

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Biblioteca Digital FCEN-UBA

Caracterización de interneuronas visuales y su relación con el aprendizaje en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*

Berón de Astrada, Martín
2005

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

“Caracterización de interneuronas visuales y su relación con el aprendizaje en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*”

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

Autor: Lic. Martín Berón de Astrada
Director: Dr. Daniel Tomsic

Laboratorio de Neurobiología de la Memoria
Departamento de Fisiología, Biología
Molecular y Celular

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, julio de 2005

Las primeras palabras son para agradecer a:

Daniel Tomsic, quien con paciencia se empeñó en que cada día pusiera un poco más de mí para llegar a finalizar una etapa de búsquedas y desafíos. Por transmitirme su experiencia y confiar en mí. Por una preparación única. Por haber compartido la emoción del descubrimiento y por la historia de un chico con asma.

Julieta Sztarker, mi compañera de laburo. De horas de pesca, de mirar con anteojos, de charla y de mate. A Laurita Kaczer, Violeta Medan, Mariana Feld, Lía Frenkel, Pablo Jercog, Darío Lemos, Fernando Locatelli, Emiliano Merlo y Ramiro Freudenthal. Por la aventura compartida, las discusiones, más mates y más sonrisas.

Mis queridos compañeros Angel Vidal, Gabriela Hermitte, Arturo Romano, Beatriz Dimant, Maria Eugenia Pedreira y Alejandro Delorenzi. Una palabra. Siempre un gesto sencillo y afectuoso, de colores.

Los más jóvenes Luis Pérez Cuesta, Maria del Valle, Luciano Iribaren, Silvia Pedetta, Natacha Pezzano, Leticia Smal, Sabina Alzogaray, Pablo Ariel, Noel Federman y Damián Oliva. A todos por todos los días, por hacer del laboratorio un hogar y del laburo un contenido.

Mi querido Héctor Maldonado, por la casa, los principios y la presencia. Por esa inquebrantable búsqueda en el crepúsculo del amanecer. Por la alegría y las palabras. Por los caminos con corazón. Gracias.

Mis amigos y siempre gloriosos Colgados del Travesaño, Marianito, Javi, Guchi, Maxi y Naza. A Juli, Carlita, Paula, Mariana, Ceci y Laurita. Lea y Nico. Mis amigos.

Lupe por la música.

Mis tíos Marta, Bruno y Mechita. Danilo y la Gorda. Allá y acá.

Maria Mercedes y Teresa. Por abuelas y porque en ellas empieza mi historia.

a Yamila, Susana y Ezequiel

Los observadores

Los cangrejos de tierra, en la isla de Trinidad Sur, son una pesadilla. Lo espían a usted desde cada rincón y desde cada piedra. Con sus ojos muertos y mirones le siguen los pasos, como diciendo: “Si por lo menos te cayeras, nosotros haríamos el resto”. Acostarse y dormir en cualquier parte de la isla equivaldría al suicidio... Si está de pie, quieto, procuran morderle las botas, mirándolo con fijeza todo el tiempo. Una característica de estos animales, capaces de enloquecer a un solitario es que, pocos o muchos, todos lo miran a uno... Son amarillos y rojos, y, después de las arañas, parecen las más abominables criaturas en esta tierra de Dios.

Apsley Cherry Garrard, *The worst journey in the World*.

Citado en *Cuentos breves y extraordinarios*, por
Jorge Luis Borges y Adolfo Bioy Casares.

Resumen

La formación y mantenimiento de la memoria tienen lugar como resultado de procesos fisiológicos que ocurren en el ámbito de neuronas individuales. Sin embargo, los modelos experimentales para el estudio de la memoria no permiten investigar estos procesos en el animal vivo en momentos en que se encuentra aprendiendo. El propósito de este trabajo fue desarrollar una preparación experimental que permitiese indagar los cambios neurofisiológicos que ocurren en las neuronas de un animal intacto en el momento mismo del aprendizaje. La preparación desarrollada se basa, por un lado, en la capacidad del cangrejo *Chasmagnathus* para formar diferentes tipos de memorias visuales y retenerlas por largo tiempo, y por otro lado en que la rigidez del caparazón del animal y la fácil accesibilidad a buena parte de su cerebro ofrecen importantes ventajas metodológicas para la realización de registros intracelulares estables en el animal intacto. Al tratarse de un animal intacto, pudimos investigar el funcionamiento de diversos tipos de neuronas cerebrales frente a la presentación de estímulos casi naturales y biológicamente relevantes. Además, la estabilidad de los registros intracelulares nos permitió teñir las neuronas y estudiar su ubicación y morfología.

Efectuamos una caracterización funcional de las neuronas de los primeros neuropilos visuales, realizada en base a la respuesta frente a un pulso de luz, que incluye tanto elementos con respuestas pasivas (depolarizantes e hiperpolarizantes) como neuronas que disparan potenciales de acción. Elementos que a su vez pueden presentar respuestas tónicas o fásicas. Una caracterización morfológica de estos tipos celulares incluye tanto interneuronas locales como de proyección. La comparación de estos resultados con los de otros estudios en insectos y crustáceos apoya la hipótesis de que en los artrópodos los elementos que conforman los primeros neuropilos del sistema visual estarían evolutivamente conservados.

El paradigma de memoria visual ampliamente caracterizado en *Chasmagnathus* implica una modificación duradera de la respuesta de escape del animal frente a un estímulo visual de peligro (EVP) consistente en el movimiento de un objeto por sobre el animal. En el cerebro del cangrejo encontramos interneuronas visuales especializadas en responder al mismo EVP que provoca la respuesta de escape del cangrejo, a las que denominamos neuronas detectoras de movimiento (NDM). Una caracterización de las NDM en función de sus propiedades biofísicas intrínsecas, como también de sus campos receptivos, direccionalidad, adaptabilidad, capacidad de integración multimodal, sensibilidad por el contraste, etc., indican que se trata de un grupo heterogéneo de neuronas. No obstante, todas las NDM se ubican en la lóbula (tercer neuropilo óptico) y proyectan al cerebro medio. La morfología general de las NDM está representada en dos tipos de patrones de arborización, ambos definidos por la típica disposición colectora de neuronas detectoras de movimiento descritas en insectos. Encontramos que la presentación repetida del EVP produce modificaciones en la respuesta de las NDM que reflejan de manera muy ajustada las modificaciones comportamentales que ocurren durante el aprendizaje. Más aún, las modificaciones ocurridas como resultado del aprendizaje permanecen en las NDM por largo tiempo, reflejando la memoria de larga duración observada 24 hs luego de la adquisición.

Los artrópodos hacen uso de importantes habilidades cognitivas para ejecutar un rico repertorio de comportamientos, muchos de los cuales están dirigidos visualmente. No obstante, el presente constituye el primer trabajo en el que se identifican neuronas individuales que sirven a un aprendizaje visual en un artrópodo. La ubicación y morfología de estas neuronas indican que, contrariamente a la idea general presupuesta, la lóbula de los artrópodos constituye un núcleo cerebral superior involucrado en funciones de aprendizaje y memoria. Los resultados se discuten también en función de su aporte a la fisiología comparada de la visión.

Summary:

Memory formation and its maintenance result from physiological processes that take place in individual neurons. Nevertheless, due to methodological limitations current experimental models do not allow to investigate these processes while they occur in the living animal. The aim of the present study was to develop an experimental model to overcome such limitations. A model that will allow us to assess the changes occurring in individual cells during learning by recording their activity intracellularly in the intact animal.

The model was based on the visual memory abilities of the crab *Chasmagnathus*, and on the advantages this animal offers to perform in vivo intracellular recordings from its brain neurons. Because the animal is intact and awoken, we were able to investigate the functioning of many different classes of neurons by their responses to quasi-natural and biologically relevant stimuli. The neurons were dye filled intracellularly, which allowed us to describe their morphologies.

A physiological characterization based upon the neuronal responses to a pulse of light revealed many different cellular classes. There are spiking and non-spiking neurons, some of which respond to the light stimulus with depolarization while others show hiperpolarization. In addition, their responses can be either tonic or phasic. On the other hand, the morphological study of these cells reveals that they can be local or projecting interneurons. The comparison of these results with those obtained from insects and other crustaceans supports the idea that neuronal element of the first visual neuropils are largely conserved among arthropods.

The memory paradigm studied in *Chasmagnathus* implies a long-term change of the animal escape response occurred upon the repeated presentation of a visual danger stimulus (VDS), which consists of an object moving overhead. Recording from the brain we found neurons that respond to the same VDS that elicits the escape response. We termed these elements movement detector neurons (MDN). A characterization of MDN based on their intrinsic properties and also on parameter such as their receptive field, direction and contrast sensitivity, multimodal integration abilities, etc., indicates that the group of MDNs is formed by several neuronal subclasses. Yet, all stained MDNs were found to be localized in the lobula (third optic neuropil) and project to the midbrain. Their general morphologies resemble the collator neurons described in insects. Upon repeated VDS presentations, the response of MDNs shows changes that are remarkably identical to the modifications that are observed at the behavioral level. Moreover, the long-lasting behavioral changes, i. e. the long-term memory, are fully acquainted by the changes of performance retained by MDNs.

Arthropod are now known to posses important cognitive abilities, many of which are based on the visual sense. Surprisingly enough, the brain areas involved in the visual memories of these animals were completely ignored. Here, we show the first identification of individual neurons involved in the memory of an arthropod. In contradiction with the general assumption, our results point to the lobula of arthropods as a higher brain center involved in learning and memory. The results are also discussed in terms of their contribution to the comparative physiology of vision.

Indice

Capítulo 1

Introducción general

1.1 La neurobiología del comportamiento	1
1.1.1 Ventajas y limitaciones de los enfoques reduccionista y holista	2
1.2 Los invertebrados como modelos experimentales en la neurobiología	5
1.2.1 Los artrópodos como modelos de aprendizaje y memoria	6
1.3 <i>Chasmagnathus</i> como modelo de aprendizaje y memoria	8
1.4 Anatomía del sistema nervioso central de los decápodos	10
1.4.1 El lóbulo óptico	11
1.4.2 El ganglio supraesofágico	12
1.4.3 El sistema sanguíneo intraganglionar	13
1.5 Fisiología de la visión en decápodos	14
1.5.1 La retina	14
1.5.2 Interneuronas visuales	15
1.5.3 Interneuronas de la lámina	15
1.5.4 Interneuronas de la médula	16
1.5.5 Fibras sensibles al movimiento	17
1.5.5.1 Clasificación de las fibras sensibles al movimiento	18
1.5.5.2 Subclasificación de las fibras sensibles al movimiento	19
1.6 Las fibras sensibles al movimiento en un comportamiento defensivo de crayfish	19
1.7 Hipótesis y objetivos	20
1.7.1 Resumen de los antecedentes	20
1.7.2 Hipótesis general	21
1.7.3 Objetivos	21

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1 Animales, procedencia y mantenimiento	22
2.2 Preparación electrofisiológica	22
2.3 Dispositivo experimental	23
2.4 Estímulos visuales	24
2.5 Procedimiento experimental	25
2.6 Estudios histológicos	26
2.7 Experimentos comportamentales	27
2.8 Estudios neuronales en relación con el comportamiento	28

Capítulo 3

Validación de la preparación experimental

3.1 Introducción	30
3.2 Preparación experimental	30
3.3 Diversidad de respuestas neuronales frente al pulso de luz	30
3.4 Consistencia de los registros neuronales	31
3.5 Reproducibilidad de los registros neuronales	31
3.6 Dependencia de la respuesta neuronal por la intensidad de estimulación	31

Capítulo 4

Caracterización de interneuronas visuales

4.1	Introducción	32
4.2	Clasificación preliminar de interneuronas visuales de <i>Chasmagnathus</i>	32
4.3	Neuronas pasivas tónicas depolarizantes	32
4.4	Neuronas pasivas tónicas hiperpolarizantes	33
4.4.1	Caracterización morfológica de las neuronas Tan	34
4.5	Neuronas sustaining	35
4.5.1	Caracterización morfológica de las neuronas sustaining	36
4.6	Neuronas dimming	36
4.6.1	Caracterización morfológica de las neuronas dimming	37
4.7	Neuronas on-off	38
4.7.1	Caracterización morfológica de las neuronas on-off	38
4.7.2	Neuronas on-off con procesos tangenciales en médula y lóbula	38
4.7.3	Neuronas on-off con procesos tangenciales sólo en la lóbula	39
4.7.4	Neurona on-off columnar	39

Capítulo 5

Caracterización de neuronas detectoras de movimiento

5.1	Introducción	40
5.2	Caracterización fisiológica general de las neuronas detectoras de movimiento	40
5.3	Propiedades electrofisiológicas de las NDM de <i>Chasmagnathus</i>	41
5.3.1	Campo receptivo	42
5.3.2	Sensibilidad por la dirección del movimiento	43
5.3.3	Sensibilidad por la intensidad de luz y el contraste	43
5.3.4	Integración multimodal	44
5.3.5	Registro de más de un tipo de potencial de acción	44
5.4	Ubicación y morfología de las neuronas detectoras de movimiento	44

Capítulo 6

Neuronas detectoras de movimiento y comportamiento

6.1	Introducción	46
6.2	El aprendizaje en las condiciones de la preparación experimental para registros neuronales	47
6.3	Respuesta comportamental y NDM	49
6.3.1	Respuestas periestímulo	49
6.3.2	Respuesta de las NDM durante la fase de adquisición y de retención a corto término de la MCS	49
6.3.3	Respuesta de las NDM durante la fase de adquisición y de retención a corto término de la MS	50
6.3.4	Respuesta de las NDM en la MCS de largo término	51
6.4	Análisis de la reducción en la respuesta de las NDM	53
6.4.1	Modificaciones biofísicas	53
6.4.2	Respuesta de otras interneuronas visuales durante el aprendizaje	54
6.4.3	Relación entre el potencial excitatorio postsináptico y los potenciales de acción evocados	54
6.4.3.1	Relación entrada-salida en la adquisición de la MS	55

6.4.3.2 Relación entrada-salida en la adquisición de la MCS	55
6.4.3.3 Relación entrada-salida en la MCS de largo término	56

Capítulo 7

Discusión

7.1 Distinción entre plasticidad sináptica y memoria	57
7.2 El modelo del cangrejo para estudios neurofisiológicos	58
7.3 Visión en crustáceos	59
7.4 Interneuronas visuales de la lámina y de la médula	60
7.5 Análisis comparativo de la visión en crustáceos	60
7.6 Neuronas detectoras de movimiento	61
7.7 NDM y la respuesta de escape	63
7.8 NDM y memoria	64
7.9 Aporte al conocimiento comparativo de la visión y de la memoria en artrópodos	65
7.10 Consideraciones adicionales sobre las NDM, el comportamiento y la memoria	67
7.11 Conclusiones	68

Participación	69
----------------------	----

Bibliografía	70-81
---------------------	-------

Anexo figuras	
----------------------	--

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

Visual interneurons of the crab *Chasmagnathus* studied by intracellular recordings *in vivo*. Berón de Astrada M, Sztarker J y Tomsic D. *J Comp Phys A*. 187: 37-44. (2001).

Physiology and morphology of movement detector neurons in a crab (Decapoda: *Brachyura*). Berón de Astrada M y Tomsic D. *J Comp Phys A*. 188: 539-551. (2002).

Identification of individual neurons reflecting short- and long-term visual memory in an arthropod. Tomsic D, Berón de Astrada M y Sztarker J. *J Neurosci*. 23(24): 8539-8546. (2003).

Capítulo 1

Introducción general

1.1 La neurobiología del comportamiento

Los animales, como los humanos, actúan en un mundo complejo al que perciben, recuerdan y en el que deben tomar decisiones. El interés de la neurobiología del comportamiento es comprender la relación de estos fenómenos, comúnmente llamados cognitivos (o mentales), con estados del cerebro. Es decir, entender las bases fisiológicas que subyacen a la representación interna del mundo y a la organización y ejecución del comportamiento.

La neurobiología del comportamiento se vale fundamentalmente de dos estrategias experimentales contrastantes. Una de estas estrategias de aproximación, a la que aquí llamaremos estrategia de orden creciente (conocida en inglés como *bottom-up*), concibe la comprensión de los fenómenos mentales a partir del estudio de sus componentes biológicos más elementales y su interacción, para luego en forma progresiva avanzar hacia grados mayores de integración y complejidad. Así, esta idea implica a grandes rasgos, comenzar desde estudios moleculares para pasar después a estudios de fisiología neuronal, de fisiología del sistema nervioso, y finalmente al análisis comportamental. La otra estrategia, a la que llamaremos estrategia de orden decreciente (conocida en inglés como aproximación *top-down*), propone el camino inverso. Es decir, partir del análisis comportamental y, teniendo a éste como guía, descender luego al estudio de los sistemas, de las neuronas y de las moléculas implicadas en el comportamiento.

Debido a la enorme complejidad de los fenómenos comportamentales, no existe hasta la fecha ningún programa de investigación en el que la aplicación de estas dos estrategias haya podido ser completada para los distintos niveles de organización biológica. Como consecuencia de esta complejidad, en todos y cada uno de los paradigmas de estudio del comportamiento, la información que se ha logrado obtener se limita a uno o unos pocos niveles de organización. Cuando la investigación sobre el comportamiento pone énfasis en el análisis a nivel molecular y celular (lo que no quiere decir que no considere en absoluto los otros niveles), la aproximación suele definirse como reduccionista. Por otra parte, cuando la investigación enfatiza el análisis del comportamiento animal como un todo, la aproximación suele definirse como holista. Entre ambos extremos se ubican los muchos otros niveles de análisis del comportamiento que forman parte de las estrategias tanto creciente como decreciente.

En general, el enfoque reduccionista supone el estudio del sistema nervioso en función de sus partes constituyentes: moléculas, una célula, o un grupo pequeño de células. Desde este enfoque las partes se tratan comúnmente de manera desvinculada. Así, en gran medida la observación de un sistema se reduce a la observación de algunas de sus partes, bajo el supuesto de que: a) en estas partes pueden descubrirse principios de organización funcional de índole general y b) de la comprensión de estos principios pueden derivarse más o menos directamente explicaciones sobre el comportamiento. El primero de estos supuestos se satisface en innumerables ejemplos, entre los que vale citar el principio general que rige el modo en que las diferentes células nerviosas de todo el reino animal transmiten su información. El segundo supuesto, sin embargo, carece de ejemplos comparables.

El enfoque holista se centra, en cambio, en el comportamiento y la actividad mental de animales intactos en estado alerta. La escuela Gestalt de psicología experimental sostiene que la percepción sensorial entendida como un todo no puede ser explicada en términos del conjunto de “perceptos” elementales estudiados aisladamente (Koffka, 1935). Este fenómeno originalmente descrito en el campo de la percepción se verifica también para otros procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria (Gilbert et al., 2001, Miyashita, 2004). El enfoque holista, entonces, hace hincapié en el hecho de que los procesos mentales tienen su base física en el cerebro (no en las moléculas o en un número reducido de neuronas) y resultan del “diálogo” entre las diferentes regiones cerebrales.

La psicología experimental, como disciplina dedicada a cuantificar el comportamiento animal en condiciones controladas de laboratorio, ha ayudado a entender reglas que determinan la elaboración de respuestas comportamentales vitales, especialmente aquellas relacionadas con el aprendizaje (ej. Thorndike, 1898; Pavlov, 1975). El marco de referencia que aporta la psicología experimental, junto a los distintos abordajes fisiológicos, fundamentalmente electrofisiológicos, constituyen los pilares en que se basa nuestro conocimiento sobre la representación y codificación, a nivel de sistemas neuronales, de los fenómenos “mentales” de índole perceptual y cognitivo.

