shamakina I.Y. & Rose S.P.R.. Effects of early experience on c-fos gene expression in the chick forebrain. Brain Res. 544:101-107 (1991)
- Applewhite B.P., Gardner F.T. & Lapan E. Physiology of habituation learning in a protozoan. Transactions of the NY Acad. of Sci. 31:842-849 (1969).
- Bailey C.H. & Kandel E.R. Structural changes underlying long-term memory storage in *Aplysia*: a molecular perspective. Semin. Neurosci. 6:35-44 (1994).
- Bailey C.H., Chen M., Keller F. and Kandel E.R. Serotonin mediated endocytosis of ApCam: an early step of learning related synaptic growth in *Aplysia*. Science. 256:645-649 (1992).
- Barraco D.A. & Stettner L.J. Antibiotics and memory. Psychol Bull. 83:242-302 (1976).

- Barraco D.A., Lovell K.L. & Eisenstein E.M. Effects of cycloheximide and puromycin on learning and retention in the cockroach *Periplaneta americana*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15:489-494 (1981).
- Bateson P.P.G. The specificity and the origins of behavior. *Adv. in the Study of Behav.* 6:1-20 (1976).
- Bennett E.L., Flood J.F., Orme A., Rosenzweig M.R. & Jarvik M. Minimum duration of protein synthesis needed to establish long term memory. *Int. Soc. Biochem. Abstr.* 5:476 (1975).
- Bennett E.L., Rosenzweig M.R. & Flood J.F. Protein synthesis and memory studied with anisomycin (pp 319-330). In: S Roberts, A Lajtha & WH Gispen (eds). *Mechanisms regulations special function of protein synthesis in the brain*. Amsterdam: Elsevier (1977).
- Berman R.F., Kesner R.P. & Partlow L.M. Passive avoidance impairment in rats following cycloheximide injection into amygdala. *Brain Res.* 158:177-188 (1978).
- Berón de Astrada M., Maldonado H. Two related forms of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by scopolamine. *Pharmacol. Biochem. And Behav.* In press(1999)
- Bitterman M.E. Vertebrate-invertebrate comparisons. En HJ Jerison & I Jerison (eds). *Intelligence and evolutionary biology* (pp 251-276). Berlin: Springer-Verlag (1988).
- Boccacio G.L. & Quesada Allué L..A. Interference of sodium dodecyl sulfate in the Bradford assay for protein quantification. *Anal Asoc. Quim. Arg.* 77: 79-88 (1989).
- Bock A. Uber das Lernvermogen bei Assein, *Z Verggl Physiol*, 29: 595-637 (1942).
- Booth D.A. Protein synthesis and memory (pp 27-58). In: JA Deutsch (ed). *Physiological basis of memory*. New York: Academic Press (1973).
- Botzer D., Markovich S., & Susswein A. Multiple memory processes following training that a food is inedible in *Aplysia*. *Learn. & Mem.* 5: 204-219 (1999).
- Bradford M.M. *Ann Biochem.* 72:248-254 (1976).