1.1.1 Ventajas y limitaciones de los enfoques reduccionista y holista

El cerebro no reproduce fielmente la realidad, sino que desde las primeras etapas de transmisión sensorial tienen lugar procesos de codificación neuronal de la información. Según Mountcastle (1975) *“Todos creemos vivir directamente inmersos en el mundo que nos rodea, sentir sus objetos y acontecimientos con precisión, y vivir en el tiempo real y ordinario. Afirmando que todo eso no es más que una ilusión perceptiva, dado que todos nosotros nos enfrentamos al mundo desde un cerebro que se halla conectado con lo que está “ahí afuera” a través de unos cuantos millones de frágiles fibras nerviosas sensoriales. Esos son nuestros únicos canales de información, nuestras líneas vitales con la realidad. Estas fibras nerviosas sensoriales no son registradoras de alta fidelidad dado que acentúan ciertas características del estímulo mientras desprecian otras. La neurona central es un contador de historias por lo que respecta a las fibras nerviosas aferentes y nunca resulta completamente fiable, permitiendo distorsiones de cualidad y medida en una relación espacial forzada aunque isomórfica entre “fuera” y “dentro”. La sensación es una abstracción, no una réplica del mundo real”*. Estas impresiones, a la vez que contienen el concepto holístico de la actividad mental, ponen de relieve la importancia que tienen las neuronas individuales como unidades de procesamiento. De allí que el conocimiento detallado de las bases fisiológicas del comportamiento requiera inevitablemente comprender el funcionamiento y la participación de las neuronas involucradas en el circuito relacionado con el comportamiento bajo estudio.

Tal vez el aspecto más distintivo del sistema nervioso es el código que utiliza para transmitir la información (Adrian 1957, citado en Albright et al., 2000). Este

código está basado fundamentalmente en la capacidad de las neuronas individuales para transmitir señales eléctricas rápidas, del orden de unos pocos milisegundos (Kandel et al., 2000; Hodgkin, 1937). Justamente por su rapidez, al presente, el estudio de estas señales puede realizarse únicamente con técnicas electrofisiológicas. Sin embargo, con excepción de los potenciales de campo, las técnicas electrofisiológicas sólo permiten evaluar simultáneamente la actividad de una o unas pocas neuronas de los millones de neuronas que conforman e interactúan en el sistema nervioso (ej. Nicolelis y Ribeiro, 2002). En este sentido, las técnicas de *imaging* óptico permiten abarcar un volumen que incluye desde decenas a miles de neuronas, sin embargo, su resolución temporal o espacial es aún limitada (ej. Holtmaat et al., 2005).

Dado el tamaño de las neuronas y las características técnicas de los registros electrofisiológicos, la mayoría de los estudios se llevan a cabo en preparaciones muy reducidas (sistemas disecados). En el mejor de los casos, en estas preparaciones no sólo se interrumpe el “diálogo” entre las diferentes regiones cerebrales, sino que se afecta inevitablemente la actividad de la parte del sistema que se pretende estudiar.

De los párrafos anteriores se desprende que para entender la neurobiología del comportamiento es necesario poder evaluar la actividad de neuronas individuales, pero que estos estudios presentan limitaciones importantes.

Los estudios holistas señalan que no se puede comprender el fenómeno “mental” perceptivo y cognitivo sin atender a que el cerebro reconstruye el mundo en una representación interna como un todo consistente. Esto pone de manifiesto la necesidad de utilizar animales intactos que conserven la integridad de su sistema nervioso a los fines de comprender las bases fisiológicas del comportamiento. Tales estudios pueden realizarse con técnicas no invasivas, como por ejemplo cuando se estudia la actividad del sistema nervioso en animales intactos por medio de técnicas de resonancia magnética funcional. Sin embargo, estas técnicas no permiten resolver aún lo que sucede en neuronas individuales, ni siquiera en un grupo reducido de neuronas, en los tiempos normales de codificación (milisegundos). En efecto, estas técnicas sólo alcanzan una resolución espacial de aproximadamente 1 mm^3 y una resolución temporal cercana a un segundo. Estas escalas pueden ser relevantes en cuanto a la activación lenta de diferentes regiones cerebrales pero no así a nivel de microcircuitos neuronales (en 1 mm^3 puede haber varios cientos de miles de células nerviosas transmitiendo información simultáneamente a una tasa del orden del milisegundo).

En definitiva, mientras que con algunas técnicas podemos estudiar el sistema completo, pero con una resolución pobre y alejada del código natural de transferencia de información del sistema nervioso, con otras no podemos observar más que una pequeña parte del sistema, que sabemos conformado por enormes redes neuronales. Así, resulta técnicamente difícil observar al mismo tiempo la extensión, la complejidad y el detalle inherente a la actividad del sistema nervioso y más aún en un animal intacto.

La diferencia de enfoques, desde el extremo holista al reduccionista, se manifiesta en la elección y uso de los modelos experimentales con que se estudian los procesos mentales y el comportamiento. Los modelos, a la vez que permiten un determinado abordaje experimental, limitan los resultados que se pueden obtener. Por ello, uno de los desafíos de la neurobiología sigue siendo la búsqueda de modelos experimentales y el desarrollo de técnicas que permitan estudiar el funcionamiento de los componentes individuales de los sistemas (las neuronas) en su medio natural, es decir, en el animal intacto en estado alerta (Nicholls y Newsome, 1999).

1.2 Los invertebrados como modelos experimentales en neurobiología

Una de las claves del desarrollo de la biología del último siglo radica en la utilización de modelos experimentales adecuados para estudiar los sistemas biológicos. Muchos de los descubrimientos originales y fundamentales de la neurobiología del siglo XX se realizaron utilizando invertebrados como modelos experimentales. Las investigaciones en invertebrados sirvieron para descubrir principios generales del funcionamiento del sistema nervioso. Sin pretender una descripción exhaustiva ni detallada, a continuación consideraremos tan sólo algunas contribuciones representativas.

Los trabajos histológicos de Ramón y Cajal (1906, 1995) en artrópodos dieron sustento a la universalidad de la doctrina neuronal. Esta doctrina, considerada por muchos investigadores como el comienzo de la neurobiología moderna, establece que la neurona constituye la unidad funcional del sistema nervioso y que éstas se conectan entre sí de manera precisa conformando redes neuronales organizadas.

El potencial de reposo de membrana y el potencial de acción, que permite a una neurona transmitir el impulso eléctrico sin pérdida de la señal a lo largo del axón, fueron comprendidos recién a comienzos de los años '50. Para ello Hodgkin, Huxley y Katz se valieron del axón gigante del calamar para cuantificar las corrientes iónicas que ocurren a nivel de la membrana celular (Young, 1936; Hodgkin y Huxley, 1952ab y c; Hodgkin et al., 1952).

Los trabajos pioneros de Hartline sobre el sistema visual examinaron la relación entre las propiedades de los estímulos sensoriales entrantes con las respuestas neuronales. El descubrimiento de neuronas individuales del cangrejo cacerola (*Limulus*) que responden a la luz sólo si se las estimula en una región bien definida del campo visual dio lugar a un concepto operativo fundamental de la fisiología sensorial: el de campo receptivo (Hartline y Graham, 1932). Otro descubrimiento fundamental, también en el sistema visual de *Limulus*, fue que la respuesta neuronal frente a un punto de luz depende de la intensidad de luz sobre puntos vecinos. Así, se demostró la ocurrencia de interacciones fisiológicas laterales entre neuronas, en este caso inhibición lateral (Hartline, 1949 y Hartline et al., 1956).

Ramón y Cajal introdujo el principio de especificidad de las conexiones neuronales, es decir, el concepto de que las neuronas se conectan entre sí de manera selectiva y no azarosamente. A partir de este principio de especificidad se planteó inmediatamente un interrogante fundamental: cómo se reconcilia el hecho de que el sistema nervioso esté específica y precisamente cableado -la visión de un sistema nervioso en principio inalterable- con la capacidad de los animales para aprender y memorizar. Los resultados obtenidos en el caracol marino *Aplysia* muestran que ocurren cambios en la fuerza de la conectividad sináptica de las neuronas involucradas en el aprendizaje. Las modificaciones estructurales y funcionales de las conexiones sinápticas constituyen, en gran medida, lo que hoy entendemos como las bases celulares del aprendizaje y la memoria (Kandel y Spencer, 1968; Castellucci et al., 1970; Carew et al., 1983; Squire y Kandel, 1999).

1.2.1 Los artrópodos como modelos de aprendizaje y memoria

Los artrópodos fueron considerados tradicionalmente animales simples, autómatas cuyos comportamientos se basan en rutinas sensomotoras reflejas. Sin embargo, hoy en día se sabe que estos animales hacen uso de importantes habilidades cognitivas para ejecutar un rico repertorio de comportamientos de modo de adaptarse y desenvolverse en su complejo y cambiante medio natural (Menzel y Giurfa, 1997; 2001).

A partir de experiencias controladas en el campo y en distintos tipos de arenas experimentales se descubrió que muchos artrópodos se valen de distintas estrategias visuales para dirigirse a un lugar definido, como puede ser una fuente de alimento o un refugio (Hemmi y Zeil, 2003a,b; Srinivasan, 2001). Para ello identifican claves y objetos del terreno asociados a su destino que, aun observándolos desde nuevos puntos de vista, reconocen a partir de la referencia que de estas claves guardan en su memoria (Collet y Collet, 2002). Además, deben tomar decisiones a partir de la evaluación de las distintas circunstancias de la travesía, para lo cual se valen de un conjunto de aprendizajes y memorias adquiridas que les permiten adaptarse a su medio ambiente (Ronacher y Wehner, 1995; Zeil, 1996).

El ejemplo anterior señala que es un error considerar a los artrópodos como máquinas reflejas y que, por el contrario, su comportamiento debe ser entendido como la consecuencia de procesos cognitivos complejos (Wehner et al., 1996; Menzel y Giurfa, 1999; Giurfa, 2003).

Si bien muchos artrópodos, en general insectos, fueron utilizados como modelos para el estudio del aprendizaje y la memoria en condiciones controladas de laboratorio, por el grado de conocimiento alcanzado consideraremos tan sólo dos de estos modelos: la mosca y la abeja.

La abeja *Apis mellifera* constituye un modelo experimental tradicional para estudiar el aprendizaje y la memoria a un nivel comportamental. Los primeros estudios abordaron aprendizajes elementales no asociativos y asociativos (Menzel y Muller, 1996; von Frisch, 1967). Algunos de estos aprendizajes consistían en el condicionamiento del reflejo de extensión de la proboscis y en condicionamientos visuales operativos de reconocimiento de patrones visuales (Bitterman et al., 1983; Srinivasan, 1994). En estas tareas las abejas desarrollan aprendizajes asociativos que involucran como clave al contexto de entrenamiento, conservando la capacidad de generalizarlo a contextos similares (Gerber y Menzel, 2000). Investigaciones posteriores revelaron que estos animales son capaces de llevar a cabo procesos cognitivos que se pensaba sólo ocurrían en algunos vertebrados. Las abejas pueden transferir reglas aprendidas con una modalidad sensorial a otra (Zhang et al., 1995; Giurfa et al., 2001). Son capaces de categorizar información visual referida a la orientación y a la simetría de un patrón visual (Giurfa et al., 1996; Stach et al., 2004). Asimismo, son capaces de aprender el concepto de igual/diferente (en tareas conocidas como *delayed matching-to-sample*) concepto que también pueden extrapolar de una modalidad sensorial a otra (Giurfa et al., 2001). En general estas investigaciones indican que las abejas pueden no sólo aprender sobre estímulos específicos y sus características físicas, sino que también pueden realizar procesos

cognitivos complejos, como categorizar y construir representaciones abstractas que relacionan a los objetos. La abeja como modelo experimental ha permitido conocer en mayor profundidad las posibilidades cognitivas de los artrópodos. Sin embargo, la abeja es un mal modelo para realizar estudios electrofisiológicos. Si bien en los últimos años se realizaron importantes progresos con técnicas de imaging óptico de calcio para estudiar la fisiología de su sistema nervioso, el conocimiento alcanzado en este ámbito es aún muy limitado (Sachse y Galizia, 2003).

El modelo experimental de aprendizaje y memoria en moscas *Drosophila* se encuentra mucho menos desarrollado en cuanto a la investigación de capacidades cognitivas. Los aprendizajes sobre los que se basa este modelo son, como en abejas, condicionamientos de tipo olfatorio y visual (Tully, 1984; Heisenberg et al., 2001). El conocimiento general del que se dispone sobre la genética de este animal y la relativa facilidad para utilizar animales transgénicos controlados espacial y temporalmente hacen de *Drosophila* un modelo experimental atractivo para estudiar algunos aspectos de la fisiología del aprendizaje (Menzel y Giurfa, 2001; Liu et al., 1999; Dubnau et al., 2003). No obstante cabe notar que las memorias visuales que se estudian son de muy corto término, tan sólo de un par de minutos (Zars et al., 2000 y Tang et al., 2004). Por otra parte, *Drosophila* resulta un modelo absolutamente inadecuado para el estudio del funcionamiento de las neuronas con técnicas electrofisiológicas.

A pesar de las ventajas que se suele proclamar respecto del uso de estos modelos en invertebrados, los estudios sobre las bases neurofisiológicas de aprendizajes visuales son, cuanto menos, escasos. La limitación de estos modelos para un abordaje fisiológico se manifiesta en que ni siquiera se conocen las regiones del cerebro involucradas en dichos aprendizajes.

1.3 *Chasmagnathus* como modelo de aprendizaje y memoria

Chasmagnathus granulatus es un cangrejo semiterrestre de la familia Grapsidae, que pasa largos períodos de tiempo fuera del agua (figura 1). Durante al menos alguna etapa de su vida, entre sus predadores más importantes se encuentran las gaviotas y otras aves costeras, quienes lo capturan empleando una variedad de estrategias de aproximación diferentes. En consecuencia, un objeto que se aproxima o mueve por encima del animal provoca en éste una reacción de escape. Si bien la respuesta de escape es la reacción más común, en algunas circunstancias una respuesta defensiva con sus quelas o bien un comportamiento de inmovilidad o congelamiento pueden también ser empleados como estrategias defensivas.

La respuesta de escape del cangrejo frente a un estímulo visual de peligro (EVP) es fácilmente evocable y cuantificable de manera muy confiable en el laboratorio. Esto, junto a otras ventajas experimentales que ofrece *Chasmagnathus*, algunas de las cuales serán descritas a lo largo de esta tesis, fueron las razones que hacia 1984 alentaron al Dr. Maldonado a iniciar un programa de investigación sobre las bases fisiológicas del comportamiento utilizando como modelo experimental este cangrejo. Veinte años más tarde, el paradigma de *Chasmagnathus* para estudios de aprendizaje y memoria constituye un modelo de investigación reconocido internacionalmente (Maldonado, 2002).

El EVP que se utiliza en este paradigma consiste en el desplazamiento de una pantalla por encima del animal, el que no lleva aparejadas consecuencias inmediatas para el cangrejo. Frente a este estímulo *Chasmagnathus* despliega una característica respuesta de escape. Esta respuesta decae luego de pocas presentaciones del EVP. La reducción de la respuesta durante la presentación repetida del EVP no puede ser explicada en términos de fatiga motora o adaptación sensorial (Lozada et al., 1990). De hecho, la reducción de la respuesta frente al EVP es el resultado de un proceso mnésico que persiste por al menos 5 días luego de concluido el entrenamiento (Maldonado et al., 1997).

Inicialmente este proceso mnésico fue considerado un ejemplo más de habituación de largo término y así se lo denominó (Romano et al., 1990; Tomsic y Maldonado, 1990). Sin embargo, resultados posteriores demostraron que se trata de un aprendizaje asociativo determinado por la asociación del EVP (señal) con el contexto de entrenamiento (Tomsic et al., 1998). A la memoria adquirida se la denominó memoria contexto-señal (MCS). Esta memoria se adquiere siempre que se aplique un entrenamiento espaciado, el que consiste en 15 o más ensayos con un intervalo entre ensayos mayor a 30 segundos (Pedreira et al., 1998). La consolidación de la memoria es dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas y ARN (Pedreira et al., 1996; Hermitte et al., 1999). Cabe señalar que si el intervalo entre ensayos es menor a 9 segundos, lo que se conoce como entrenamiento masivo, se produce una pronunciada reducción de la respuesta de escape que no da lugar a retención de largo término (pero ver Pedreira et al., 1998).

La capacidad de adquisición de la MCS en *Chasmagnathus* es sensiblemente superior a la de otras especies de cangrejos filogenéticamente emparentadas pero que difieren en las características de su hábitat. Este fenómeno evidencia una

adaptación de las capacidades cognitivas de *Chasmagnathus* frente a las presiones ecológicas que le toca enfrentar en su entorno natural (Tomsic et al., 1993).

En términos generales la MCS es de adquisición rápida y robusta. La evocación de memoria es específica del tipo de estímulo visual utilizado, del intervalo entre estímulos y de la fase circadiana en la que ésta fue adquirida (Romano et al., 1990; Pedreira et al., 1998; Pereyra et al., 1996). A nivel comportamental se observa que el entrenamiento con el EVP provoca el reemplazo de la respuesta de escape por otra respuesta defensiva de inmovilidad, el congelamiento (Pereyra et al., 2000).

La MCS fue y es estudiada incluyendo al enfoque comportamental un abordaje farmacológico, celular y molecular (ej. Locatelli et al. 2002; Frenkel et al., 2002; Merlo et al., 2002; Freudenthal et al., 1998; revisado en Maldonado, 2002). No obstante, las regiones del sistema nervioso y el tipo de neuronas involucradas en la MCS de *Chasmagnathus* eran absolutamente desconocidas.

1.4 Anatomía del sistema nervioso central de los decápodos

En artrópodos el sistema nervioso se clasifica tradicionalmente según su origen embriológico en: protocerebro, deutocerebro y tritocerebro (figura 2). Estas estructuras embrionarias son las que originan el sistema nervioso del animal adulto (Nassel y Elofsson, 1987). En los crustáceos decápodos el protocerebro se divide en protocerebro lateral y medial, el primero da lugar a parte del lóbulo óptico y el segundo a parte del ganglio supraesofágico; el deutocerebro y parte del tritocerebro dan origen al resto del ganglio supraesofágico; el ganglio torácico, en cambio, se origina totalmente a partir del tritocerebro (Harzsch et al., 1999b).

En un decápodo adulto encontramos, entonces, tres centros nerviosos principales: los lóbulos ópticos, el ganglio supraesofágico y el ganglio torácico. Cada lóbulo óptico se encuentra conectado con el ganglio supraesofágico por el tracto protocerebral. Estos dos centros nerviosos cumplen, como describiremos más adelante, funciones fundamentalmente de percepción sensorial y cognitivas, mientras que el ganglio torácico cumple principalmente funciones vegetativas y motoras (Sandeman et al., 1993).

Cada uno de los centros nerviosos está compuesto por un conjunto de núcleos o neuropilos que se conectan entre sí a través de tractos. En cada neuropilo los cuerpos neuronales se encuentran agrupados en la periferia del mismo (figura 3). Los neuropilos pueden tener una estructura geoméricamente ordenada o no (Sandeman, 1982). Se reconocen dos tipos de neuropilos geoméricamente ordenados: esféricos y columnares. En los neuropilos esféricos las neuritas proyectan radialmente hacia el centro del neuropilo. En los columnares en cambio las neuritas se disponen ordenadas fundamentalmente en arreglos columnares, aunque abundan también neuronas con procesos horizontales o tangenciales. Los procesos tangenciales, dendritas y terminales axónicas, participan en la integración y/o modulación horizontal de la información columnar. Estos procesos se ubican en estratos específicos dando lugar así a una estructura laminar bien definida. Las láminas o estratos están formados por dos tipos distintos de procesos: I) procesos que corresponden a las dendritas o terminales de neuronas columnares, los que por lo general se extienden a través de un número relativamente pequeño de columnas; y II) procesos que corresponden a neuronas colectoras, los que se extienden a través de prácticamente todo el mosaico columnar del neuropilo.

Las funciones primarias de algunos de estos neuropilos pueden deducirse a partir de que sus aferencias y eferencias, desde y hacia los órganos sensoriales o motores, son fácilmente reconocibles. Sin embargo, las funciones de los neuropilos no se restringen únicamente a lo que su nombre refiere (ej. neuropilo lateral de la antena I), ya que en realidad estos son núcleos altamente complejos y presentan diversas conexiones con distintas áreas del sistema nervioso, centros motores y órganos sensoriales (Sandeman et al., 1992).

En esta tesis, para referirnos a las distintas estructuras del sistema nervioso del cangrejo, utilizamos la nomenclatura propuesta por Sandeman (Sandeman et al., 1992). Para el caso particular de los neuropilos del lóbulo óptico adoptamos la denominación que se utiliza tradicionalmente en insectos. Strausfeld y Nassel (1980) propusieron originalmente unificar esta nomenclatura en base a la homología

de estos neuropilos de crustáceos e insectos (Strausfeld, 1998; Harzsch, 2002; Sinakevitch et al., 2003).

1.4.1 El lóbulo óptico

A diferencia de los insectos, los crustáceos decápodos tienen sus ojos ubicados en los extremos de pedúnculos móviles. En la cúpula de los dos pedúnculos oculares se encuentran las estructuras ópticas y la retina (figura 4, panel superior). Por debajo de la retina se ubican los distintos neuropilos que conforman el lóbulo óptico (figura 4, panel inferior). Cada lóbulo óptico está compuesto por tres neuropilos ópticos y por una serie de neuropilos protocerebrales (incluido el cuerpo hemielipsoide) tradicionalmente reunidos bajo el nombre de médula terminal o, más apropiadamente, protocerebro lateral.

Los tres neuropilos ópticos son: la lámina, la médula y la lóbula; los que han sido relacionados únicamente con el procesamiento de la información visual (Sandeman, 1993). La arquitectura neuronal de estos neuropilos está definida por elementos columnares interceptados por elementos tangenciales agrupados en estratos horizontales (figura 5). Los neuropilos tienen una organización retinotópica columnar por lo que puntos vecinos del campo visual se encuentran representados a nivel neuronal en elementos columnares vecinos (Strausfeld y Nassel, 1980). A este nivel, entonces, las columnas constituyen unidades funcionales de procesamiento de la información visual (Egelhaaf y Kern, 2002).

La lámina constituye el primer neuropilo óptico en que se procesa la información visual. Se ubica por debajo de la retina de cuyos receptores recibe directamente la información sensorial. Los cuerpos celulares de sus interneuronas se ubican en su mayoría por encima y en la periferia del neuropilo. Las proyecciones de cada omatidia conservan en la lámina un ordenamiento retinotópico, originando la característica estructura columnar o en empalizada. Por otra parte, la lámina presenta dos estratos bien definidos separados por una capa plexiforme. Es en esta última donde se encuentran las terminales de las células retinulares. Los estratos horizontales, proximal y distal, están conformados por procesos tangenciales (corren de modo paralelo a la superficie de la lámina) e integran la información proveniente de columnas vecinas. En la capa plexiforme se encuentran las dendritas de neuronas columnares de proyección que envían información retinotópica a través del quiasma externo hacia la médula. El quiasma externo produce una inversión en el eje antero posterior de las proyecciones de la lámina hacia la médula (Nassel 1975, 1977; Nassel y Elofsson, 1987).

La médula se ubica por debajo de la lámina y tiene en decápodos forma de domo elongado. Los cuerpos celulares se ubican por encima y a los lados del neuropilo. La médula recibe información de la retina y de la lámina. En la médula del crustáceo en el que se han realizado la mayor parte de los estudios histológicos, el crayfish *Procambarus clarkii*, se reconocieron siete estratos horizontales (tangenciales). Las neuronas cuyos procesos dendríticos se extienden horizontalmente integran la actividad de las neuronas columnares. Estas neuronas tangenciales pueden ser locales de la médula; proyectar centrífugamente hacia la

lámina; o bien centripetamente hacia regiones más centrales como la lóbula, el protocerebro lateral o el ganglio supraesofágico (Strausfeld y Nassel, 1980; Glantz y McIsaac, 1998). Las distintas neuronas columnares identificadas en crayfish arborizan en uno o más de los siete estratos tangenciales. Estas pueden ser locales de la médula o bien proyectar a la lóbula (Sandeman, 1982). Las neuronas columnares que proyectan de la médula a la lóbula lo hacen a través del quiasma interno. Este segundo quiasma revierte la inversión ocurrida en el primero (Harzsch, 2002).

La lóbula se encuentra anidada debajo de la médula y como ésta tiene forma de domo elongado. Los cuerpos celulares de las neuronas de la lóbula se ubican por debajo de este neuropilo. La lóbula recibe información retinotópica de neuronas de la médula. En la lóbula de crayfish se reconocen al menos siete estratos tangenciales (Strausfeld y Nassel, 1980). Algunos de estos estratos en cangrejos están formados por procesos tangenciales correspondientes a dos tipos de neuronas. Por un lado, las neuronas tangenciales gigantes cuyas dendritas se extienden sobre la casi totalidad del mosaico columnar. Por otro lado, las neuronas columnares que envían procesos horizontales que se extienden sobre un número relativamente pequeño de columnas (Sztarker et al., 2005).

El protocerebro lateral se ubica por debajo de la lóbula y su denominación refiere al origen embrionario común de los neuropilos que lo componen (Sandeman et al., 1992). En esta estructura nerviosa los cuerpos neuronales se ubican en distintos agrupamientos de somas en la periferia de los neuropilos. Si bien en algunos miembros de la clase Malacostraca el cuerpo hemielipsoide es un neuropilo glomerular, en Decapoda ni el cuerpo hemielipsoide ni el resto de los neuropilos del protocerebro lateral presentan una estructura geoméricamente ordenada (Sandeman et al., 1993; Harzsch et al., 1999a). Estos neuropilos están involucrados en el procesamiento e integración de información de distintas modalidades sensoriales (Sandeman, 1992). Se reportó que a este nivel llega información de origen visual, olfatorio, táctil y postural (Bullock y Horridge, 1965; Yoshino et al., 1983; Blaustein et al., 1988). En decápodos, el cuerpo hemielipsoide sería una estructura análoga a los cuerpos pedunculados en insectos, un área de procesamiento e integración sensorial (Gupta, 1987; Strausfeld et al., 1995). Por otra parte, el protocerebro lateral contiene células neurosecretoras tanto del órgano-X como de la glándula del seno. Esta glándula es un órgano neurohemal asociado al órgano-X, junto con el cual conforman el principal sistema neuroendócrino de estos animales (Kirk et al., 1983; Fingerman, 1987).

1.4.2 El ganglio supraesofágico

El ganglio supraesofágico constituiría el principal centro nervioso de procesamiento de información sensorial e integración de funciones cognitivas. Se ubica ventralmente en la región anterior del cefalotórax del animal. El neuropilo protocerebral anterior, el neuropilo posterior, el puente protocerebral y el cuerpo central (figura 3) carecen de aferencias primarias de órganos sensoriales. Tampoco se observó que estuvieran directamente involucrados con funciones motoras del

animal (Sandeman, 1982). De acuerdo a su configuración, se postuló que cumplirían funciones asociativas y de procesamiento superior de la información (Sandeman, 1982; Utting et al., 2000).

En cuanto al procesamiento de información sensorial algunos de los neuropilos mejor descritos son: el lóbulo olfatorio que recibe aferencias directas de los quimiorreceptores de la antena I (Sandeman y Denburg, 1976; Sandeman et al., 1993); el neuropilo lateral de la antena I que recibe aferencias primarias mecanosensoriales, propioceptivas y olfatorias (Yoshino et al., 1983; Roye, 1986; Mellon y Murger, 1990) y el lóbulo accesorio que recibe aferencias del lóbulo olfatorio y aferencias del sistema visual (Sandeman y Sandeman 2000; Sullivan y Beltz, 2001).

El ganglio torácico se ubica ventralmente sobre la región medial del cefalotórax. Este ganglio posee glándulas neuroendocrinas y neuropilos que constituyen centros de regulación visceral y centros motores del animal (Sandeman, 1982).

1.4.3 El sistema sanguíneo intraganglionar

Los crustáceos, a diferencia de los insectos, tienen un sistema circulatorio muy desarrollado. Poseen arterias que, saliendo del corazón, llevan la hemolinfa directamente al sistema nervioso central. Una red de sistemas capilares irriga el cerebro. Estos capilares se abren descargando la hemolinfa en sinuosidades hemocélicas. Los vasos y capilares están distribuidos de manera que ninguna región del sistema nervioso se encuentre a más de 20-25 μm de los capilares sanguíneos y los cuerpos neuronales a no más 200 μm de los vasos (Sandeman, 1967; Sandeman, 1982). También a diferencia de lo que sucede en insectos, el intercambio gaseoso en crustáceos ocurre en las branquias. La hemocianina, presente en la hemolinfa, transporta el oxígeno desde las branquias a los tejidos del animal (Eckert et al., 1990).

1.5 Fisiología de la visión en decápodos

A raíz de que los principios fisiológicos y computacionales involucrados en la visión serían similares en invertebrados y vertebrados, la fisiología comparada del procesamiento visual cobró especial interés en los últimos años (Weckstrom y Laughlin, 1995; Nilsson, 2004). Sin embargo, la investigación en este campo se limita casi exclusivamente a insectos y vertebrados. A pesar de que los crustáceos decápodos son animales altamente visuales, su sistema visual ha sido poco estudiado (revisado en Glantz y Clyde, 2002).

La visión en crustáceos adultos se realiza fundamentalmente a través de los ojos compuestos (revisado en Richter, 2002). Los ojos compuestos presentan un número y densidad de omatidios altamente variable. En muchas especies de decápodos, como en el caso de *Chasmagnathus*, estos ojos están formados por varios miles de omatidios (Nilsson, 1996). El menor ángulo interomatidial es de aproximadamente dos grados (Richter, 2002). La disposición que adoptan los omatidios en la cúpula del pedúnculo ocular permite a los crustáceos decápodos la visión de todo el campo visual dorsal y de trescientos sesenta grados alrededor del animal (Zeil et al., 1986 y 1989).

1.5.1 La retina

La retina de la mayoría de las especies estudiadas contiene ocho fotorreceptores por omatidia. Los fotorreceptores responden con depolarizaciones graduales frente a incrementos en la intensidad de luz. Siete de estas células fotorreceptoras tienen un espectro de absorción con un pico en 550 nm mientras que la restante tiene el pico en 450 nm. En los ojos compuestos de aposición los axones de los fotorreceptores (R1-R7) provenientes de una misma omatidia proyectan retinotópicamente sobre la misma columna de la lámina. El axón del fotorreceptor R8, en cambio, proyecta retinotópicamente a través de la columna correspondiente y del quiasma externo sobre la médula. A pesar de que los crustáceos disponen de células fotorreceptoras con al menos dos picos de absorción (condición casi necesaria para la visión de color), pudiendo llegar a veinte en el caso de los estomatópodos, no existen evidencias neurofisiológicas ni comportamentales que permitan determinar aún si estos animales discriminan o no el color (revisado en Cronin y Tahahiko, 2002).

En crustáceos, estudios neuroanatómicos (Nassel y Waterman, 1977), neurofisiológicos (Glantz, 1996) y comportamentales (Waterman, 1980; Ugolini et al., 2002) indican que estos animales son capaces de extraer información sobre el vector de polarización de la luz. Estudios neurofisiológicos en crayfish sugieren que la información sobre el vector de polarización de la luz podría ser utilizada incluso para detectar formas y movimiento en circunstancias en que la intensidad del contraste es mínima o nula (Glantz, 2001).

1.5.2 Interneuronas visuales

A diferencia de lo que ocurre con la retina, la investigación de interneuronas visuales en crustáceos estuvo restringida a los decápodos. Estas investigaciones reconocen dos etapas. En la primer etapa, desde 1960 a mediados de la década del '70, Wiersma y colaboradores caracterizaron, con registros extracelulares de unidades únicas en el tracto protocerebral de crayfish, langostas y cangrejos, la respuesta de distintos tipos de interneuronas visuales. En esta etapa la caracterización de la respuesta neuronal se basó exclusivamente en la frecuencia de disparo de potenciales de acción (PA) de interneuronas visuales. Wiersma y colaboradores estudiaron principalmente interneuronas con respuestas tónicas frente a un pulso de luz (PL) y otras que respondían con especificidad frente estímulos visuales en movimiento (revisado en Wiersma et al., 1982).

La segunda etapa del estudio de interneuronas visuales comienza a mediados de los '70 a partir de la implementación por parte de Glantz de registros intracelulares en crayfish. Para lograr estos registros en crayfish es necesario reemplazar la hemolinfa del animal por solución salina oxigenada y mantener la preparación sumergida en un baño con la misma solución. A diferencia de los registros extracelulares, que sólo dan cuenta de la tasa de disparo de PA, la utilización de registros intracelulares permitió, además, caracterizar neuronas con respuestas únicamente pasivas y establecer la ubicación y morfología de distintos tipos neuronales. Esta metodología permitió también estudiar propiedades pasivas y activas de la membrana y la relación entre eventos sinápticos y la tasa de disparo de PA entre otras variables de la fisiología neuronal (revisado en Glantz, 2002).

Los trabajos sobre fotorreceptores, neuronas de la lámina y de la médula permitieron caracterizar circuitos neuronales de los primeros estadios del procesamiento visual en crayfish. Sin embargo, en sus trabajos con registros intracelulares, Glantz no se ocupó de las neuronas sensibles al movimiento estudiadas anteriormente por Wiersma y por él mismo con registros extracelulares desde el tracto protocerebral.

1.5.3 Interneuronas de la lámina

La lámina es el neuropilo mejor estudiado en los decápodos. Está compuesta por al menos diez tipos neuronales. Describiremos brevemente aquellos mejor caracterizados. Las células monopolares de la lámina (CMLs) constituyen las principales neuronas columnares de este neuropilo (figura 6). Sobre estas neuronas hacen sinapsis los axones de los fotorreceptores (Nassel y Waterman, 1977). En decápodos hay cinco tipos de CMLs por columna, las que configurarían canales independientes de información sobre la intensidad de luz y su vector de polarización (Wang-Bennett y Glantz, 1987a). Por otra parte, en la lámina encontramos otros tres tipos celulares bien caracterizados morfológicamente, las neuronas amácrinas de la lámina, las neuronas T y las neuronas tangenciales (Strausfeld y Nassel, 1980; Wang-Bennett y Glantz, 1987b). A estas últimas, que a su vez comprenden varias subclases, las designaremos de aquí en más neuronas Tan. Las neuronas amácrinas

son neuronas locales de la lámina que inhibirían lateralmente la terminal axónica de los fotorreceptores modulando la sinapsis que establecen con las CMLs (Glantz y Bartels, 1994; Glantz et al., 2000). Las CMLs y neuronas T transmiten información retinotópica de la lámina a la médula. Las neuronas Tan, en cambio, estarían involucradas en transmitir información centrífuga desde la médula hacia la lámina (Glantz y Clyde, 2002).

1.5.4 Interneuronas de la médula

Uno de los elementos columnares de la médula que recibiría información de las CMLs son las células transmedulares. Casi no hay en la bibliografía antecedentes sobre la actividad electrofisiológica de estas interneuronas, la dificultad para estudiarlas radicaría en su delgado calibre. A partir de estudios histológicos en crayfish, sin embargo, se pudo determinar que existen al menos 6 neuronas transmedulares por columna. Algunas de estas proyectan y arborizan en la región proximal de la misma médula mientras que otras proyectan y arborizan también en la lóbula (Strausfeld y Nassel, 1980; Wang-Bennet et al., 1989). Las neuronas transmedulares que arborizan en la médula probablemente inervan a las neuronas amácrinas de la médula y a las células tangenciales grandes de la médula. Las neuronas amácrinas de la médula son interneuronas pasivas locales, responden a un PL con una depolarización gradual e inhibirían lateralmente a células transmedulares (Waldrop y Glantz, 1985). Las neuronas tangenciales grandes colectan la información proveniente de distintas neuronas transmedulares sobre un mosaico extenso de columnas (Kirk, 1982). Así, estas neuronas poseen un campo receptivo amplio.

Entre las grandes neuronas tangenciales de la médula se encuentran la neuronas sustaining y dimming. Las neuronas sustaining son las interneuronas visuales mejor estudiadas en crayfish, fueron originalmente descritas por Wiersma y colaboradores a partir de registros extracelulares como fibras con respuesta tónica excitatoria frente a un PL (Wiersma y Yamaguchi, 1967a y 1967b). Estos investigadores determinaron que existen 14 células sustaining que pueden ser identificadas por su campo receptivo. La respuesta de estas neuronas frente a un PL, caracterizada también posteriormente a partir de registros intracelulares, consiste en una depolarización tónica acompañada por la descarga de potenciales de acción (Kirk et al., 1982a). En su respuesta se reconoce una primera fase compuesta por un pico de depolarización y una segunda fase estacionaria de menor amplitud y frecuencia de PA. La respuesta neuronal persiste por el tiempo que se presenta el estímulo y la finalización del PL da lugar a una marcada hiperpolarización que dura unos pocos segundos (figura 6) (Pfeiffer y Glantz, 1989). La morfología de las neuronas sustaining consiste en un conjunto de dendritas tangenciales paralelas que convergen en una neurita principal, desde la cual se origina el axón que proyecta a través del tracto protocerebral hacia el ganglio supraesofágico (ver el esquema de la figura 18) (Kirk et al., 1982b).

Las neuronas dimming fueron estudiadas primero por Wiersma y luego por Glantz. Wiersma las clasificó como fibras con respuesta tónica inhibitoria frente al

encendido de luz y excitatoria frente a su apagado (Wiersma y Yamaguchi, 1967a). Glantz observó que el registro intracelular de las neuronas dimming frente a un PL es prácticamente inverso al de las neuronas sustaining: se hiperpolarizan frente al PL disminuyendo su tasa de disparo de PA, y una vez que finaliza el pulso muestran una breve depolarización aumentando la tasa de disparo de PA (Pfeiffer y Glantz, 1989). La morfología de las neuronas dimming es, en líneas generales, análoga a la de las neuronas sustaining (Kirk, 1982).

Ambos tipos neuronales presentan cierta sensibilidad por la dirección del movimiento y por el vector de polarización de la luz (Glantz et al., 1995, Glantz y McIsaac, 1998). Glantz (2001) propone que las neuronas sustaining y dimming funcionarían como dos canales oponentes que transmiten información sobre el contraste y el vector de polarización hacia el ganglio supraesofágico. En este ganglio ambos tipos neuronales hacen sinapsis con neuronas motoras del pedúnculo ocular (Wood y Glantz, 1980 a y b), con lo que se completaría el circuito neuronal que media uno de los reflejos optomotores. En estos trabajos se propone que ambos canales podrían estar involucrados en otros comportamientos dirigidos visualmente dado que las neuronas sustaining y dimming hacen sinapsis con células de otros centros motores involucrados en la locomoción.

En líneas generales esto es lo que se conoce acerca de interneuronas visuales identificadas tanto fisiológica como morfológicamente en crustáceos. Como se puede advertir el conocimiento alcanzado se limita tan sólo a algunos pocos tipos neuronales de los primeros dos neuropilos ópticos en una única especie, el crayfish. Se cuenta, sin embargo, con bastante información obtenida a través de registros extracelulares de neuronas no identificadas morfológicamente.