- Braun G. & Bicker G. Habituation of an appetitive reflex in the honeybee. *J. of Neurophysiol.* 67:588-598 (1992).
- Breland K. & Breland M. The misbehavior of organisms. *Am. Psychologist.* 61:681-684 (1961).
- Brunner D. & Maldonado H. Habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *J. Comp. Physiol.* 152:687-694 (1988).
- Cady W.G. Piezoelectricity. New York: Dover (1964).
- Cain D.P., Hargreaves E.L., Boon F. & Dennison Z. An examination of the relation between hippocampal long-term potentiation, kindling, afterdischarge, and place learning in the watermaze. *Hippocampus.* 3:153-163 (1993).
- Caine N.G. Unrecognized anti-predator behaviour can bias observational data. *Anim. Behav.* 39:195-197 (1990).
- Campbell B.A., Jaynes J. Reinstatement. *Psychol. Rev.* 73:478-480 (1966)
- Campeau S., Hayward M.D., Hope B.T., Rosen J.B., Nestler E.J. & Davis M. Induction of the c-fos proto-oncogene in the rat amygdala during unconditioned and conditioned fear. *Brain Res.* 565:349-352 (1991).
- Carew T.J., Pinsker H.M. & Kandel E.R. Long-term habituation of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *J. Neurobiol.* 20:1-9 (1972).
- Carew T.J. An introduction of cellular approaches used in the analysis of habituation and sensitization in *Aplysia* (339-345). En Peeke HVS & Petrinovich L (eds). *Habituation sensitization and behavior*. New York Academic Press (1984).
- Castellucci V. & Kandel E.R. An invertebrate system for a cellular study of habituation and sensitization. En Tighe T. J. & Leaton R. N. (eds). *Habituation: perspectives from child development, animal behavior, and neurophysiology*. Hillsdale NJ: Erlbaum (1976).
- Chevalier-Skolnikoff S. The Clever Hans phenomenon, cuing, and ape signing: a Piagetian analysis of methods for instructing animals. *Ann. of the New York Acad. of Sci.* 364: 60-93 (1981).
- Christoffersen G.R.F. Habituation: events in the history of its characterization and the linkage to synaptic depression. A new proposed kinetic criterion for its identification. *Prog. in Neurobiol.* 53:45-66 (1997).

- Christoffersen G.R.F. The kinetics of homosynaptic short-term depression in the cell RPa3 of *Helix pomatia* depends upon the level of activation prior to depression. *Comp Biochem. Physiol.* 101 A:221-227 (1992a).
- Clark R.B. Habituation of the polychaete *Nereis* to sudden stimuli. 1. General properties of the habituation process. *Anim. Behav.* 8:82-91 (1960^a).
- Clark R.B. Habituation of the polychaete *Nereis* to sudden stimuli. 2. Biological significance of habituation. *Anim. Behav.* 8:92-103 (1960b).
- Crow T. & Forrester J. Inhibition of protein synthesis blocks long-term enhancement of generator potentials produced by one-trial in vivo conditioning in *Hermisenda*. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA.* 87: 4490-4494 (1990).
- Dafters R.I., Odber J. & Miller J. Associative and non associative tolerance to morphine: support for a dual process habituation model. *Life Sci.* 42: 1987-1996 (1988).
- Davis H. & Memmott J. Counting behavior in animals: a critical evaluation. *Psychol. Bull.* 92:547-571 (1982)
- Davis H.P. & Squire L.R. Protein synthesis and memory: A review. *Psychol Bull.* 3:518-559 (1984).
- Davis M. & Wagner A.R. Startle responsiveness after habituation to different intensities of tone. *Psychon. Sci.* 12: 337-338 (1968).
- Davis M. Effects of interstimulus interval length and variability on startle habituation in the rat. *Physiol. Psychol.* 72:177-192 (1970).
- Davis M. Differential retention of sensitization and habituation of the startle response in the rat. *J. of Comp. and Physiol. Psychol.* 78(2):260-267 (1972).
- Delorenzi A., Pedreira M.E., Romano A., Pirola C.J., Nahamod V.E. & Maldonado H. Acute administration of angiotensin II improves long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurosci. Letters.* 196: 193-196 (1995).
- Delorenzi A., Pedreira M.E., Romano A., Pirola C.J., Garcia S.I., Nahamod V.E. & Maldonado H. Angiotensin II enhances long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res. Bull.* 41:211-220 (1996).
- Delorenzi A., Locatelli F., Romano A., Nahamod V.E. & Maldonado H. Angiotensin II (3-8) (ANG IV) induces long-term memory improvement in the crab *Chasmagnathus*. *Neurosci. Lett.* 226:143-146 (1997)

- Domjan M. & Burkhard B. CD Laughton (eds). The principles of learning and behavior (second edition). Wadsworth, Inc. Belmont California (1986).
- Domjan M. & Galef B. Biological constraints on instrumental and classical conditioning: retrospect and prospect. *Anim Learn Behav.* 11:151-161 (1983).
- Ebbinghaus H. *Über das Gedächtnis*. In HA Ruger and CE Bussenius, trans. New York: Dover (1885).
- Edwards D. H., Heitler W. J. & Krasne F.B. Fifty years of a command neuron: the neurobiology of scape behavior in the craf fish. *Trends in Neurosci.* 22:153-161 (1999).
- Eichenbaum H & Otto T. Hippocampal representation in place learning. *J. Neurosci.* 10:3531-3542 (1990).
- Eisenstein E.M., Altman H.J., Barraco D.A., Barraco R.A. & Lovell K.L. Brain and protein synthesis and memory: The use of antibiotic probes. *Fed. Proc.* 42:3080-3085 (1983).
- Erber J. Retrograde amnesia in honeybees (*Apis mellifera carnica*). *J. Comp. Physiol. Psychol.* 90:41-46 (1976).
- Evans S.M. Non-associative avoidance learning in Nereid polychaetes. *Anim Behav.* 14:102-106 (1966^a).
- Fanselow M.S. & Tighe T.J. Contextual conditioning with massed versus distributed unconditional stimuli in the absence of explicit conditional stimuli. *J. of Exp. Psychol.* 14(2): 187-199 (1988).
- Fanselow M.S., DeCola J.P. & Young S.L. Contextual association in trace conditioning. *An. lear. And Behav.* 9:519-523 (1993)
- Fantino E. & Logan C.A. *The experimental analysis of behavior*. WH Freeman and Co, San Fransisco (1979).
- Fentress J.C. The covalent animal: on bonds and their boundaries in behavioral research. In H. Davis & D. Balfour (eds). *The inevitable bond; examining scientist-animal interactions*, (pp. 44-71). Cambridge:Cambridge University Press (1992).
- Flood J.F., Bennett E.L., Orme A.E. & Jarkiv M.E. Protein synthesis dependent gradient of ECS retrograde amnesia. *Behav. Biol.* 21:307-328 (1977).

- Flood J.F., Bennett E.L., Orme A.E. & Rosenzweig M.R. Effects of protein synthesis inhibition on memory for active avoidance training. *Physiol. Behav.* 14:177-184 (1975^a).
- Flood J.F., Bennett E.L., Orme A.E. & Rosenzweig M.R. Relation of memory formation to controlled amounts of brain protein synthesis. *Physiol. Behav.* 15:97-105 (1975).
- Flood J.F., Bennett E.L., Rosenzweig M.R. & Orme A.E. Influence of training strength on amnesia induced by pretraining injection of cycloheximide. *Physiol. Behav.* 9:589-600 (1972).
- Fredericq L. Sur l'autotomie ou mutilation par voie reflexe comme moyen de defense chez les animaux. *Arch Zool Exp Gen.* 1:413-426 (1883).
- Freeman F.M., Rose S.P., Scholey A.B. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training. *Neurobiol. Learn Mem.* 63:3 291-295 (1995).
- Freudenthal R., Locatelli F., Hermitte G., Maldonado H., Delorenzi A. & Romano A. $\text{N}\kappa\text{-B}$ like DNA binding activity is enhanced after spaced training that induces long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neurosci Lett.* 242:143-146 (1997).
- Frost W.N., Castellucci V.F., Hawkin S.R.D. & Kandel E.R. Monosynaptic connections from sensory neurons of the gill and the siphon withdrawal reflex in *Aplysia* participate in the storage of long-term memory and sensitization. *Proc. Natl. Acad. of Sci.* 82:8266-8269 (1985).
- Gerber B., Wustenberg D, Schutz A. & Menzel R. (1998). Temporal determination of olfactory long-term retention in honeybee classical conditioning: nonmonotonous effects of the training trial interval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 69: 71-78.
- Gerlai R. & Clayton N.S. Analysing hippocampal function in transgenic mice: an ethological perspective. *Trends in Neurosci.* 27:17-51 (1999).
- Gibbs M.E. & Ng K.T. Psychobiology of memory: Towards a model of memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1:113-136 (1977).
- Gibbs M.E. & Ng K.T. Behavioral stages in memory formation. *Neurosci. Lett.* 13:331-339 (1979).
- Glanzman D.L. The cellular basis of classical conditioning in *Aplysia californica* – it's less simple than you think. *Trends in Neurosci.* 15:1617-1630 (1995).