1.5.5 Fibras sensibles al movimiento

Las neuronas sensibles al movimiento fueron reconocidas desde los primeros registros de unidad única como un grupo distintivo de células (Waterman et al., 1964). Los trabajos de Wiersma con registros extracelulares a nivel del tracto protocerebral permitieron caracterizar distintos tipos de fibras sensibles al movimiento (FSM) de crayfish, langostas y cangrejos (Waterman y Wiersma, 1963; Wiersma, 1966; York y Wiersma, 1975). Las FSM, están especializadas en responder a un borde con contraste que se desplaza por el campo visual del animal. Por otra parte, las FSM presentan poca o ninguna respuesta frente a cambios estacionarios en la intensidad lumínica como los producidos por un PL. Una característica común que muestran las FSM descriptas en crustáceos es una reducción de su respuesta frente a la presentación reiterada de un estímulo en movimiento. Los distintos parámetros del movimiento que evocan la excitabilidad neuronal junto al tiempo de adaptación de la respuesta frente al estímulo visual constituyen las principales características que permitieron establecer seis grupos de FSM (Wiersma et al., 1982).

1.5.5.1 Clasificación de las fibras sensibles al movimiento

Jittery movement fibers. Este tipo de fibra fue la más estudiada de las FSM. Su respuesta es máxima frente a movimientos no lineales, movimientos que presenten cambios de dirección o bien cambios de aceleración. Estas fibras tienen campos receptivos bien definidos, responden a un amplio rango de velocidades y se adaptan rápidamente mientras los movimientos sean lineales y su velocidad constante. Por otra parte, la estimulación repetida en el mismo lugar del campo receptivo da lugar a una rápida reducción de la respuesta. Esta reducción desaparece si no se repite la estimulación por al menos 1 minuto o bien si se presenta el estímulo visual desplazado respecto de la posición original (Wiersma y Yamaguchi, 1967a,b; Wiersma et al., 1977; Aréchiga y Yanagisawa, 1973).

Slow movement fibers. Estas fibras responden con una descarga sostenida de PA por el tiempo que el objeto en movimiento se desplaza por el campo receptivo de las fibras sin que se produzca adaptación durante esta fase. Sin embargo, inmediatamente después de una presentación del estímulo en movimiento el campo visual estimulado permanece refractario por un largo período de tiempo (Labhart y Wiersma, 1975).

Medium movement fibers. Responden principalmente a la aproximación de una figura y en menor medida al movimiento en dirección tangencial (paralela a la superficie del ojo). Los campos receptivos de las distintas *Medium fibers* tienen bordes poco definidos y tanto la adaptación de la respuesta durante la estimulación, como la reducción de la respuesta por la presentación repetida del estímulo son más suaves que para las *jittery movement fibers* (Wiersma y Yamaguchi, 1967b; Fraser, 1974). Por otra parte, estas fibras presentan una respuesta fásica al inicio y fin de un PL.

Fast movement fibers. Estas fibras responden al acercamiento o retroceso de objetos oscuros y muestran una rápida adaptación mientras se presenta el estímulo visual. Una vez estimuladas debe esperarse un tiempo prolongado antes de poder excitarlas nuevamente (Wiersma et al., 1982).

Las fibras descritas anteriormente comparten la característica de incluir al menos una fibra con su campo receptivo exclusivamente por encima del horizonte visual. Otro tipo de fibras, las *space constant fibers*, tienen la particularidad de que pueden ser excitadas únicamente cuando, con independencia de la posición del animal, se estimula el campo visual superior al horizonte gravitacional. De modo que cuando el animal se encuentra en su posición normal las omatidias más dorsales funcionan como entrada del sistema, mientras que si se da vuelta al animal, ahora, la entrada del sistema son las omatidias más ventrales. Los estatocistos y los propioceptores de las articulaciones de las patas proveen información a este sistema y la remoción de los primeros resulta en la pérdida de constancia del campo receptivo (revisado en Wiersma et al., 1977; Fraser, 1974).

Unidirectional movement fibers. Estas fibras fueron encontradas con muy baja frecuencia. Su característica distintiva es que responden a una dirección preferida del movimiento (Glantz, 1973).

1.5.5.2 Subclasificación de las fibras sensibles al movimiento

Las fibras que constituyen cada uno de los grupos de FSM pueden, a su vez, ser clasificadas en función del tamaño y la orientación de su campo receptivo. En este sentido las fibras mejor estudiadas fueron las *jittery movement fibers*. Los campos receptivos que permiten subclasificar a las *jittery movement fibers* se repiten en crayfish, langostas y cangrejos. En cangrejos, sin embargo, se encuentran fibras adicionales con campos receptivos cuya forma no tiene equivalente en los otros crustáceos estudiados. La mayor diversidad en las formas que adoptan los campos receptivos de estas FSM en cangrejos estaría relacionada con que estos animales son mucho más visuales que los otros decápodos estudiados (revisado en Wiersma et al., 1982).

A pesar de que se cuenta con bastante información acerca de la fisiología de las FSM, su estudio se realizó utilizando únicamente registros extracelulares en el tracto protocerebral. Por lo tanto la ubicación y morfología de las FSM se desconoce completamente.

1.6 Las fibras sensibles al movimiento en un comportamiento defensivo de crayfish

Una serie de trabajos realizados por Glantz (revisados en Glantz 1977) revelan que las FSM estarían involucradas en el reflejo defensivo de crayfish de despliegue lateral de las quelas frente a la aproximación de un objeto amenazante (Wiersma, 1961). La presentación reiterada de un estímulo visual de estas características provoca una habituación de corto término de la respuesta comportamental, la que se recupera después de unos minutos sin estimulación (Glantz, 1974a). Este aprendizaje cumple con las características de una habituación, en la que no median componentes asociativos (Thompson y Spencer, 1966).

A partir de resultados obtenidos con registros electrofisiológicos extracelulares en el tracto protocerebral de crayfish, Glantz propone que las FSM, en particular las *jittery movement fibers*, disparan este reflejo defensivo (Glantz, 1974c). Esta hipótesis se funda en un conjunto de resultados entre los que se destaca la relación entre la latencia de respuesta comportamental y la tasa de disparo de estas fibras para distintas velocidades de aproximación del estímulo visual. Complementariamente, Glantz observó que la estimulación visual repetida (10 ensayos con una frecuencia de 1 a 4 Hz) produce una disminución de la respuesta de estas fibras que correlaciona con la tasa de habituación a nivel comportamental; y que tanto la actividad neuronal como la comportamental se recuperan espontáneamente después de cinco minutos sin estimulación (Glantz, 1974b).

1.7 Hipótesis y objetivos

1.7.1 Resumen de los antecedentes

De los antecedentes presentados se desprenden los motivos principales que dieron lugar a este trabajo.

1- Por la complejidad del fenómeno en estudio, la investigación de los mecanismos neurofisiológicos del aprendizaje no puede ser abordada con una única metodología o preparación experimental. Muy por el contrario, es evidente que el progreso en esta área depende de enfoques multidisciplinarios así como del desarrollo de nuevos modelos de estudio. El desarrollo de nuevos modelos no sólo es necesario para satisfacer las necesidades experimentales negadas por otras preparaciones, sino que también permite entender desde una perspectiva evolutiva la universalidad del proceso en estudio.

2- El aprendizaje es un fenómeno complejo que depende en gran medida de la integridad del sistema vivo en el que ocurre. Al mismo tiempo, el aprendizaje tiene lugar como resultado de modificaciones que ocurren en las neuronas individuales. Una limitación de los modelos actuales para su estudio es la imposibilidad de investigar tales modificaciones en neuronas individuales en un animal vivo, entero y no anestesiado, en el mismo momento en que se encuentra aprendiendo.

3- Por su duro esqueleto externo y la accesibilidad a buena parte del cerebro, los cangrejos parecían ofrecer ventajas para registrar intracelularmente la actividad de neuronas cerebrales en el animal intacto.

4- El modelo de aprendizaje y memoria visual en el cangrejo *Chasmagnathus* está bien caracterizado.

5- En un crustáceo, el crayfish, se observó que un grupo de fibras visuales sensibles al movimiento participarían en la ejecución y modificación de una respuesta defensiva frente a un estímulo visual amenazante.

1.7.2 Hipótesis general

Los puntos de la sección anterior dan marco a la hipótesis general que inspiró el presente trabajo de tesis:

“El aprendizaje y la memoria visual en Chasmagnathus pueden ser investigados a nivel de neuronas individuales en el animal vivo”

1.7.3 Objetivos

Con relación a la hipótesis general nos propusimos cumplir los siguientes objetivos:

1. Desarrollar una preparación experimental en *Chasmagnathus* para estudiar la fisiología de neuronas individuales con registros intracelulares en el animal intacto.
2. Identificar fisiológica y morfológicamente neuronas del cerebro de *Chasmagnathus* involucradas en la detección del estímulo visual de peligro que provoca su respuesta de escape.
3. Investigar el efecto de la estimulación repetida con el estímulo visual de peligro sobre la respuesta de las neuronas y su relación con el proceso de aprendizaje y memoria visual de *Chasmagnathus*.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1 Animales, procedencia y mantenimiento

Los animales utilizados fueron cangrejos de la especie *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851). La clasificación taxonómica lo ubica en la superclase Crustacea, clase Malacostraca, orden Decapoda, familia Grapsidae. Trabajamos con cangrejos machos adultos de un ancho máximo de caparazón comprendido entre 2,6 y 2,9 cm y un peso medio de $17 \pm 0,2$ g (calculado sobre una muestra de 60 animales).

Chasmagnathus, es un cangrejo semiterrestre eurihalino que habita la zona costera de Argentina, Uruguay y del sur de Brasil. Ocupa los bancos de limo mesolitoral y supralitoral de la zona de transición de agua dulce y marina. En nuestro caso, el lugar de captura es en los estuarios de agua salobre de San Clemente del Tuyú, Provincia de Buenos Aires, Argentina. La salinidad del agua se mantiene a lo largo del año entre 12 y 14 ‰. Luego de su captura los cangrejos son transportados al laboratorio en recipientes especialmente diseñados a tal fin. Las recolecciones se realizan durante todo el año con un intervalo de 15 a 20 días.

Una vez en el laboratorio los animales son alojados en cubas plásticas (35 x 48 x 27 cm) con una profundidad de agua salobre de 2 cm y a una densidad de 20 cangrejos por recipiente. El agua utilizada en las cubas y durante los experimentos fue preparada con sal marina de venta comercial (salinidad 10-14 ‰, pH 7,4-7,6). Los animales fueron mantenidos en un ciclo luz-oscuridad de 12L:12O (7 a.m. a 7 p.m.). La temperatura ambiente en el recinto de mantenimiento fue de 22 a 24°C. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en horas del día y durante las dos primeras semanas luego del arribo de los animales al laboratorio.

2.2 Preparación electrofisiológica

La rigidez del exoesqueleto de *Chasmagnathus* permite sujetar al animal con firmeza. Sujetamos al cangrejo por ambos lados del tórax con una pinza de ancho graduable que permite regular la fuerza con que se inmoviliza al animal (figura 7a, b). De este modo, el cuerpo de los animales queda completamente fijo al mismo tiempo que el animal conserva la capacidad de mover libremente sus patas. Las quelas, en cambio, se sujetan la una con la otra utilizando una banda de goma para impedir que con ellas el animal alcance a tomar el electrodo de registro (figura 7a, b). Los pedúnculos oculares se fijan aplicando cemento acrílico de secado rápido conservando la posición normal de visión, esto es, formando un ángulo aproximado de 70 grados respecto de la horizontal (figura 7b). En general se añade una pequeña ménsula de aluminio en forma de L para reforzar la fijación del pedúnculo al cefalotórax del animal (no aparece en la figura 7). La estabilidad mecánica de los pedúnculos oculares es fundamental ya que allí se ubica el lóbulo óptico donde realizamos los registros electrofisiológicos de esta tesis.

En los decápodos los ojos compuestos se ubican en el extremo de los pedúnculos oculares. La retina ocupa más de dos tercios de la superficie de la cúpula del pedúnculo (figura 4). El resto de la superficie de la cúpula del

pedúnculo, sobre la región medial, consiste en una extensión de la cutícula en forma de península (vista superior en la figura 7c). Dentro del pedúnculo e inmediatamente por debajo de la retina se encuentran los distintos neuropilos que conforman el lóbulo óptico.

Una vez que se sujetó al cangrejo y se fijaron sus pedúnculos oculares, bajo lupa se remueve, realizando un corte tangencial con un bisturí, una porción de la extensión de cutícula lindante al ojo compuesto (figura 7d). El orificio resultante (500 μm de diámetro aproximadamente) permite introducir verticalmente el electrodo de registro. Este método de aproximación permite alcanzar el lóbulo óptico con microelectrodos de vidrio sin dañar la retina ni afectar el sistema visual.

Por otra parte, como la membrana de tejido conectivo que recubre el sistema nervioso se encuentra notablemente reducida en el lóbulo óptico de crustáceos, no es necesario continuar disecando el sistema nervioso ni utilizar enzimas para poder penetrar las neuronas de este lóbulo.

Luego de posicionado el electrodo, el orificio de entrada al pedúnculo es ocluido con una pequeña cantidad de vaselina, impidiéndose así la pérdida de hemolinfa y amortiguando los cambios de presión originados por el latido del corazón.

2.3 Dispositivo experimental

Los experimentos electrofisiológicos se realizan en un dispositivo experimental donde se controlan cuidadosamente los estímulos que recibe el animal (figura 7e). Este consiste básicamente en una jaula de Faraday de paredes sólidas que impiden el ingreso de luz y que tiene una cortina rebatible en el frente. De este modo, durante los experimentos el interior del dispositivo queda protegido de estímulos visuales no controlados que pudieran incidir desde el exterior.

El interior del dispositivo experimental se ilumina con una lámpara común (wolframio-tungsteno) de 40 watt orientada hacia el techo. En tales condiciones la luminosidad en torno al cangrejo es de alrededor de 200 mW/m^2 . Las paredes y el techo de la jaula están pintados de blanco y la superficie de la mesa de negro. Así, se favorece el contraste del estímulo visual de peligro (negro) contra el techo y sobre la mesa se minimizan sombras y reflejos (en la misma figura pueden notarse los reflejos en la mesa cuando esta aún no había sido pintada). Los registros electrofisiológicos se realizan sobre una mesa neumática. Esto, además de favorecer la estabilidad de los registros, impide que el cangrejo perciba señales vibratorias transmitidas por el sustrato.

Una vez que el cangrejo fue preparado como se describió anteriormente se lo introduce en el dispositivo de registro donde se lo mantiene semisumergido en agua salobre utilizando para ello un dispositivo magnético de sostén. Un pequeño orificio realizado en el cefalotórax permite poner el electrodo de tierra en contacto con la hemolinfa del animal.

Los microelectrodos fueron hechos con un *puller* (P-77, Sutter Instrument) a partir de capilares de borosilicato de 1,2 mm de diámetro externo y 0,68 mm de

diámetro interno. La resistencia de los microelectrodos fue de 40-60 M Ω cuando se los llenó con la solución con que realizamos los registros electrofisiológicos, 3 M de KCl. En el dispositivo de registro, el microelectrodo vinculado a un micromanipulador se colocó verticalmente por encima del animal. El micromanipulador dirigió el movimiento del electrodo a través del orificio realizado en la cutícula en dirección del lóbulo óptico (figura 7f).

Para registrar la actividad electrofisiológica celular utilizamos un amplificador Axoclamp 2B (Axon Instruments). La señal electrofisiológica ya amplificada se monitoreó durante los experimentos con un osciloscopio analógico. La salida del amplificador se conectó también a un conversor analógico digital para almacenar los registros con una computadora en formato digital. En el comienzo de este trabajo utilizamos un conversor TL-1 y posteriormente un conversor Digidata 1200 (ambos de Axon Instruments). El programa Clampex 6 nos sirvió para registrar la actividad electrofisiológica y aplicar los distintos estímulos de manera controlada en el tiempo. La respuesta celular frente a un pulso de luz fue adquirida con una frecuencia de muestreo de 3,5 kHz y la respuesta frente a un estímulo visual de peligro con 1,5 kHz.

2.4 Estímulos visuales

En los distintos experimentos electrofisiológicos de esta tesis se utilizan dos tipos de estímulos visuales para estudiar la fisiología neuronal: un pulso de luz y un estímulo visual de peligro.

Una lámpara de filamento de xenón ubicada en el exterior de la jaula de Faraday constituye la fuente del pulso de luz (PL). Durante los experimentos la lámpara permanece encendida a una misma intensidad para asegurar una misma composición espectral del PL. Una fibra óptica guía la luz desde el exterior hacia el interior de la jaula hasta unos 10 cm del ojo de registro. La apertura y cierre de un *shutter* electromecánico ubicado entre la fuente de luz y la fibra óptica determinan el comienzo y finalización del PL. El pulso resultante es de 120 W/m² a nivel de la retina del animal. La ventaja de estimular con un PL de alta intensidad, la que *a priori* puede parecer poco fisiológica, radica en que favorece una perturbación robusta y consistente de las distintas neuronas involucradas en el procesamiento de la información visual. Además, como la penetración celular se produce sin visualizar el tejido nervioso, la incidencia del PL de forma masiva y homogénea sobre la retina nos permite realizar una primera clasificación celular con relativa independencia de su campo receptivo.

El estímulo visual de peligro (EVP) que se utiliza en esta tesis consiste en el desplazamiento de una pantalla que se mueve por encima del animal. Este tipo de estimulación visual en el campo dorsal constituye un estímulo visual de peligro frente al que los cangrejos despliegan una conspicua respuesta de escape (RE) (Land y Layne, 1995; Layne, 1998). Dado que, uno de nuestros objetivos es identificar neuronas relacionadas con la detección del estímulo involucrado en el aprendizaje visual de cangrejo, decidimos adoptar exactamente el mismo estímulo

que desde hace veinte años se utiliza en el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria para estudiar el aprendizaje y la memoria en *Chasmagnathus*.

La pantalla en cuestión está hecha de cartón negro, tiene forma rectangular (7 cm x 25 cm), y se ubica, como en los experimentos comportamentales, 25 cm por encima del animal. El ángulo que subtiende es, entonces, de 53° a lo largo y de 16° a lo ancho. La trayectoria que desarrolla el EVP consiste en una rotación de 90°, primero en sentido horario y luego en sentido antihorario hasta regresar a la posición de partida (figura 8). La velocidad que despliega la figura es de 82°/s, en uno y otro sentido, por lo que el movimiento completo del EVP dura 2,2 seg. Estudios comportamentales previos a esta tesis habían revelado que esta forma de estimulación con el EVP, en la que el estímulo visual se aproxima al cangrejo desde dos sentidos distintos, provoca una RE de mayor intensidad que cuando el estímulo se aproxima repetidamente desde un mismo sentido.

2.5 Procedimiento experimental

Una vez que el cangrejo se encuentra en el dispositivo experimental y se penetra una célula, se espera el tiempo necesario hasta que se estabilice su potencial de membrana (desde unos pocos segundos a un par de minutos). Luego se evalúa preliminarmente su respuesta frente a un PL y frente al movimiento de la mano en la región dorsal del animal. En el caso de que la célula no responda frente a estos estímulos o no corresponda al tipo neuronal que se pretende estudiar se la abandona en búsqueda de otra neurona. En caso de que la neurona responda apropiadamente a alguno de los estímulos, se baja la cortina que está en el frente de la jaula de Faraday y se espera 10 min sin estimular visualmente al animal antes de comenzar los registros. Luego de este período de adaptación visual se registra la respuesta neuronal frente al PL y/o frente al EVP. El intervalo de tiempo entre estimulaciones con el PL es de 1 min y con el EVP de al menos 3 min (a menos que se indique algo distinto).