- Glantz R.M. Visual input and motor output of command interneurons of defense reflex pathway in the *crayfish* (pp:259-274). En Hoyle G (ed). Identified neurons and behavior of arthropods. New York: Plenum. (1977).
- Glesson R.A. & Subkoff P.L. The determination of hemolymph cyanate. *Comp Biochem. Physiol. (A)*. 56:411-413 (1977).
- Glickman S.E. Perseverative neural processed and consolidation of the memory trace. *Psychol. Bull.* 58:218-233 (1961).
- Godoy A. & Maldonado H. Modulation of the escape response by D(Ala²) Met-enkephalin in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol. Biochem. & Behav.* 50:445-451 (1995).
- Gold P.E. & Sternberg D.B. Retrograde amnesia produced by several treatments: Evidence for a common neurobiological mechanism. *Science*. 201:367-369 (1978).
- Gould S.J. & Lewontin R.C. The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proc. R. Soc. Lond. B* 205: 581-598 (1979).
- Greenough W.T. Structural correlates of information storages in the mammalian brain: a review and hypothesis. *Trends in Neurosci.* 7:229-283 (1984).
- Griffin J.P. & Pearson J.A. The effect of lesions of the frontal areas of the cerebral cortex on habituation of the flexor withdrawal response in the rat. *Brain Res.* 8:177-180 (1968).
- Groves P.M. & Thompson R.F. Habituation: A dual process theory. *Psychological Rev.* 77:419-450 (1970).
- Groves P.M. & Thompson R.F. Dual-pocess theory of habituation: Neural Mechanisms. (pp. 175-206) En: Peeke HVS y Herz MJ (eds). Habituation (vol2)Physiological substrates. New York: Academic Press (1973).
- Hammer M. & Menzel R. Learning and memory in honeybee . *J. of Neurosci.* 15:1617-1630 (1995).
- Hintzman D.L. Theoretical implications of the spacing effect (pp 77-99). En RL Solso (ed). *Theories in Cognitive Psychology: The Loyola Symposium* . Hillsdale, New Jersey: Lawrence Erlbaum Assoc (1974).

- Hoeger U. & Florey E. Catecholamine degradation in the hemolymph of the Chinese crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. and Physiol.* 92:323-327 (1989).
- Horn G. *Memory imprinting and the brain*. Oxford: Clarendon Press (1985).
- Horridge G.A. The evolution of visual processing and the construction of seeing system. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* (1986).
- Howell D.C. *Statistical methods of Psychology* (2nd Ed). Boston; Duxbury.
- Jaffé K. Effects of cycloheximide on protein synthesis and memory in praying mantis. *Physiol. Behav.* 25:367-371 (1980).
- James W. *Principles of Psychology*. New York: Holt (1890).
- Jeffery K.J & Morris R.G.M. Cumulative long-term potentiation in the rat dentate gyrus correlates with, but does not modify, performance in watermaze. *Hippocampus* 3:133-140 (1993).
- Kamil A.C. & Maudlin J.E. Evolution and learning. (pp 117-134) In RC Bolles and MD Beecher (eds). Lawrence Erlbaum (1988).
- Kandel E.R. & Schwartz J.H. Molecular biology of an elementary form of learning: modulation of transmitter release by cAMP. *Science*. 218:433-443 (1982).
- Kogan J.H., Frankland P.W., Blendy J.A., Coblenz J., Marowitz Z., Schutz G. & Silva A.J. Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr. Biol.* 7:1-11 (1996).
- Korn H., Faber D.S. Escape behavior-brainstem and the spinal cord circuitry and function. *Curr. Op. in Neurobiol.* 6:826-832 (1996)
- Korn J.H. & Moyer K.E. Habituation of the startle response and the heart rate in rat. *Can. J. of Psychol.* 20:183-190 (1966).
- Korol D.L., Abel T.W., Church L.T., Barnes C.A. & Mc Naughton B.L. Hippocampal synaptic enhancement and spatial learning in the Morris swim task. *Hippocampus*. 3:127-132 (1993).
- Krasne F.B. Learning in Crustacea. In: *Invertebrate Learning*. Eds: Corning W., Dyal J. and Willows A. (1973).
- Leaton R. N. Long-term retention of the habituation of lick suppression in rats. *J. Comp. And Physiol. Psychol.* 52:415-419 (1974).

- Lee D.W. Attenuation of c-Fos basal expression in the cerebral cortex of aged rats. *NeuroReport*. 9:15-27 (1998).
- Lindberg, R.G. Growth, population dynamics, and field behavior in the spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall). *Univ. Calif. Publ. Zool.* 59: 157-247, (1955)
- Lozada M., Romano A. & Maldonado H. Long-term habituation to a danger-stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiol. and Behav.* 47: 35-41 (1990).
- Lozada M. Habitación a largo término y especificidad del estímulo en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*. Tesis Doctoral (1993).
- Lundgren P.G. & Carr L.A. Effects of anisomycin and CNS stimulants on the brain catecholaamine synthesis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 9:559-561 (1978).
- Maldonado H. Changes in brain peptides and memory consolidation in the mantis. *J. Insect Physiol.* 26:339-344 (1980).
- Marlin N.A. & Miller R.R. Association to contextual stimuli as a determinant of long term habituation. *J of Exp Psychol: Anim Behav Proc.* 7:313-333 (1981).
- Mc Gaugh J.L. & Hertz M.J. *Memory Consolidation*. San Fransisco: Albion (1972).
- Mcphail E.M. The comparative psychology of intelligence. *Behav. and Brain Sci.* 10:645-695 (1987).
- Meck W.H. & Church R.M. A mode of control model of counting and timing processes. *J of Exp. Psychol: An. Behav. Proc.* 9:320-334 (1983)
- Menzel R., Hammer M. & Maueslshagen J. In N Elsner & G Roth (eds). *Memory stages in the honey bee* (pp 111-119). In *Brain-Perception-Cognition: Proceedings of the 18th Gottingen Neurobiology Conference*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag (1990).
- Montarolo P.G., Goelet P., Castellucci V.F., Morgan J., Kandel E.R. & Scharer A. A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science*. 234:1249-1253 (1986).

- Morris R.G.M. The neural Basis of learning with particular reference to the role of synaptic plasticity: Where are we a century after Cajal's speculations? (pp135-184). En NJ Mackintosh (ed). Animal Learning and Cognition. United Kingdom, Academic Press (1994).
- Nadel L. Behavioral brain research in naturalistic and semi-naturalistic settings (pp 323-342). . In E Alleva (ed). Kluwer, Academic Press (1995).
- Nagy Z.M. & Martin D.J. Hypothermia-induced retrograde amnesia in young and adult Swiss mice. Bull. Psychon Soc. 31:225-228 (1993).
- Nakajima S. Conditioned aversion of water produced by cycloheximide injection. Physiol. Psychol. 2:484-486 (1974).
- Nalbach H.O. Visually elicited escape response in crabs (pp,165-173). En Wiese K., Kren W.D, Tratz J. Reitcher H., Mulloney B. (eds). Frontiers in crustaceans neurobiology. Birkhauser, Zurich (1990).
- Ng K.T. & Gibbs M.E. Stages in memory formation. A review. (pp. 351-369) En RJ Andrew (ed). Neural and behavioural plasticity: the use of a domestic chick model Oxford: Oxford University Press (1991).
- Nguyen P.V. & Atwood H.L. Expression of long term adaptation of synaptic transmission requires a critical period of protein synthesis. J. Neurosci. 10(4):1099-1109 (1990).
- Nicol J.A.C. Responses of Branchioma vesiculosum (Montagu) to photic stimulation. J Mar Biol Assoc UK. 29:303-320 (1950).
- Patel S.N, Rose S.P.R. & Stewart M.G. Training induced dendritic spine density changes are specifically related to memory formation processes in chick *Gallus domesticus*. Brain Res. 463:168-173 (1988).
- Patterson T.A., Alvarado M.C., Warner I.T., Bennett E.L. & Rosenzweig M.R. Memory stages and brain symmetry in chick learning. Behav. Neurosci. 100:856-865 (1986).
- Patterson T.A., Rose S.P.R. & Bradley P.M. Anisomycin and amnesia in the chick: state dependent-effect are not present with intracranial injection. Dev Brain Res. 49:173-178 (1989).
- Peckham G.W. & Peckham E.G. Some observations on the mental powers of spiders. J. Morphol. 1:383-419 (1887).
- Peeke H.V.S. & Veno A. Response independent habituation of territorial aggression in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Zeitschrift fur Tierpsychologie. 40:53-58 (1976).