Cabe destacar que este protocolo experimental surge después de haber explorado la preparación experimental. En un primer momento no sabíamos si podríamos obtener registros intracelulares estables. Tampoco sabíamos hasta qué punto los estímulos visuales elegidos resultarían adecuados para provocar respuestas neuronales. Después de un tiempo de estudiar la preparación, el tipo de respuesta neuronal podía, en muchos casos, intuirse al momento de penetrar la neurona: el potencial de membrana, la actividad espontánea o la forma de los potenciales de acción sirvieron efectivamente como pronóstico del tipo neuronal penetrado.

Así, en los últimos experimentos de esta tesis (Capítulo 6), pudimos registrar la respuesta de determinados tipos neuronales frente a la primera estimulación con el EVP que recibieran esos cangrejos. De este modo, se pudo replicar una característica fundamental de los experimentos comportamentales donde la RE se estudia en animales que nunca fueron estimulados previamente con el EVP.

2.6 Estudios histológicos

La identificación morfológica de las neuronas estudiadas se realizó a través de tinciones intracelulares por la inyección iontoforética de un marcador o colorante. La mayoría de las tinciones fueron hechas con el colorante Lucifer yellow siguiendo la técnica de Stewart (1981). La punta del microelectrodo se llenó desde su base por capilaridad con una solución 5% m/v de Lucifer yellow como sal de litio (Sigma, Mo., USA) en agua bidestilada. El resto del electrodo se llenó, dejando una burbuja de aire de separación con el colorante, con una solución 1 M de LiCl. Una vez finalizada la caracterización electrofisiológica de la neurona, se inyectó el colorante aplicando corriente negativa continua o, en la mayoría de los casos, por pulsos de 0,5 seg a 1 Hz. Según el caso la corriente inyectada fue de 3 a 10 nA por un tiempo de 15 a 120 min. Con el colorante la resistencia de los electrodos varió entre 100 y 900 M Ω . Una resistencia en serie colocada en el electrodo de tierra, entre el cangrejo y el amplificador, nos permitió determinar la cantidad de corriente efectivamente inyectada. Después de inyectado el colorante, el cangrejo fue liberado y se lo dejó a temperatura ambiente de 2 a 4 hs para permitir la difusión intracelular del colorante *in vivo*.

En unos pocos casos, 10 tinciones aproximadamente, se utilizó como colorante dextrano rodamina (3 kD) a una concentración de 5% m/v. Si bien, en estos casos la calidad de las tinciones fue muy buena, el llenado de los microelectrodos con este colorante acarrea dificultades al momento de penetrar neuronas. Esta dificultad se manifestaba en una menor frecuencia de penetración celular por lo que dejamos de utilizar este colorante. El uso de cobalto como marcador celular llevaba aparejado, además de esta misma dificultad, el bloqueo casi inmediato de los electrodos al intentar inyectar corriente, por lo que nunca llegó a ser utilizado con éxito.

Después de transcurrido el tiempo de difusión del colorante los animales fueron rápidamente anestesiados en un baño de agua salobre a 0°C y sacrificados para inmediatamente separarles el pedúnculo ocular. Bajo lupa se disecó el lóbulo óptico en fijador. Se utilizó como fijador una solución 0,1 M de buffer fosfato de sodio que contenía 4% m/v de paraformaldeído y 15% m/v de sacarosa (pH 7,4). El tejido se fijó por 12 hs a 4°C.

Una vez completado el proceso de fijación se lavó el tejido en solución salina de buffer fosfato de sodio con un 30% m/v de sacarosa (4 lavados a intervalos de 1 h) y se lo montó en plasticola (Tissue-Tek, Sakura Finetek). La preparación se congeló en isopentano a -70°C y se cortó en un crióstato a -20°C en rodajas de 20 μ m de espesor (para una buena conservación del tejido fue fundamental que el taco no superase durante la manipulación los -20°C). Según el caso se realizaron cortes seriados en el plano anteroposterior (longitudinal), lateromedial (transversal) o dorsoventral (tangencial). Los cortes se deshidrataron en series crecientes de etanol y se aclararon y montaron en metil salicilato (1 min por cada paso).

Los preparados se observaron y fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia (Axoplan). La reconstrucción neuronal en dos dimensiones (2D) se realizó dibujando las secciones neuronales presentes en las distintas rodajas seriadas del lóbulo mientras estas eran observadas al microscopio o bien calcando las secciones neuronales de la serie fotográfica.

También estudiamos la ubicación y morfología de interneuronas visuales en el lóbulo óptico entero utilizando un microscopio confocal Olympus. El espesor del lóbulo en el eje anteroposterior es de 350 μm , por lo que la resolución espacial que se puede alcanzar en las secciones ópticas es suficientemente buena como para reconstruir la morfología general de las interneuronas. En estas tinciones utilizamos como marcador neurobiotina 5% m/v en una solución 0,1 M de KCl (neurobiotina, Vector Laboratories). Este marcador tiene como ventaja que los electrodos se tapan muy poco y que la relación señal/ruido es mejor que con Lucifer yellow. El protocolo de inyección es el mismo que para el Lucifer yellow salvo en que la corriente que se inyecta es positiva y en que la resistencia de los electrodos va de 70 a 600 M Ω . Una vez completada la fijación del tejido se lo lava tres veces con una solución de buffer fosfato de sodio 0,1 M, 2% m/v de tritón y 0,1% m/v de azida sódica (1 h por lavado). Posteriormente, se lo incuba en la misma solución con 1/3000 (v/v) de avidina rodamina (Vector Laboratories) por 12 hs. Luego, el tejido se lava de igual manera y con la misma solución que después de la fijación. Por último, el tejido se deshidrata en una serie creciente de alcoholes (20 min por serie), se aclara en metil salicilato por 20 min y por último se lo monta en este mismo medio en un portaobjetos socavado. Cuando se ilustre una figura con una fotografía tomada con esta metodología nos referiremos a ella como una sección óptica, de lo contrario deberá entenderse que se trata de la fotografía de una rodaja del tejido.

2.7 Experimentos comportamentales

El dispositivo utilizado para los experimentos comportamentales del capítulo 6 fue el actómetro. Este consiste en un recipiente plástico cóncavo con un piso circular plano al que se agregan 50 mm³ de agua marina. Una vez colocado el cangrejo en el actómetro se baja la cortina abatible de la jaula de Faraday y después de 10 min de adaptación al contexto comienza la fase de entrenamiento. Cada ensayo de estimulación consiste en dos ciclos de movimiento del EVP separados por 2 seg. Cada ciclo de movimiento del EVP es idéntico al que se ilustra en la figura 8.

El ensayo de estimulación con el EVP provoca la RE del cangrejo. Un micrófono ubicado en la base del actómetro registra las vibraciones de baja frecuencia del recipiente producidas por el pataleo del animal. El micrófono, un transductor piezoeléctrico, convierte las vibraciones del receptáculo en señales eléctricas. Estas señales eléctricas son digitalizadas y registradas por el mismo equipo de adquisición que se utiliza para realizar los registros electrofisiológicos. La misma computadora que se utiliza para registrar la RE de los animales sirve para programar los protocolos de entrenamiento. Las señales eléctricas generadas por la

RE están compuestas fundamentalmente por una sucesión rápida de picos de voltaje, cuyo número se corresponde con la intensidad del pataleo desplegado por el animal durante el período de estimulación con el EVP. La intensidad de la RE es entonces estimada a partir del número de picos de voltaje ocurridos durante los dos ciclos de estimulación que componen cada ensayo.

Como se mencionó en la introducción, la memoria contexto señal (MCS) se produce por un entrenamiento espaciado. Este entrenamiento consiste en 15 ensayos de estimulación con el EVP presentados con un intervalo entre ensayos de 3 min.

Por otra parte, un protocolo masivo da lugar a la memoria señal (MS). En este caso el protocolo de entrenamiento consiste en 15 ensayos de estimulación con el EVP presentados con un intervalo entre ensayos de 2 seg.

2.8 Estudios neuronales en relación con el comportamiento

Para poder comparar la persistencia en la modificación de la respuesta comportamental y neuronal (como consecuencia del entrenamiento) en el tiempo que duran los registros electrofisiológicos, utilizamos un protocolo de evaluación de memoria a corto término. Este consiste en una fase normal de entrenamiento (espaciado o masivo) y una fase de evaluación de la memoria quince min después de terminado el entrenamiento. La fase de evaluación consiste en un ensayo único de estimulación con el EVP. De este modo, en el tiempo que dura el protocolo completo podemos registrar la respuesta neuronal en la fase de entrenamiento y en la fase de evaluación de la retención a corto término. El protocolo completo para la MCS a corto término dura 67 minutos: 10 min de adaptación + 42 min de entrenamiento (15 ensayos separados cada 3 min) + 15 min de espera antes del ensayo de evaluación de la memoria. El protocolo para la MS de corto término dura 27 minutos: 10 min de adaptación + 2 min de entrenamiento (15 ensayos separados cada 2 seg) + 15 min de espera antes del ensayo de evaluación de la memoria. Los mismos protocolos se utilizaron tanto para estudiar la respuesta comportamental como neuronal. La retención de la memoria a corto termino se evaluó comparando la respuesta del primer ensayo de entrenamiento con la del ensayo de evaluación, así también como la respuesta del último ensayo de entrenamiento con la del ensayo de evaluación.

Para estudiar la persistencia de la modificación de la respuesta a largo término (24 hs) realizamos un entrenamiento espaciado en el día 1 y 24 hs después, en el día 2, evaluamos la retención. Una vez terminado el entrenamiento en el día 1 los animales fueron guardados individualmente. En el día 2 fueron reinstalados en el dispositivo experimental para evaluar, según el caso, la respuesta neuronal o comportamental. La fase de evaluación de la memoria consistió en 10 min de adaptación en el dispositivo experimental seguidos de la presentación de 1 ensayo de estimulación con el EVP.

Para determinar si efectivamente se produjo la MCS de largo término se comparó la respuesta comportamental entre un grupo de animales control y un grupo de animales entrenados en la fase de evaluación de la memoria. Los animales del

grupo control permanecieron el día de entrenamiento en el actómetro (por el tiempo que duró el entrenamiento) sin que fueran estimulados. El grupo entrenado, en cambio, recibió el entrenamiento espaciado. La MCS de largo término se manifiesta como una reducción en la RE de animales entrenados en comparación con la RE de animales control durante la fase de evaluación de la memoria (día 2).

Cuando se estudió la retención de largo término de la respuesta neuronal el protocolo experimental fue el mismo. En este caso durante el día del entrenamiento los animales fueron primero inmovilizados y luego ubicados en el dispositivo experimental del mismo modo que cuando se realizan registros electrofisiológicos. En la fase de evaluación de la retención (día 2) se estudió la respuesta de una neurona por cangrejo frente a la primer estimulación con el EVP que experimentaron los animales en ese día. Aquí la retención se evaluó comparando la respuesta neuronal frente al ensayo de estimulación con el EVP (medida en número de potenciales de acción disparados durante el movimiento del EVP) de neuronas de animales del grupo entrenado contra neuronas pertenecientes a animales del grupo control. Estos últimos, el día 1 también fueron preparados y mantenidos en el dispositivo experimental por el mismo tiempo que los animales entrenados, pero sin ser estimulados con el EVP.

Como condición excluyente en estos experimentos la neurona a ser registrada debía ser penetrada antes de que transcurrieran 60 min desde la disección de la cutícula del pedúnculo. Además, para proseguir con la medición se adoptaron criterios que incluían la estabilidad del potencial de membrana y de la actividad espontánea de la neurona al momento del ensayo de evaluación con el EVP. El experimento se realizó y analizó empleando una estrategia de doble ciego.

Capítulo 3

Resultados

Validación de la preparación experimental

3.1 Introducción

El conocimiento sobre la anatomía, histología y fisiología del sistema visual de los crustáceos es muy limitado. Por ello la investigación del sistema visual de *Chasmagnathus* resulta de interés no sólo a los fines particulares de estudiar la visión en el cangrejo, sino también por el valor que tiene en el marco de estudios comparados y evolutivos (ej. Osorio y Bacon, 1994; Srinivasan et al., 2001; Clifford e Ibbotson, 2002).

En este capítulo ilustraremos algunas de las características generales de la preparación que desarrollamos para estudiar la neurofisiología de la visión y la memoria en el cangrejo *Chasmagnathus*.

3.2 Preparación experimental

Una de las principales dificultades para realizar registros intracelulares en animales no anestesiados radica en el alto grado de estabilidad mecánica necesaria para que el electrodo de registro permanezca dentro de la célula. La rigidez del exoesqueleto permite sujetar con firmeza al animal, proveyendo la estabilidad mecánica necesaria para realizar registros intracelulares *in vivo*. La remoción de un pequeño sector de cutícula del pedúnculo posibilita el acceso con el microelectrodo de registro a parte del cerebro del animal. El microelectrodo se dirige en sentido descendente en dirección del lóbulo óptico sin dañar la retina. La confirmación de haber penetrado un tipo neuronal dado se obtiene a partir de la respuesta celular frente a distintos estímulos visuales. Para ello utilizamos fundamentalmente un PL de alta intensidad. La incidencia del PL de manera masiva y homogénea sobre la retina permitió obtener una respuesta relativamente independiente del campo receptivo neuronal.

3.3 Diversidad de respuestas neuronales frente al pulso de luz

En la figura 10 se ilustra la preparación experimental y algunos de los primeros registros que obtuvimos en *Chasmagnathus* de respuestas neuronales frente al PL. La metodología utilizada nos permitió registrar intracelularmente una gran variedad de respuestas neuronales frente al PL. Así, registramos la respuesta tanto de interneuronas que disparan potenciales de acción como de interneuronas con respuestas graduales. A estas últimas las llamaremos pasivas (pero ver por ej. Magee, 2000). En relación al curso temporal de la respuesta, los registros de la figura 10 corresponden a: neuronas con respuestas pasivas tónicas (fila superior); neuronas que disparan PA con respuestas tónicas (fila media); y neuronas con respuestas fásicas (fila inferior).

3.4 Consistencia de los registros neuronales

La diversidad observada en las respuestas neuronales frente al PL podría deberse, en parte, al deterioro de la preparación durante el registro. En la figura 11 se muestran, entonces, ejemplos de respuestas de distintas neuronas frente a tres presentaciones repetidas del PL separadas por 10 min. Como puede observarse en estos ejemplos la respuesta de cada neurona es sumamente consistente. Esta consistencia se conserva generalmente por el tiempo que dura la penetración celular, la que en muchos casos puede extenderse por más de 2 hs.

3.5 Reproducibilidad de los registros neuronales

Si bien, como se mostró en la figura 11, una vez penetrada una neurona su respuesta es consistente, podría ocurrir que la respuesta al PL no fuese repetible de un cangrejo a otro. Cabe recordar que la penetración neuronal se realiza sin visualizar el tejido nervioso. Sin embargo, en las condiciones experimentales descritas muchos de los tipos de respuesta son reconocibles en individuos distintos (preparados experimentales distintos). A modo de ejemplo, se pueden comparar los registros de la figura 11 con los de la figura 10. Los registros de estas figuras corresponden a neuronas de cangrejos distintos, sin embargo, cada tipo de respuesta neuronal de la figura 11 encuentra su semejante en la figura 10. Esta comparación sólo pretende ilustrar resultados que se analizarán cuantitativamente en los próximos capítulos. Así, los distintos tipos de respuestas neuronales nos permitieron identificar bajo criterios fisiológicos distintos tipos de interneuronas visuales. Además, manipulando el tamaño y forma de los electrodos junto a su posición y ángulo de ataque sobre el tejido se puede favorecer la penetración del tipo neuronal que se pretende registrar.

3.6 Dependencia de la respuesta neuronal por la intensidad de estimulación

Aunque de manera no sistemática, investigamos si la respuesta neuronal depende de la intensidad del PL o si ésta es de tipo todo o nada. Si bien este estudio se realizó sólo en algunos tipos neuronales y con unas pocas intensidades de luz, los registros de la figura 12 muestran que para las neuronas estudiadas la intensidad de la respuesta aumenta conforme crece la intensidad de la estimulación visual.

Lo robusto y reproducible de los resultados obtenidos, ejemplificados en las figuras 10, 11 y 12 muestran que tanto las condiciones experimentales en las que se realizan los registros como la integridad de la preparación y la viabilidad celular permiten registrar de manera confiable la actividad neuronal en el animal intacto. Con estos antecedentes comenzamos entonces a caracterizar la fisiología y morfología de distintos tipos de interneuronas del lóbulo óptico del cangrejo.

Capítulo 4

Resultados

Caracterización de interneuronas visuales

4.1 Introducción

En crustáceos, el crayfish es prácticamente el único animal donde se estudiaron sistemáticamente neuronas del sistema visual. En estos estudios, en una primera aproximación, se clasificó a las neuronas en base a su respuesta frente a un PL. Esta metodología sirvió originalmente a Wiersma y colaboradores para distinguir a través de registros extracelulares a nivel del tracto protocerebral dos grupos de neuronas tónicas, las neuronas sustaining y las neuronas dimming. Posteriormente, Glantz y colaboradores abordaron con registros intracelulares el estudio de interneuronas visuales de los primeros dos neuropilos ópticos de crayfish, la lámina y la médula. En cuanto a las neuronas sustaining y dimming, esta metodología les permitió profundizar el conocimiento sobre su fisiología y describir su ubicación y su morfología. El abordaje intracelular les permitió, además, estudiar otras neuronas de los primeros neuropilos del sistema visual que por presentar respuestas únicamente pasivas no habían podido ser estudiadas previamente. A partir de la morfología y de la respuesta frente a un PL, Glantz y colaboradores identificaron dos clases de interneuronas visuales pasivas depolarizantes y tres clases de interneuronas visuales pasivas hiperpolarizantes (Waldrop y Glantz, 1985; Wang-Bennett y Glantz, 1987a,b; Pfeiffer y Glantz, 1989 y 1991).

En este capítulo caracterizamos distintos tipos de interneuronas del lóbulo óptico del cangrejo. Por tratarse del primer estudio de este tipo en cangrejos, para orientarnos en la identificación de las distintas interneuronas, utilizamos como referencia los estudios previos en crayfish sobre: la respuesta neuronal frente a un PL, su ubicación y su morfología. En los casos en que la semejanza de resultados lo hizo posible, nombramos a las interneuronas del cangrejo con la misma denominación utilizada en crayfish.

4.2 Clasificación preliminar de interneuronas visuales de *Chasmagnathus*

En este capítulo analizamos la respuesta al PL de 362 neuronas del lóbulo óptico de 71 cangrejos. Tomando como referencia los antecedentes en crayfish, 258 neuronas pudieron ser clasificadas por criterios fisiológicos dentro de uno de los cuatro grandes grupos celulares establecidos: neuronas sustaining, neuronas dimming, neuronas pasivas hiperpolarizantes, y neuronas pasivas depolarizantes. En tanto que 28 neuronas fueron clasificadas en un nuevo grupo celular como neuronas pasivas con respuesta fásica al PL. Las neuronas restantes presentaron distintos tipos de respuestas fásicas.

4.3 Neuronas pasivas tónicas depolarizantes

En *Chasmagnathus* registramos frecuentemente neuronas pasivas que responden frente a un PL de forma tónica depolarizante. En su respuesta se reconoce un pico al inicio del pulso seguido de un componente sostenido de menor magnitud. En crayfish se encontraron dos clases de interneuronas pasivas

depolarizantes: las amácrinas de la médula (ej. Waldrop y Glantz, 1985; Pfeiffer y Glantz, 1989) y ocasionalmente algunas células transmedulares (Glantz y Bartels, 1994). A pesar de que las neuronas amácrinas fueron extensamente estudiadas y de que pueden identificarse claramente por su ubicación y morfología, aún no se estableció un criterio electrofisiológico que permita diferenciarlas de las pocas neuronas transmedulares registradas. En la figura 13 se muestran los registros de distintas interneuronas del cangrejo que, por la semejanza en el curso temporal de su respuesta, corresponderían a neuronas amácrinas de la médula o, eventualmente, a neuronas transmedulares de crayfish.

Por otra parte, Waldrop y Glantz (1985) observaron que algunas neuronas amácrinas de la médula tienen, luego de la finalización de un PL, oscilaciones de su potencial de membrana de un período de 200 ms aproximadamente. En ese trabajo, muestran que estas neuronas modulan el potencial de membrana de otras interneuronas medulares (ej. neuronas dimming). En el cangrejo también encontramos neuronas pasivas depolarizantes con oscilaciones de su potencial de membrana pero con un período $115 \pm 6,5$ ms (figura 13, trazos de las filas media e inferior). Como veremos en la sección 4.6 algunas neuronas dimming del cangrejo muestran oscilaciones de su potencial de membrana con el mismo período que las neuronas pasivas luego de un PL. Esto sugeriría que, al igual que en crayfish, algunas neuronas pasivas depolarizantes podrían estar modulando, directa o indirectamente, a neuronas dimming. Sin embargo, para determinar si estas neuronas pasivas del cangrejo son análogas a las amácrinas de la médula de crayfish es necesario complementar estas observaciones con una caracterización de la morfología neuronal.

4.4 Neuronas pasivas tónicas hiperpolarizantes

En *Chasmagnathus* registramos células que responden de manera tónica con distintos cursos temporales de hiperpolarización frente a un PL (figura 14). Las respuestas celulares tienen en común un pico de hiperpolarización seguido de un componente sostenido de menor magnitud. En crayfish se describieron tres grupos de neuronas visuales pasivas tónicas hiperpolarizantes: neuronas monopolares de la lámina, neuronas amácrinas de la lámina y neuronas Tan (Wang-Bennett y Glantz 1987a,b; Glantz y Bartels, 1994; Glantz, 1996). La amplitud relativa y el curso temporal de estas hiperpolarizaciones se utilizan en crayfish como criterio fisiológico para distinguir entre estas 3 clases de interneuronas. Además, las neuronas Tan presentan consistentemente una depolarización transiente al finalizar un PL (Glantz y Bartels, 1994). Los perfiles de respuesta descritos en crayfish son similares a los que encontramos en el cangrejo. De acuerdo a lo establecido en crayfish, las respuestas neuronales de *Chasmagnathus* ilustradas en la figura 14 corresponderían a: 1) neuronas monopolares de la lámina, caracterizadas por un pico seguido de una meseta al 50% del valor del pico (trazos de la fila superior); 2) neuronas amácrinas de la lámina, caracterizadas por un pico y una recuperación lenta del potencial (trazos de fila media); y 3) neuronas Tan, caracterizadas por una

respuesta hiperpolarizante sostenida y una depolarización al finalizar el PL (trazos inferiores).

Es oportuno destacar que si bien el PL utilizado es un estímulo que incide masivamente sobre el ojo, la intensidad con la que la retina es efectivamente estimulada no es homogénea. Por otra parte la mayoría de las interneuronas visuales tienen campos receptivos distintos. Estas dos situaciones, la no homogeneidad de la estimulación y la diferencia en los campos receptivos, pueden determinar variaciones en la respuesta de distintas neuronas aún cuando se tratara de un mismo tipo celular. Estas diferencias podrían reflejarse en el sentido de cambio del potencial, en la amplitud de este cambio y/o en el curso temporal de la respuesta. Por este motivo una clasificación neuronal basada únicamente en el curso temporal y la amplitud de las respuestas frente a un PL debe ser considerada provisoria.

La clasificación hecha en el cangrejo para neuronas monopolares de la lámina y neuronas amácrinas de la lámina debe ser tomada como tentativa no solo por los motivos recién desarrollados, sino porque además cada una de estas clases neuronales contiene subclases que presentan pequeñas variaciones en su perfil de respuesta (Wang-Bennett y Glantz 1987b; Glantz y Bartels, 1994). En cuanto a las neuronas Tan, la hiperpolarización sostenida junto con la depolarización duradera al finalizar el PL permitió identificarlas durante los registros electrofisiológicos de modo más confiable.

4.4.1 Caracterización morfológica de las neuronas Tan

El único grupo de neuronas pasivas tónicas hiperpolarizantes del cangrejo en el que pudimos estudiar la morfología de modo relativamente consistente es el de las neuronas Tan. En crustáceos e insectos estas neuronas fueron descritas en detalle y se observó que tanto su ubicación como su estructura es similar en ambos grupos de animales (Nassel, 1977; Strausfeld y Nassel, 1980; Wang-Bennett y Glantz, 1987a). En *Chasmagnathus* estudiamos la morfología de neuronas Tan a través de tinciones intracelulares con Lucifer yellow y neurobiotina. Pudimos teñir 6 células, las que presentaron una morfología similar. La figura 15 muestra, desde una vista anterior, la reconstrucción de una de estas células realizada a partir de la observación de secciones seriadas del lóbulo óptico.

Las neuronas Tan arborizan en la lámina y en la médula. En la médula, presentan un conjunto de procesos tangenciales que corren paralelos en un mismo estrato. Estos procesos tangenciales convergen en una neurita principal que asciende verticalmente hacia la lámina. En la lámina, la neurita principal ramifica y se extiende lateralmente en neuritas más finas. El cuerpo celular se encuentra en la capa de somas ubicada por encima de la médula y se conecta a la neurita principal a través de un proceso delgado. Según la célula estudiada los procesos de la lámina y de la médula mostraban diferencias en el grado de extensión y ramificación.

La morfología de las neuronas Tan del cangrejo coincide en líneas generales con la descrita en crayfish e insectos. Si bien en estos animales se determinó que la región dendrítica se ubica en las neuritas de la médula y la región axónica en las de la lámina, en el cangrejo esta polaridad no ha sido aún confirmada. La

caracterización realizada aquí muestra, sin embargo, que la ubicación y morfología de este grupo celular y su respuesta a un PL son consistentes con las de neuronas Tan de crayfish.

4.5 Neuronas sustaining

En *Chasmagnathus* encontramos con frecuencia un perfil de respuesta neuronal al PL que consiste en una depolarización postsináptica acompañada por una descarga de potenciales de acción (PAs). Durante la presentación del PL se reconoce una primera fase compuesta por un pico de depolarización y una segunda fase estacionaria de menor amplitud y frecuencia de PAs. La finalización del PL da lugar a una hiperpolarización de la membrana que luego de algunos segundos recupera su potencial de reposo. Este perfil de respuesta frente a un PL es idéntico al de las neuronas sustaining de crayfish (ver figura 6) (Kirk et al, 1982a; Pfeiffer y Glantz, 1989). El primer registro de la figura 16 muestra el típico perfil de respuesta de una neurona sustaining de *Chasmagnathus*.

La frecuencia de descarga de PAs que se observa en la fase estacionaria depende, al igual que en crayfish, de la amplitud del potencial excitatorio postsináptico (PEP). Este se relaciona a su vez con la intensidad del PL (en la tercera fila de la figura 12 se puede ver un ejemplo). En las condiciones de adaptación a la luminosidad del dispositivo experimental (200 mW/m^2) el registro de 10 neuronas sustaining reveló: un potencial de reposo de membrana de $-58 \pm 3,2 \text{ mV}$, una amplitud de los PAs medidos desde el reposo de $11,5 \pm 2,6 \text{ mV}$, una latencia en la respuesta de $17,9 \pm 1,18 \text{ ms}$, un pico de depolarización de $22,1 \pm 1,8 \text{ mV}$ seguido de un potencial estacionario de $6,4 \pm 0,9 \text{ mV}$ y una hiperpolarización al finalizar el PL de $-3,9 \pm 0,8 \text{ mV}$.

Registros de neuronas sustaining como los dos últimos de la figura 16 se obtienen con baja frecuencia. En estos se observan PAs de mayor amplitud, alrededor de 50 mV . La respuesta a un PL consiste también en dos fases, un pico en la tasa de disparo de PAs seguido por un estado estacionario, pero a diferencia de lo que se observa en la mayoría de los registros el PEP se ve muy reducido. Las diferencias en la amplitud de los PAs como en la amplitud del PEP puede explicarse porque los registros fueron hechos en sitios distintos de un mismo tipo neuronal (ej. Nicholls y Kuffler, 1976; Sandeman, 1969; Grossman et al., 1979). Estudios histológicos apoyan esta hipótesis ya que se observó la misma morfología celular para neuronas que presentaban estas diferencias en sus registros. Así, los dos últimos trazos de la figura 16 corresponderían a un sitio de registro cercano al axón mientras que el primer trazo, a un sitio más cercano a la región dendrítica.

Por otra parte, el trazo inferior de la figura 16 muestra un perfil de respuesta distinto a los anteriores, al finalizar el PL la frecuencia de PAs disminuye gradualmente. Este resultado contrasta con la ausencia de PAs que se detecta típicamente como consecuencia de la hiperpolarización de membrana al finalizar el PL. Esta diferencia frente al apagado de la luz, no puede ser explicada por diferencias en el sitio de registro neuronal. Las células que presentan este último

perfil de respuesta pertenecerían entonces a una clase de neurona sustaining no descrita anteriormente.

4.5.1 Caracterización morfológica de las neuronas sustaining

A partir de tinciones intracelulares reconstruimos la estructura general de las neuronas sustaining del cangrejo. Se tiñeron 7 neuronas sustaining, las que mostraron una morfología muy similar. En la figura 17 se muestra la reconstrucción de una de estas neuronas.

Las neuronas sustaining se ubican en la médula y proyectan hacia el ganglio supraesofágico. Su estructura consiste en un conjunto de procesos tangenciales paralelos que corren en sentido lateral medial por un mismo estrato de la médula. Estos procesos convergen en una neurita principal sobre la región medial del neuropilo. De la neurita principal se origina el axón, el que proyecta hacia el ganglio supraesofágico a través del tracto protocerebral. El cuerpo celular se encuentra en la capa de somas ubicada por encima de la médula y se conecta a la neurita principal a través de un proceso delgado.

A pesar de que en algunos casos las tinciones fueron parciales, en todos los preparados se encontró que las neuritas de la médula presentaban la misma disposición espacial; en 4 de los 7 preparados se pudo identificar el soma, siempre en el grupo de cuerpos celulares ubicado por encima de la médula; en 5 de los 7 preparados se pudo determinar que la neurita principal proyectaba por el tracto protocerebral y en 1 de estos encontramos que, además, arborizaba en el protocerebro lateral.

Los resultados obtenidos hasta aquí muestran que la fisiología, ubicación y morfología de las neuronas sustaining del cangrejo son, en líneas generales, consistentes con lo informado sobre estas neuronas de crayfish.

4.6 Neuronas dimming

Las neuronas dimming fueron descritas originalmente por Wiersma y Yamaguchi (1967b) como neuronas con respuesta tónica excitatoria frente al apagado de la luz. Su perfil de respuesta es prácticamente inverso al de las sustaining, disparan continuamente en la oscuridad y se inhiben por el encendido de la luz. En *Chasmagnathus* registramos frecuentemente neuronas con un perfil de respuesta idéntico al de las neuronas dimming de crayfish (Pfeiffer y Glantz, 1989). El primer registro de la figura 18 muestra el típico perfil de respuesta de una neurona dimming de *Chasmagnathus*.

En las condiciones normales de luminosidad del dispositivo experimental el registro de 10 neuronas dimming frente al PL reveló: un potencial de reposo de membrana de -43 ± 5 mV, una amplitud de PAs medidos desde el reposo de $6,2 \pm 0,9$ mV, una latencia en la respuesta de $24,7 \pm 2,2$ ms, un pico de hiperpolarización de $-0,9 \pm 1,5$ mV seguido de un potencial estacionario de $-4,4 \pm 1,5$ mV y una depolarización al finalizar el pulso de $12,4 \pm 3,7$ mV.

Por otra parte, en 5 de estas células observamos que la respuesta al apagado del PL es seguida luego de algunos segundos, por oscilaciones del potencial de membrana con un período de $125 \pm 6,9$ ms (trazo inferior de la figura 18). Este período de oscilación coincide con el observado para neuronas pasivas tónicas depolarizantes del cangrejo. Como se mencionó en la sección 4.3 esta coincidencia sugiere que las neuronas dimming del cangrejo podrían ser moduladas por neuronas pasivas depolarizantes.

El registro de arriba a la derecha en la figura 18 también corresponde a una neurona dimming. La respuesta al PL consiste típicamente en la inhibición de los PAs mientras se aplica el estímulo y en un aumento en la frecuencia de los PAs cuando éste finaliza. Sin embargo, en estos registros se observan PAs de mayor amplitud, alrededor de 25 mV, y el potencial inhibitorio postsináptico se encuentra reducido o ausente. Este perfil de respuesta se observa esporádicamente. No obstante, estudios histológicos de neuronas dimming que presentaban estas diferencias de registro revelaron la misma morfología celular. Como fue formulado anteriormente, las diferencias observadas en la amplitud de los PAs y en el tamaño de los potenciales postsinápticos se explicarían porque los registros fueron realizados desde distintos sitios del mismo tipo neuronal.

4.6.1 Caracterización morfológica de las neuronas dimming

A diferencia de lo que sucede con las neuronas tangenciales y las sustaining no hay en la bibliografía disponible una descripción morfológica detallada de estas neuronas. Sin embargo, en distintos trabajos en crayfish se hace mención a su ubicación y morfología general (ej. Pfeiffer y Glantz, 1989 y 1991, la descripción original sería de Kirk, 1982). Estos trabajos señalan que existe una marcada semejanza en la morfología de las neuronas dimming y sustaining. En *Chasmagnathus* encontramos esta misma semejanza. En la figura 19 mostramos la reconstrucción de una neurona dimming del cangrejo.

La tinción de la neurona que se muestra en la figura 19 fue excelente pero en otros casos las tinciones fueron parciales. Sin embargo, en todos los preparados se encontró que las neuritas arborizaban en la médula con una disposición espacial similar; en 5 de los 8 preparados se pudo identificar el soma, siempre en la parte superior de la médula; y en igual proporción de preparados se pudo determinar que la neurita principal proyectaba por el tracto protocerebral. En líneas generales encontramos que la morfología de las neuronas dimming del cangrejo coincide con las breves descripciones de estas neuronas en crayfish.

Los resultados obtenidos muestran que la fisiología, ubicación y morfología de las neuronas dimming del cangrejo son consistentes con lo informado sobre estas neuronas de crayfish.

4.7 Neuronas on-off

Regularmente penetramos también neuronas con respuesta pasiva fásica depolarizante frente al encendido y apagado del PL, por lo que las denominamos de manera general neuronas on-off (figura 20). No existe en la bibliografía disponible descripciones en el sistema visual de artrópodos de neuronas con este tipo de respuesta. En crayfish el único tipo neuronal que se informó responde de manera fásica a un PL lo hace disparando PAs. El potencial de reposo de las neuronas pasivas fásicas registradas en el cangrejo se encuentra en un rango que va de -40 a -75 mV. Los registros de estas neuronas resultan estables y su respuesta al PL consistente. En la mayoría de los registros se observan eventos sinápticos espontáneos cuya frecuencia aumenta en un 40% durante la presentación del PL. En el reposo la mayoría de los registros celulares presentan PEP espontáneos (PEP_e), potenciales inhibitorios (PIP_e), y otros no muestran actividad sináptica espontánea evidente (ilustrado en los distintos trazos de la figura 20). Podría suceder que el registro de los PIP_e o de los PEP_e dependiera del potencial de reposo al cual se encuentran las células. Es decir que, células más depolarizadas tendrían mayor probabilidad de mostrar PIP_e y células menos depolarizadas mayor probabilidad de mostrar PEP_e . Sin embargo, el análisis de los resultados no parece apoyar tal interpretación.

Cabe mencionar que en algunas neuronas encontramos pequeños eventos tipo espiga montados sobre la respuesta pasiva (ampliación en la figura 20).

4.7.1 Caracterización morfológica de las neuronas on-off

Estudiamos la morfología de 12 neuronas on-off. De las 12 neuronas estudiadas 9 presentaron tinciones suficientemente intensas y definidas como para determinar su morfología. De acuerdo a la morfología observada las neuronas on-off pueden clasificarse preliminarmente en tres grupos distintos: a) neuronas con neuritas tangenciales en médula y lóbula, b) neuronas con procesos locales de la lóbula y c) neuronas columnares con arborizaciones en la médula y en la lóbula. Si bien en las 3 neuronas restantes se observaron neuritas tangenciales en la médula, las tinciones fueron débiles para poder clasificarlas.

4.7.2 Neuronas on-off con procesos tangenciales en médula y lóbula

De las 9 neuronas on-off morfológicamente identificadas 4 pertenecen a este grupo. Lamentablemente no contamos con preparados histológicos suficientemente buenos como para intentar una reconstrucción neuronal completa. Sin embargo, en todos los preparados se observaron claramente extensas neuritas tangenciales en la médula que convergen en una neurita en la región medial del neuropilo. También se observaron claramente neuritas tangenciales gruesas en la lóbula. Estas neuritas corren paralelamente por un estrato basal del neuropilo a lo largo del eje lateral medial. El cuerpo celular y la conexión entre las arborizaciones de la médula y de la

lóbula no pudieron ser identificados. En 2 de los 4 preparados se observaron en las neuritas de la lóbula delgadas ramificaciones columnares. En relación a los registros electrofisiológicos 2 neuronas mostraron PIP_e , una PEP_e y en la otra no se observó actividad sináptica espontánea.

4.7.3 Neuronas on-off con procesos tangenciales solo en la lóbula

De las 9 neuronas identificadas 4 pertenecen a este grupo. La figura 21 muestra la reconstrucción de una de estas células. Esta morfología refleja estrechamente lo que se observó para el resto de las neuronas del grupo.

Estas interneuronas despliegan en un estrato basal de la lóbula neuritas tangenciales gruesas, las que presentan ramificaciones columnares delgadas que en algunos casos daban lugar a neuritas de mayor orden. El soma de la neurona se encuentra en la capa celular que se ubica en la parte inferior de la lóbula y se conecta a la neurita principal a través de un proceso delgado. Desde esta neurita principal, en dos preparados, se observó una neurita delgada que parece continuar hacia el protocerebro (línea punteada en el panel de la izquierda de la figura 21). Por otra parte, en 3 de los preparados se observaron parcialmente teñidos otros cuerpos celulares, lo que sugiere que estas neuronas on-off están acopladas eléctricamente con otras neuronas de la lóbula. En relación a los registros electrofisiológicos las 4 neuronas de este grupo mostraron PIP_e .

4.7.4 Neurona on-off columnar

Si bien de las 9 neuronas clasificadas solo una mostró la morfología que da lugar a esta categoría neuronal, su registro electrofisiológico fue estable y su tinción bien definida. La figura 22 muestra la reconstrucción de esta neurona.

La forma de esta neurona consiste en una neurita principal que se dispone columnarmente y arboriza en un estrato basal de la médula y en dos estratos de la lóbula. Si bien el soma no se pudo identificar con total certeza, un cuerpo celular aparece levemente teñido en la parte superior de la médula. Por otra parte, se observó levemente teñida una neurita tangencial gruesa de la lóbula. Esta neurita corre por el mismo estrato donde finalmente arboriza la neurona columnar. Esto sugiere que a este nivel la neurona columnar estaría comunicada eléctricamente con alguna neurona tangencial gruesa.