- Peeke H.V.S. Habituation and the maintenance of territorial boundaries. In HVS Peeke & L Petrinovich (eds). Habituation, sensitization and behavior. (pp 57-101). New York: Academic Press (1984).
- Pedreira M.E., Dimant B., Tomsic D., Quesada-Allue L.A. & Maldonado H. Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab Chasmagnathus. Pharmacol. Biochem. And Behav. 52 (2):385-395 (1995).
- Pedreira M.E., Dimant B. & Maldonado H. Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab Chasmagnathus. Pharmacol. Biochem. And Behav. 54 (4):611-617 (1996).
- Pereyra P., de la Iglesia H. & Maldonado H. Training to testing intervals different from 24 hours impair habituation in the crab Chasmagnathus. Physiol. & Behav. 59:19-25 (1996).
- Pereyra P., Saraco M. & Maldonado H. Decreased response or alternative defensive strategies in escape: two different types of long-term memory in the crab Chasmagnathus J. of Comp. Physiol. (1998).
- Pereyra P., Gonzales Portino E. & Maldonado H. Conditioned defensive freezing in the crab is context-specific but not triggered by the context. Behav. Neurosci. (enviado para su publicación)
- Pfungst O. Clever Hans (the horse of Mr. von Osten) a contribution to experimental animal and human psychology. New York: Holt and Co. (1911)
- Quesada Allué L.A. & Belocopitow E. Eur. J. Biochem. 88:529-541 (1978).
- Quinn W.G. & Dudai Y. Memory phases in Drosophila. Nature. 262:576-577 (1976).
- Rakitin A., Tomsic D. & Maldonado H. Habituation and sensitization to an electrical shock in the crab Chasmagnathus. Effect of background illumination. Physiol. and Behav. 50:477-487 (1991).
- Razran G. Mind in Evolution: And east-West Synthesis of Learned behavior and cognition. Boston: Houghton Mifflin (1971).
- Rescorla R.A. & Holland P.C. Some behavioral approaches to the study of learning (pp 165-192). In MR Rosenzweig & EL Bennett (eds). Neural mechanisms of learning and memory. Cambridge, MA: Mit Press (1976).

- Rescorla R.A. Pavlovian conditioning: It's not what you think it is. *Am. Psychologist*. 43:151-160 (1988).
- Ribot T.A. En DH Tuke (ed). *Memory. A Dictionary of Psychological Medicine*. Philadelphia: Blakiston (1892).
- Riccio D.C & Ebner D.L. Post-acquisition modifications of memory (pp 291-317). En NE Spears & RR Miller (eds). *Information Processing in Animals: Memory Mechanisms*. New York: Lawrence Erlbaum Assoc (1981).
- Romano A., Delorenzi A., Pedreira M.E., Tomsic D. & Maldonado H. Acute administration of a permeant analog of cAMP and a phosphodiesterase inhibitor improves long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Behav. Brain Research*. 75: 119-125 (1996 a).
- Romano A., Locatelli F., Delorenzi A., Pedreira M.E. & Maldonado H. Effect of activation and inhibition of cAMP-dependent protein kinase on long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res*. 735:131-140 (1996b).
- Romano A., Lozada M. & Maldonado H. Non Habituation processes affect stimulus specificity of the response habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Behav. Neurosci*. 105:542-552 (1991).
- Rose S.P.R. & Jork R. Long-term memory in chick is blocked by 2-deoxygalactose, a fucose analogue. *Behav. and Neural Biol*. 48:69-81 (1987).
- Rosenthal R. Experimenter outcome-orientation and the results of the psychology experiment. *Psychol. Bull*. 61: 405-412 (1974).
- Rosenthal R. Biasing effects of experimenters. *Et cetera*. 34: 253-264 (1977).
- Rosenthal R. & Rosnow R.L. *Contrast analysis: Focused comparisons in the analysis of variance*. Cambridge: Cambridge University Press (1985).
- Rosenthal, R. Pavlov's mice, Pfungst's horse, and Pygmalion's PONS: some models for the study of interpersonal expectancy effects. *Ann. of the New York Acad. of Sci*. 364:182-198 (1981).
- Rosenzweig M.R. & Bennett E.L., Lynch G., JL Mc Gaugh J.L. & Weinberger N. M.(eds). Direct processes and modulatory influences in the stages of memory formation (pp 263-288). In *Neurobiology of Learning and Memory*. New York: Guilford Press (1984).
- Roskoski R. Assay of protein kinase. *Methods Enzymol*. 99: 3-6 (1983).

- Russell E.M. Changes on the behavior of *Lebistes reticulatus* upon a repeated shadow stimulus. *Anim. Behav.* 15:574-585 (1967).
- Saraco M. & Maldonado H. Ethanol affects context memory and long term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51(2):223-229 (1995).
- Schiffrin R. M. & Schneider W. Controlled and automatic processing. II. Perceptual learning, automatic attending, and a general theory. *Psychol. Rev.* 84:127-190 (1977).
- Scholey A.B., Rose S.P.R., Zamani M.R., Bock E. & Schachners M. A role for the neural cell adhesion molecule in a late, consolidation phase of glycoprotein synthesis six hours following passive avoidance training of the young chick. *Neurosci.* 55:499-509 (1993).
- Schone H. Learning in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Biol. Bull.* 121: 354-365 (1961).
- Sebeok T.A. The ultimate enigma of "Clever Hans": the union of nature and culture. *Annal of the New York Acad. of Sci.* 364:199-205. (1981)
- Shettleworth S.J. Biological Approaches to the study of learning (pp185-220). In NJ Mackintosh (ed). *Animal Learning and Cognition*. United Kingdom, Academic Press (1994).
- Shettleworth S.J. Varieties of learning and memory in animals. *J of Exp Psychol. Anim. Behav. Proc.* 19:5-14 (1993^a).
- Squires LR & Barondes SH. Variable decay of memory and its recovery in cycloheximide treated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69:1416-1420 (1972).
- Squire L.R. & Davis H.P. Cerebral protein synthesis inhibition. *Behav. Biol.* 13:49-57 (1975).
- Squire L.R., Davis L.P. & Spanis C.W. Neurobiology of amnesia. *Science.* 209: 836-837 (1980).
- Squire L.R. *Memory and Brain*. New York: Oxford (1987).
- Sulliman E.R. Three perspectives of facilitated communication: unexpected literacy, Clever Hans, or enigma?. *Topics in Language Disorders.* 12: 60-68 (1992).