La baja proporción con que encontramos representada esta morfología neuronal estaría dada por la dificultad para penetrar estas células dado su pequeño calibre. En efecto, esto es lo que ocurre con las neuronas columnares en crayfish, las que si bien fueron caracterizadas a nivel histológico con técnicas de plata y de inmunohistoquímica, su fisiología no pudo aún ser estudiada sistemáticamente. (Strausfeld y Nassel, 1980; Wang-Bennet et al, 1989). En *Chasmagnathus* el registro electrofisiológico de esta neurona on-off columnar no mostraba actividad sináptica espontánea.

Capítulo 5

Resultados

Caracterización de neuronas detectoras de movimiento

5.1 Introducción

Para *Chasmagnathus*, al menos durante parte de su vida, las gaviotas y otras aves constituyen predadores importantes. En su hábitat, la aproximación de una gaviota provoca la respuesta de escape de los cangrejos. En el laboratorio se simula el ataque de este predador mediante la presentación de una figura que se desplaza por encima del animal (secciones 1.3 y 2.4). La característica más saliente de este estímulo visual de peligro (EVP) y lo que en definitiva dispara la respuesta de escape del cangrejo (RE), una respuesta direccional de evitación, es el movimiento de la figura.

En el capítulo anterior caracterizamos distintos grupos neuronales del lóbulo óptico de *Chasmagnathus* en base a su respuesta frente a un PL, es decir, ante un cambio estacionario y uniforme en la intensidad de la luz. Si bien este tipo de estímulo provoca la respuesta de diversos grupos neuronales, no provoca una respuesta comportamental evidente. En este capítulo estudiaremos interneuronas visuales especializadas en detectar estímulos de movimiento como el que se utiliza en el laboratorio para provocar la RE del cangrejo.

Registrando extracelularmente en el tracto protocerebral de crayfish, langostas y cangrejos, Wiersma y colaboradores estudiaron metódicamente fibras sensibles al movimiento (FSM). Estas fibras responden específicamente a objetos en movimiento (sección 1.5.5). Como características generales encontraron que: a) existe más de un tipo de FSM; b) tienen una respuesta fásica pobre o nula frente a cambios estacionarios en la intensidad lumínica como los generados por un PL; c) reducen su respuesta frente a la presentación repetida del estímulo de movimiento; y d) sólo en un grupo de fibras pudieron determinar que tuvieran preferencia por la dirección del movimiento. Posteriormente, Glantz propuso, en lo que constituye un antecedente importante de este trabajo, que un tipo de FSM (las *jittery movement fibers*), disparan el reflejo defensivo de despliegue lateral de las quelas frente a la presentación de un estímulo visual en movimiento (sección 1.6).

Los antecedentes en crayfish, junto a que el movimiento es la característica más saliente del estímulo visual que se utiliza en nuestro laboratorio para evocar la RE, marcan el interés por investigar en el cangrejo neuronas especializadas en responder al EVP. En efecto, tales neuronas constituirían excelentes candidatas para comenzar a investigar el sustrato neuronal que sirve a la RE de *Chasmagnathus* y, eventualmente, a su modificación por aprendizaje.

5.2 Caracterización fisiológica general de las neuronas detectoras de movimiento

En crayfish, las neuronas sustaining, dimming y pasivas presentan respuestas conspicuas frente a un PL. En cambio, su sensibilidad por el movimiento es pobre (Glantz y Bartels, 1994; Glantz et al., 1995; Glantz y McIsaac, 1998). De manera inversa, las FSM responden con mucha mayor intensidad a estímulos visuales en movimiento que a cambios generales de luminosidad (Wiersma et al., 1982). En *Chasmagnathus*, también encontramos neuronas que responden intensamente frente

a un estímulo visual en movimiento pero que prácticamente no responden frente a cambios estacionarios en la intensidad de luz (figura 23, las tres filas superiores). Utilizamos, entonces, esta clara respuesta diferencial como criterio para identificar fisiológicamente neuronas especializadas en responder al movimiento, a las que de aquí en adelante llamaremos neuronas detectoras de movimiento (NDM).

Otra diferencia importante entre las FSM y las neuronas sustaining y dimming fue destacada por Wiersma y colaboradores: la presentación repetida a intervalos cortos de tiempo del estímulo en movimiento produce una marcada reducción de la respuesta de las FSM mientras que el mismo tipo de estimulación no produce cambios en la respuesta de neuronas sustaining y dimming (Wiersma et al., 1982). En *Chasmagnathus* la presentación repetida del EVP cada 10 min no provoca cambios evidentes en la respuesta de las NDM (figura 24, filas superiores de a y b). En cambio, la presentación del EVP a intervalos cortos, menores a 3 min, produce una rápida reducción de la respuesta (figura 24, filas inferiores de a y b). Es oportuno destacar que, cuando la estimulación se realiza a baja frecuencia, la respuesta al EVP es sumamente consistente aún cuando la mayoría de los registros se extienden por más de una hora.

Los resultados presentados hasta aquí, obtenidos con registros intracelulares desde interneuronas del lóbulo óptico de *Chasmagnathus*, muestran una semejanza importante con los obtenidos con registros extracelulares desde el tracto protocerebral de crayfish. Por la importancia que tendrían estas interneuronas en transmitir información acerca de estímulos visuales en movimiento y habida cuenta de que en *Chasmagnathus* responden al mismo EVP que provoca la RE del animal, nos dedicamos a caracterizar la fisiología de las NDM del cangrejo.

5.3 Propiedades electrofisiológicas de las NDM de *Chasmagnathus*

Para comenzar a caracterizar la fisiología de las NDM analizamos la respuesta frente al EVP de 117 de estas interneuronas registradas en el lóbulo óptico de 81 cangrejos.

Gran parte de las NDM presentan actividad espontánea mientras que otras son completamente silentes. La respuesta general de las NDM al EVP consiste en un potencial excitatorio postsináptico sobre el que se montan los PAs. Sin embargo, en algunos registros el PEP se encuentra reducido o ausente. Como en la mayoría de las neuronas detectoras de movimiento estudiadas en vertebrados e invertebrados (Clifford e Ibbotson, 2002), la respuesta de las NDM del cangrejo muestra una clara adaptación mientras se presenta el estímulo en movimiento. En algunas NDM, sin embargo, esta adaptación es menos pronunciada, de modo que la respuesta celular continua aún cuando la estimulación con el EVP hubo finalizado (ej. neurona de la segunda fila de la figura 22).

El potencial de reposo promedio de las NDM es de $-56,6 \pm 0,91$ mV, dentro de un rango de potenciales que va desde -44 mV a -77 mV. El histograma de frecuencia de los potenciales de membrana, presenta una distribución de tipo

multimodal (figura 25). Este tipo de distribución sugiere que habría más de un subtipo celular con diferentes valores de potencial de membrana.

Los registros de distintas NDM presentan PAs de amplitudes diferentes. El histograma de frecuencia de amplitud de los PAs muestra que estos también tienen una distribución de tipo multimodal (figura 25). A partir de esta distribución se podría pensar que: a) los picos de la distribución de los PAs corresponden a distintos subtipos de NDM, o b) que un mismo tipo neuronal es registrado en distintos sitios celulares.

Como se ejemplifica en los registros de tres NDM de la figura 26, el tamaño de los PEP parece estar inversamente correlacionado con la amplitud de los PAs. Esto, apoyaría la segunda de las hipótesis recién planteadas. Un análisis de regresión confirma esta observación ($r=-0,4$; $p<0,001$; figura 26, panel inferior), es decir, que las diferencias en el tamaño de los PAs se deberían a que se registra el mismo tipo neuronal en distintos sitios celulares. De este modo, el primer trazo de la figura 26 correspondería a un sitio de registro celular cercano a la región dendrítica mientras que el tercero a uno cercano a la región axónica. Sin embargo, según el análisis de regresión, el tamaño de los PEP sólo puede dar cuenta del 16% ($r^2=0,16$) de la variabilidad observada en la amplitud de los PAs.

A partir, entonces, de la distribución multimodal de potenciales de reposo, la distribución de amplitudes de PAs y el análisis de la relación entre PEP y PAs, resulta parsimonioso inferir que registramos tanto el mismo tipo neuronal en distintos sitios celulares como neuronas pertenecientes a distintos subtipos de NDM.

5.3.1 Campo receptivo

La extensión y posición de los campos receptivos celulares sirvió a Wiersma y colaboradores para clasificar las distintas fibras dentro de cada subtipo de FSM (Wiersma et al., 1982).

En esta tesis investigamos exclusivamente NDM cuyo campo receptivo incluye a la región dorsal del cangrejo. Aquellas neuronas que sólo responden al movimiento alrededor o por debajo del ecuador del ojo no fueron incluidas en este trabajo.

Cabe advertir que la trayectoria acotada del EVP y su movimiento rotacional no conforman el estímulo más adecuado para definir con precisión la extensión del campo receptivo neuronal. A pesar de ello, en muchos casos se aprecian claras diferencias en los campos receptivos celulares. La figura 27 muestra la respuesta de distintas NDM frente al EVP desde donde se infieren diferencias de sus campos receptivos. Los trazos de la fila superior corresponden a células que responden en toda la trayectoria del estímulo. Las neuronas de la fila media, en cambio, responden a una región acotada de la trayectoria del estímulo. Estas neuronas responden a la región del espacio donde el EVP comienza y finaliza su trayectoria (posición 1) pero no a la región donde el EVP invierte su dirección (posición 2). Los registros de la fila inferior, en cambio, corresponden a células cuyas respuestas al EVP se limitan a la posición 2. Cabe aclarar que los ejemplos anteriores se

refieren a la región del campo visual demarcado por la trayectoria del EVP, por lo que es posible que el campo receptivo neuronal se extienda más allá de la región estimulada. Esto se verificó en la mayoría de los casos moviendo manualmente una pantalla en las distintas regiones del campo visual.

5.3.2 Sensibilidad por la dirección del movimiento

Muchas neuronas detectoras de movimiento descritas en vertebrados e invertebrados presentan preferencia por la dirección y el sentido en el que se mueve una imagen (Grzywacz et al., 1994; Newsome et al., 1989; Borst y Egelhaaf, 1989). El sentido preferido de movimiento es aquél que evoca la mayor respuesta excitatoria neuronal, mientras que el sentido nulo es el que produce la menor respuesta excitatoria o el mayor grado de inhibición neuronal. La mayoría de las NDM estudiadas en *Chasmagnathus* no muestran un sentido preferido de movimiento frente al EVP. Sin embargo, algunas NDM respondieron preferentemente al movimiento de la pantalla en sentido horario y otras al antihorario (figura 28). En algunas células, la dirección nula se encontró asociada con un componente hiperpolarizante en la respuesta (ej. registro inferior derecho).

El bajo número de NDM que registramos en el cangrejo con preferencia por el sentido de movimiento podría deberse a que el movimiento angular que despliega el EVP no es un buen estímulo para detectar esta preferencia o bien a que estas células carecen en general de dicha sensibilidad. De todas maneras, es oportuno recordar que los resultados de este trabajo se limitan a NDM cuyo campo receptivo incluye la región dorsal del campo visual. Observaciones preliminares, muestran que NDM con campos receptivos laterales o frontales tienen, en mayor proporción, preferencia por la dirección y el sentido del movimiento (Medan et al., 2004).

5.3.3 Sensibilidad por la intensidad de luz y el contraste

En la naturaleza el movimiento de un objeto, sea este una presa o un predador, tiene la misma importancia para un animal bajo una amplia variedad de condiciones lumínicas. Dicho de otro modo, los animales necesitan detectar estos estímulos en las condiciones soleadas del medio día como en la penumbra del ocaso. En relación a esto, se observa una característica que parece ser común a neuronas detectoras de movimiento de los animales en general: el movimiento evoca una respuesta relativamente independiente de la intensidad de luz del medio y del contraste entre el objeto en movimiento con el fondo (Wiersma et al., 1982). Las NDM de *Chasmagnathus* comparten esta característica: su respuesta frente al EVP es prácticamente constante para un amplio rango de intensidades lumínicas y niveles de contraste entre la pantalla y el fondo. En la figura 29 presentamos registros neuronales frente al EVP que reflejan esta constancia de la respuesta.

5.3.4 Integración multimodal

Wiersma y colaboradores, estudiando la integración de información de distintas modalidades sensoriales, encontraron que algunas fibras del tracto protocerebral de crayfish son sensibles tanto a estímulos visuales como a estímulos mecánicos (Wiersma y Yamaguchi, 1967a,b). En *Chasmagnathus* aproximadamente un 10% de las NDM responden cuando se toca suavemente con un pincel alguna parte del cuerpo del animal (figura 30).

Muchas de estas células responden cuando este estímulo se aplica en las patas ipsilaterales al sitio de registro, otras cuando el estímulo se aplica en las patas contralaterales y otras cuando se toca el cefalotórax del animal. Es decir, que en el cangrejo un porcentaje importante de neuronas visuales detectoras de movimiento responden a estímulos mecanosensoriales provenientes de campos receptivos específicos, o sea, son integradores multimodales.

5.3.5 Registro de más de un tipo de potencial de acción

En algunas pocas NDM registramos PAs de dos amplitudes diferentes (figura 31). La diferencia en la amplitud de los PAs es consistente y se mantiene constante por el tiempo que dura el registro de la célula. Dicha diferencia no constituye un artefacto de la frecuencia de digitalización del sistema de adquisición ya que la misma diferencia de amplitudes se observa en el osciloscopio analógico con el que se monitorean los experimentos. En estos casos, la respuesta frente al EVP se manifiesta como un incremento en la frecuencia de disparo de uno o ambos tamaños de PAs.

5.4 Ubicación y morfología de las NDM

Como se mencionó anteriormente la información sobre neuronas detectoras de movimiento en crustáceos había sido obtenida con registros extracelulares a nivel del tracto protocerebral de distintas especies. En consecuencia, hasta este trabajo existía un absoluto desconocimiento acerca de la ubicación y morfología de estas neuronas.

A partir de tinciones intracelulares identificamos la localización y morfología de NDM del cangrejo que respondieron al EVP. Cuarenta y nueve neuronas fueron inyectadas por al menos 15 min con dextrano rodamina, neurobiotina o, en la mayoría de los casos, con Lucifer yellow. Si bien no todas las tinciones permitieron realizar una reconstrucción neuronal detallada, en todos los casos las arborizaciones dentro del lóbulo óptico fueron localizadas únicamente en la lóbula y en el protocerebro lateral. La ilustración de la figura 32a muestra, desde una vista anterior, una reconstrucción en dos dimensiones de una NDM realizada a partir de secciones del lóbulo óptico de *Chasmagnathus*, dos de las cuales se muestran en 33b y 33c. En la lóbula, las neuronas tienen un árbol dendrítico formado por

neuritas que corren paralelas en el eje lateromedial del neuropilo. La mayoría de las células teñidas mostraron una organización dendrítica biestratificada, es decir, con sus dendritas dispuestas en dos de los estratos de la lóbula. Sobre la región medial del neuropilo las dendritas se originan desde un axón que desciende hacia el protocerebro lateral. La ubicación y distribución tangencial de las neuritas de las NDM es similar a la de neuronas colectoras detectoras de movimiento de la lóbula de insectos, las que recogen información sobre el movimiento proveniente de distintas columnas del mosaico retinotópico integrándola espacial y temporalmente (Krapp y Gabbiani, 2005).

En el protocerebro lateral las NDM presentan una arborización importante en tanto que el axón desciende por el neuropilo y proyecta por el tracto protocerebral hacia el ganglio supraesofágico. En las tinciones en las que se pudo identificar el soma ($n=23$), éste se ubica en la capa celular que se encuentra debajo de la lóbula y se vincula al axón por un proceso delgado que corre paralelo al borde proximal de este neuropilo. En las figura 32 (a, d y f) se muestran reconstrucciones hechas a partir de secciones seriadas anteriores (b y c), laterales (e) y dorsales (g) de distintos preparados del lóbulo óptico del cangrejo.

Algunas de las NDM tienen sus dendritas dispuestas en un solo estrato de la lóbula (figura 33). En este tipo de NDM, desde las gruesas neuritas tangenciales ramifican delgadas neuritas columnares. Este tipo de NDM monoestratificada la encontramos en 14 de los 49 preparados estudiados, las que presentaron una tinción intensa y bien definida.

En varias ocasiones encontramos preparados de neuronas mono y biestratificadas en los que, además de una NDM, estaba teñido más de un cuerpo celular. En algunos de los preparados los procesos neuronales correspondientes a estos cuerpos celulares también estaban parcialmente teñidos. Es posible entonces, que las NDM del cangrejo estén acopladas a otras neuronas a través de *gap junctions*.

Capítulo 6

Resultados

Neuronas detectoras de movimiento y comportamiento

6.1 Introducción

En el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria desde hace 20 años se estudia un aprendizaje visual asociativo en el cangrejo *Chasmagnathus*. Básicamente, el movimiento de una figura (el EVP) por encima del animal provoca en el cangrejo una respuesta defensiva de escape. Quince o más presentaciones del EVP a intervalos de tiempo espaciados provoca una reducción de la RE, la que persiste al menos por 72 hs. Distintas investigaciones muestran que la supresión de la RE está determinada por una asociación entre el EVP y el contexto de entrenamiento, por lo que se la denomina memoria contexto señal (MCS). Por otra parte, la presentación repetida del EVP a intervalos breves de tiempo provoca una rápida disminución de la RE. Sin embargo, la reducción de la RE como consecuencia de este entrenamiento masivo es de muy corta duración e independiente del contexto, por lo que se la denomina simplemente memoria señal (MS)(sección 1.3).

Estas investigaciones junto a un número importante de trabajos recientes en insectos y crustáceos muestran que los artrópodos son capaces de aprender, categorizar y memorizar distintos aspectos de la información visual (1.2.1). No obstante, no se han podido identificar aún las regiones cerebrales (y menos aún neuronas individuales) involucradas en estos procesos cognitivos. El único estudio que encontramos en artrópodos que relaciona la actividad de interneuronas visuales con un aprendizaje (elemental) fue realizado por Glantz (sección 1.6). Este encontró en crayfish que la respuesta de FSM (sección 1.5) ante la aproximación de una figura amenazante correlacionaba con la ejecución del reflejo defensivo de extensión de las quelas. En particular observó que: a) la actividad de estas fibras precedía en alrededor de 100 msec a la ejecución del reflejo; b) la presentación repetida del estímulo visual (1 a 4 Hz) producía una reducción de la actividad de las fibras que acompañaba la habituación del reflejo defensivo; c) la reducción de actividad de las fibras así como la habituación del reflejo defensivo era específica del área de la retina estimulada; y d) que tanto la actividad de las FSM como la comportamental se recuperaban espontáneamente luego de 5 min sin estimulación. A partir de estos resultados Glantz propuso que las FSM dispararían el reflejo defensivo de extensión de las quelas en crayfish. Cabe recordar, que la identificación de estas FSM era únicamente de carácter fisiológico.

Si bien, el aprendizaje visual estudiado en *Chasmagnathus* difiere sustancialmente de un aprendizaje elemental y de corta duración, los estudios en crayfish sobre la relación entre la respuesta de las FSM y el reflejo defensivo constituyeron un antecedente importante de esta tesis. Como describimos en el capítulo anterior, las NDM identificadas en el cangrejo responden intensamente al EVP que provoca la RE. En este capítulo estudiamos la respuesta de las NDM frente al EVP en relación con: la respuesta comportamental de escape, el aprendizaje y la memoria visual de *Chasmagnathus*. Para ello, comenzamos estudiando si los cangrejos son capaces de adquirir el aprendizaje visual bajo las condiciones experimentales de la preparación electrofisiológica.