- Thompson R.F. & Spencer W.A. Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol. Rev.* 73: 16-43 (1966).
- Thorpe W.H. Learning and instinct in animal. London: Methuen and Co. London (1963).
- Thorpe W.H. The concepts of learning and their relation to those of instinct. *Physiological Mechanisms in Anim Behavior Symposium. Soc Expl Biol.* 4: 387-408 (1950).
- Timberlake W. & Lucas G.A. Contemporary learning theories: Instrumental conditioning theory and the impact of biological constraints learning In SB Klein and RR Mowrer (eds). (pp 237-275). Lawrence Erlbaum (1989).
- Tiunova A., Anokhin K.V., Schachner M., Rose S.P.R. Three time windows for amnesic effect of antibodies to cell adhesion molecule L1 in chicks. *Neuroreport* 9 (7): 1645-1648 (1998).
- Tomsic D, Rakitin A. & Maldonado H. Morphine and GABA: effects on perception, escape response and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Behavioral Neurosci.* 105:542-552 (1991).
- Tomsic D., Massoni V. & Maldonado H. Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs: ontogenic, ecological and opioid modulation correlates. *J. Comp. Physiol. A.* 173:621-633 (1993).
- Tomsic,D. Modulaciión opiacea de la percepción nociceptiva durante la habituación a un estímulo de peligro en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*. Correlatos ecológicos y posible valor adaptativo. Tesis Doctoral, 1993.
- Tomsic D., Pedreira M.E., Romano A., Hermitte G. & Maldonado H. Context-US association as a determinant of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *An. Lear. Behav.*26(2):196-209 (1998)
- Treisman M. Theory of the mechanism of habituation: The assignment of response to stimuli (pp 57-101). En HVS Peeke & L Petrinovich (eds). *Habituation, sensitization and behavior..* New York: Academic Press (1984).
- Tully T., Preat T., Boyton S.C. & Del Vecchio M. Genetic dissection of consolidate memory in *Drosophila*. *Cell.* 79:35-47 (1994).
- Ungerer A. & Chapouthier G. Shuttle box learning in mice after puromycin injections. *Folia Biol (Krakow).* 23(1):73-79 (1975).

- Wagner A.R., Rudy J.W. & Whitlow J.W. Rehearsal in animal conditioning. *J. of Exp. Psychol.* 97: 407-426 (1973).
- Wagner A.R. Priming in STEM: An information processing mechanism for self-generated depression in performance (pp.95-128). En Thighe T.J. & Leaton R.N. (eds). *Habituation: Perspectives from child development, animal behavior and neurophysiology.* Hillsdale, NJ: Erlbaum (1976)
- Wagner A.R. Expectancies and the priming of STM. (pp 177-209). En SH Hulse, H Fowler & WR Honing (eds). *Cognitive processes in animal behavior.* Hillsdale, NJ: Erlbaum (1978).
- Wagner A.R. Habituation and memory (pp53-82). En A Dickinson & RA Boakes. *Mechanisms of learning and motivation.* Hillsdale, NJ: Erlbaum (1979).
- Whiten A. & Ham R. On the nature and evolution of imitation in the animal kingdom: reappraisal of a century of research. *Advan. Study of Behav.* 21:239-283 (1992).
- Wiersma C.A.G & Yamaguchi T. The neuronal components of the optic nerve of the crayfish as studied by single unit analysis. *J. Comp. Biol.* 128: 333-358 (1966).
- Wiersma C.A.G & Yamaguchi T. Integration of visual stimuli by the crayfish central nervous system. *J. Exp. Biol.* 47:409-431 (1967).
- Wiersma C.A.G & Yamaguchi T. Integration of visual stimuli in the rock lobster. *Vision Res.* 7:197-204 (1967^a).
- Whitlow J.W. & Wagner A.R. Memory and Habituation (pp 103-153). En HVS Peeke & L Petrinovich (eds). *Habituation, sensitization and behavior.* New York: Academic Press (1984).
- Young J.Z. Unit processes in the formation of representations in the memory of *Octopus*. *Proc. Roy. Soc. Series B.* 153:1-17 (1960).
- Wood H. L. & Glantz R.M. Distributed processing by visual interneurons of crayfish brain. I. Response characteristics and synaptic interactions. *J. of Neurophysiol.* 43:729-740 (1980).
- Wood H. L. & Glantz R.M. Distributed processing by visual interneurons of crayfish brain. II. Network organization and stimulus modulation and synaptic efficacy. *J. of Neurophysiol.* 43:741-753 (1980).


DR. H. MALDONADO


LIC. M. E. PEDREIRA