6.2 El aprendizaje en las condiciones de la preparación experimental para registros neuronales

En los estudios con el crayfish ya mencionados, la respuesta conductual (actividad de un músculo involucrado en la extensión de las quelas) y la neuronal (tasa de disparo de PAs) frente al estímulo visual eran medidas al mismo tiempo en un animal fijo. De este modo, el área estimulada de la retina en los estudios conductuales y neuronales era exactamente la misma.

En nuestros estudios con *Chasmagnathus* existen diferencias importantes entre las condiciones en que se evalúa la respuesta comportamental y la respuesta neuronal. Si bien en ambas situaciones el EVP se presenta siempre desde una misma posición respecto a un sistema de referencia basado en claves externas al animal (sistema aloentróico), la estimulación respecto a un marco de referencia interno (sistema egocéntrico) varía en una y otra condición experimental. Cuando en el cangrejo se estudia la respuesta comportamental los animales están libres, lo que les permite modificar su posición en la arena experimental (actómetro). En estas condiciones, conforme los animales se mueven, la posición del EVP varía para un marco de referencia egocéntrico. En cambio, cuando se estudia la respuesta neuronal los animales, así como sus pedúnculos oculares, están fijos. En tales condiciones, cualquiera sea el marco de referencia que utilice el animal, la posición del EVP es siempre la misma. Además, en estas condiciones la inmovilidad de los ojos tiene como consecuencia un empobrecimiento de la estimulación visual ya que, frente a la estimulación repetida, el EVP se percibe siempre con la misma área de la retina.

Por otra parte, cuando se realizan los experimentos comportamentales (durante el entrenamiento) los animales pueden realizar sucesivos intentos de escape antes de suprimir esta respuesta frente al EVP. En cambio, en los experimentos electrofisiológicos, a pesar de que pueden mover sus patas, los animales están privados de dicha experiencia. Cabe entonces preguntarse si, en las condiciones de inmovilidad y sujeción en que se realizan los estudios electrofisiológicos es posible la formación de la MCS.

En relación a la inmovilidad de los animales, estudios previos demuestran que: a) la inmovilidad no afecta la adquisición del aprendizaje (Tomsic, 1993) y b) no es necesaria la ejecución de la RE durante el entrenamiento para que los animales desarrollen la MCS (Tomsic et al., 1991). En cuanto a la inmovilidad de los pedúnculos oculares, se observó que animales libres pero con sus pedúnculos fijos no tuvieron inconvenientes en ejecutar la RE frente al EVP y, en apariencia, tampoco en adquirir la MCS (Sztarker, 2000). No obstante, realizamos un experimento dirigido a estudiar si la ocurrencia simultánea de las distintas condiciones experimentales de inmovilidad y sujeción afectaban la formación de la MCS. Para ello se inmovilizó a 50 cangrejos del mismo modo que en la preparación electrofisiológica, fijándose también sus quelas y pedúnculos. En la parte dorsal del caparazón se les pegó un pequeño ojal de alambre que permitía enganchar al animal del extremo de una fina varilla vertical ubicada sobre el actómetro. De este modo, los animales quedaban suspendidos en el aire, a un par de centímetros del piso del

actómetro, sin posibilidades de modificar su posición en el mismo. Así, la posición del EVP (cualquiera sea el sistema de referencias utilizado) y el área estimulada de la retina fue la misma para cada cangrejo a lo largo de todo el entrenamiento. A la mitad de los animales se los asignó al grupo control y a la otra al grupo entrenamiento. Los animales entrenados recibieron 15 ensayos de estimulación con el EVP separados por 3 min mientras que los animales del grupo control permanecieron (también suspendidos) en los actómetros por el tiempo que duró el entrenamiento, pero sin ser estimulados con el EVP. Después del entrenamiento se les quitó la banda que fijaba sus quelas y se los guardó en recipientes individuales. Un día después fueron colocados nuevamente en el actómetro para evaluar la MCS. En esta fase no se los sujetó por el ojal de modo que pudieran desplazarse libremente por el actómetro y así poder registrar su respuesta locomotora. Después de 10 min de adaptación se les presentó el EVP. Los animales previamente entrenados presentaron la clásica reducción en la RE respecto de los animales controles, la que sirve como criterio para determinar la formación de la MCS (grupo entrenamiento vs. grupo control, *t*-test: $p=0,029$, $n=25$). Es decir, que los cangrejos son capaces de adquirir la MCS (aprender) bajo las condiciones de sujeción e inmovilidad a la que están sometidos durante registros electrofisiológicos.

6.3 Respuesta comportamental y NDM

6.3.1 Respuestas periestímulo

Para comenzar a investigar la posible participación de las NDM en la RE del cangrejo estudiamos la relación entre la respuesta neuronal y comportamental durante un ensayo de estimulación con el EVP. Como en los estudios comportamentales clásicos cada ensayo de estimulación consta de dos presentaciones del EVP separadas por 2 segundos (secciones 2.4 y 2.7). A modo de ejemplo, en la figura 34 se ilustra el registro de la RE de un cangrejo y el registro de la respuesta de una NDM durante un ensayo de estimulación. Las espigas de voltaje originadas en la transducción de la actividad locomotora y los PAs que ocurren durante el ensayo de estimulación con el EVP son los eventos considerados para construir el histograma periestímulo de la figura 35 (medimos la respuesta electrofisiológica de 40 NDM en 40 cangrejos distintos y la respuesta comportamental de 40 cangrejos, bin=20 ms). Como se observa en este histograma, el perfil de disparo de PAs de las NDM refleja el perfil de la RE. En efecto, el análisis de correlación confirma que ambas respuestas están significativamente correlacionadas (índice de correlación=0,91; la probabilidad de que la correlación fuera espuria se analizó por un método tipo Montecarlo, $p < 0,001$) y que la respuesta neuronal anticipa la respuesta comportamental en 80-120 mseg aproximadamente. Por lo tanto, del perfil de respuesta de las NDM es posible predecir el perfil de la respuesta comportamental de escape frente al mismo estímulo. En otras palabras las NDM no sólo responden al mismo estímulo visual que provoca la RE sino que, además, su actividad parece estar estrechamente relacionada a la efectiva ejecución de esta respuesta.

6.3.2 Respuesta de las NDM durante la fase de adquisición y de retención a corto término de la MCS

Para estudiar la respuesta neuronal en relación con la respuesta comportamental utilizamos un protocolo clásico de entrenamiento seguido de un ensayo de evaluación a corto término de la MCS. Así, pudimos registrar la respuesta de una misma NDM durante el entrenamiento y en la fase de evaluación de la memoria en el tiempo que dura el protocolo (1 h y 10 min). En éste y en los experimentos siguientes, el entrenamiento se inició después de 10 min de penetrada la neurona, tiempo en que el animal permaneció sin ser perturbado. El entrenamiento consistió en 15 ensayos de estimulación con el EVP separados por un intervalo (entre ensayos) de 3 min. El ensayo de retención se realizó 15 min después de finalizado el entrenamiento.

Tanto en los experimentos comportamentales como en los electrofisiológicos los animales nunca fueron estimulados previamente con el EVP. La respuesta neuronal (número de PAs) y la RE (número de picos de voltaje) fueron normalizadas al valor de la respuesta obtenida para el primer ensayo del

entrenamiento de cada sujeto. Los cambios en las respuestas comportamentales y neuronales debidos al entrenamiento quedan expresados entonces en términos de porcentaje y resultan comparables.

Los resultados obtenidos (figura 36) muestran que la respuesta de las NDM refleja la respuesta comportamental para a) la adquisición del aprendizaje (el entrenamiento) y b) la MCS evaluada a corto término. En la primer instancia la respuesta de las NDM refleja estrechamente la tasa de cambio de la RE y en la segunda el nivel de retención del aprendizaje adquirido.

A pesar de que no se observaron indicios que sugieran un deterioro neuronal durante el experimento, como cambios en el potencial de membrana o en la amplitud de los PAs, para confirmar que la reducción en la respuesta celular es consecuencia del entrenamiento incluimos un grupo experimental no entrenado. El grupo control (símbolo estrella de la figura 36) recibió el primer ensayo de estimulación y recién después de 1 h un segundo ensayo. No se observaron diferencias en la respuesta para estos dos ensayos. Esto confirma que la reducción en la respuesta de las NDM es consecuencia de la estimulación repetida con el EVP.

Por otra parte, la reducción en la actividad de las NDM no parece ser consecuencia de una reducción generalizada de la actividad neuronal. La respuesta frente a un cambio estacionario en la intensidad lumínica (un PL) no mostró cambios evidentes entre antes y después del entrenamiento. Es decir, que la modificación en la respuesta de las NDM sería, en buena medida, específica para el EVP.

6.3.3 Respuesta de las NDM durante la fase de adquisición y de retención a corto término de la MS

A nivel comportamental un entrenamiento espaciado produce una reducción lenta de la RE frente al EVP que se mantiene al menos por 24 hs. En cambio, un protocolo masivo produce una reducción rápida y profunda de la RE durante el entrenamiento que, sin embargo, se recupera totalmente a los 15 min. A partir de estas diferencias comportamentales nos propusimos estudiar la dinámica de la respuesta neuronal pero ahora para un entrenamiento masivo.

Encontramos que la dinámica de la respuesta neuronal refleja estrechamente el perfil de la respuesta comportamental. Es decir, una rápida y profunda reducción de la respuesta durante el entrenamiento y una recuperación casi total de la actividad para el ensayo de retención (figura 37). También para el protocolo masivo la modificación en la respuesta de las NDM sería específica para el EVP, ya que tampoco observamos cambios en la respuesta neuronal frente a un PL como consecuencia del entrenamiento.

6.3.4 Respuesta de las NDM en la MCS de largo término

Como el entrenamiento espaciado produce una MCS que persiste por varios días, decidimos estudiar si el cambio provocado por el entrenamiento en la respuesta neuronal persistía aún después de 24 hs de terminado el mismo.

Dada la estabilidad y viabilidad de la preparación experimental, en los experimentos anteriores pudimos estudiar la respuesta de una misma célula mientras ocurre el aprendizaje y la memoria de corto término. Aquí, para poder estudiar la memoria de largo término realizamos primero una sesión de entrenamiento dentro del dispositivo de registro (día 1) y 24 hs después evaluamos la respuesta de las NDM frente al EVP (día 2). Antes del entrenamiento sujetamos al cangrejo y fijamos sus quelas y pedúnculos de modo idéntico a cuando realizamos registros electrofisiológicos. Una vez dentro del dispositivo de registro a cada animal se le asignó aleatoriamente un tratamiento: control o entrenamiento (día 1). Los animales control permanecieron en el dispositivo de registro sin ser estimulados mientras que a los del grupo entrenamiento se les aplicó un protocolo espaciado. Un día después (día 2), se los volvió a colocar en el dispositivo de registro para, ahora, registrar la respuesta de una única NDM por animal frente al primer ensayo de estimulación (en este día) con el EVP. Cabe notar que en este experimento no es posible normalizar la respuesta neuronal. Como la variabilidad en la tasa de disparo de PAs entre las NDM es alta, el n necesario para poder estudiar diferencias absolutas debió ser grande. El experimento se realizó a doble ciego, es decir, que el investigador desconocía el grupo al que pertenecía el cangrejo al momento de asignar el protocolo de entrenamiento (lo asignaba un tercero sin saber que protocolo aplicaba) y al momento de realizar y posteriormente analizar los registros electrofisiológicos

En la figura 38 se grafica la respuesta neuronal al EVP (día 2) de los dos grupos experimentales como así también la respuesta comportamental clásica que se obtiene cuando se evalúa la MCS. A primera vista se puede observar que el entrenamiento afecta de modo similar a la respuesta neuronal y a la comportamental 24 hs después de terminado el mismo. En particular, se verifica una reducción en la respuesta de NDM de animales que previamente fueron entrenados con el EVP respecto de animales control (grupo entrenado: $87,74 \pm 9,4$ PAs, $n=50$ NDM de 50 cangrejos; grupo control: $118 \pm 10,6$ PAs, $n=46$ NDM de 46 cangrejos; t -test de dos colas, $p<0,05$). Entonces, también la memoria de largo término expresada como la reducción en la RE se corresponde con una reducción en la respuesta de las NDM al EVP.

Los experimentos realizados hasta aquí muestran que la respuesta de las NDM al EVP: a) anticipa y correlaciona con la respuesta comportamental de escape durante la presentación del EVP (figura 35); b) refleja la tasa de adquisición para un entrenamiento espaciado y para un entrenamiento masivo (figuras 36 y 37); c) refleja los niveles de retención a corto término de la memoria para un protocolo espaciado y para otro masivo (figuras 36 y 37); y d) refleja la MCS aún 24 hs después de terminado el entrenamiento (figura 38).

A partir de este cuerpo de resultados resulta parsimonioso concluir que las NDM participan de manera importante en la adquisición y almacenamiento de la memoria visual que estudiamos en *Chasmagnathus*. Sin embargo, es posible que los cambios observados en la respuesta de las NDM estén determinados por modificaciones ocurridas en neuronas presináptica. Entonces, intentamos estudiar si los cambios en las NDM son consecuencia de modificaciones biofísicas que ocurren efectivamente en estas mismas neuronas o son el resultado de modificaciones plásticas que ocurren en neuronas presinápticas.

6.4 Análisis de la reducción en la respuesta de las NDM

6.4.1 Modificaciones biofísicas

En el molusco *Hermisenda* y en la corteza cerebral de conejos se demostró que el aprendizaje induce cambios biofísicos en neuronas identificadas (ej. Schreurs et al., 1998; Alkon, 1980). Estas se manifiestan como cambios en el potencial de reposo y en la conductancia de la membrana que tienden a modificar la excitabilidad general de la célula (Alkon et al., 1982). En *Chasmagnathus* no encontramos cambios en el potencial de reposo de las NDM durante un entrenamiento espaciado (ensayo 1, $-63,4 \pm 3$ mV; ensayo 15, $-63,8 \pm 3,3$ mV; $n=12$) ni durante un entrenamiento masivo (ensayo 1, $-62,8 \pm 2,8$ mV; ensayo 15, $-60,4 \pm 2,3$ mV; $n=10$). Al evaluar la MCS de largo término tampoco observamos diferencias en el potencial de reposo entre neuronas del grupo control y neuronas del grupo entrenado (grupo control: $-58,58 \pm 0,96$ mV, $n=46$; grupo entrenado: $-59,99 \pm 0,99$ mV, $n=50$) ni diferencias en la frecuencia espontánea de disparo de PAs (grupo control: $3,61 \pm 0,46$ PAs, $n=46$; grupo entrenado: $4,24 \pm 0,57$ PAs, $n=50$; la actividad espontánea fue medida por 3 min inmediatamente antes del ensayo de estimulación).

Para evaluar si en las NDM ocurren cambios de su excitabilidad general, durante el entrenamiento aplicamos a través del electrodo de registro un pulso de corriente depolarizante antes de cada ensayo de estimulación (figura 39). Si bien la respuesta neuronal frente al EVP mostró el mismo perfil de reducción que se describió anteriormente, tanto para un entrenamiento espaciado como para uno masivo, el número de PAs provocados por el pulso de corriente se mantuvo constante en ambos tipos de entrenamiento (figura 39, paneles inferiores). Este resultado indica que, a diferencia de lo que ocurre en *Hermisenda* y en conejos, la reducción en la respuesta provocada por el entrenamiento no sería causada por una modificación general de la excitabilidad neuronal.

En vista de estos resultados, la reducción en la respuesta de las NDM frente al EVP podría explicarse porque: a) en las mismas NDM efectivamente ocurren cambios biofísicos pero en dominios locales distantes al sitio de registro (por ello no detectables con el microelectrodo (Borst y Haag, 2002); b) la reducción observada en la respuesta de las NDM es consecuencia de modificaciones en la respuesta al EVP de neuronas presinápticas; o bien c) la reducción en la respuesta de las NDM se debe a una desensibilización específica al EVP en la respuesta de muchas o la mayoría de las interneuronas visuales de los neuropilos ópticos (las características de la estimulación con el PL no permiten descartar esta última posibilidad).

Para investigar estas hipótesis realizamos los experimentos que se describen a continuación.

6.4.2 Respuesta de otras interneuronas visuales durante el aprendizaje

En el cangrejo no sabemos cuales son las neuronas directamente presinápticas a las NDM, no obstante es probable que estas últimas reciban mayormente información retinotópica de interneuronas visuales que proyectan desde la médula (Sinakevitch et al., 2003; Sztarker et al., 2005). Por ello, estudiamos la respuesta a un entrenamiento masivo en diferentes interneuronas visuales de la médula, es decir, neuronas que aún sin saber si son presinápticas a las NDM se encuentran río arriba de las NDM en el sistema visual. En particular, estudiamos las interneuronas Tan, dimming, sustaining y on-off. Como se describió en el capítulo 3, las neuronas Tan se ubican en la lámina y en la médula; las neuronas dimming y sustaining son neuronas tangenciales de la médula que, como las NDM, proyectan hacia el ganglio supraesofágico; mientras que las neuronas on-off comprenden a neuronas tangenciales de la médula y la lóbula que arborizan en la misma región donde las NDM tienen sus dendritas. Como se ilustró en la figura 23, si bien la respuesta de estas interneuronas frente al EVP es menos conspicua que frente a un PL, es en todos los casos consistente y fácilmente medible (figura 40, notar las diferencias de escala).

A diferencia de lo que ocurre con las NDM el entrenamiento masivo no produjo modificaciones evidentes en la respuesta del resto de las interneuronas estudiadas (figuras 40 y 41). Este resultado no permite descartar que en eventuales neuronas presinápticas a las NDM, distintas de las aquí estudiadas, ocurran cambios en respuesta al EVP durante el entrenamiento. Sin embargo, el resultado es contundente en cuanto a que la reducción en la actividad de las NDM durante el entrenamiento no es consecuencia de una disminución generalizada en la respuesta de las interneuronas visuales de los neuropilos ópticos. Entonces, esta reducción sería específica de cuanto menos uno de los canales involucrados en el procesamiento de la información visual, el canal que procesa movimiento y que contiene a las NDM. Este resultado permite descartar la hipótesis c) planteada en la sección anterior. Para continuar investigando la hipótesis b) y comenzar a estudiar la a), realizamos el análisis que se describe a continuación.

6.4.3 Relación entre el potencial excitatorio postsináptico y los potenciales de acción evocados

En esta sección analizaremos otra medida de la excitabilidad neuronal, la relación entre la entrada y la salida neuronal, a la que denominamos relación de transferencia. Como medida fisiológica de la señal de entrada neuronal tomamos la magnitud del PEP provocado por la estimulación con el EVP. Este potencial constituye, en definitiva, una medida de la estimulación efectiva que el conjunto de neuronas directamente presinápticas logra provocar sobre la neurona postsináptica. Como medida de la señal de salida neuronal tomamos el número de PAs evocados por la estimulación con el EVP. Bajo el supuesto de que no existen procesos inhibitorios determinantes que reduzcan la probabilidad de disparo de la neurona

durante el entrenamiento, la intensidad de la salida neuronal se relaciona de manera directa (aunque no lineal) con la intensidad de la señal excitatoria de entrada. Así, la reducción en el número de PAs evocados para idénticos valores de PEP (es decir, una disminución de la salida neuronal sin cambios en su entrada) constituiría una modificación de la función de transferencia de la neurona y por lo tanto una evidencia fuerte en favor de que las NDM constituyen efectivamente un sitio de plasticidad neuronal.

Las ventajas que tiene este análisis es que como medida de la entrada neuronal I) se utiliza una respuesta evocada por el mismo estímulo visual que induce el aprendizaje, por lo que los circuitos neuronales que se activan son los fisiológicos; II) se estudia la estimulación fisiológica que provocan las neuronas directamente presinápticas; III) el recorrido de la señal eléctrica en la neurona estudiada coincide exactamente con aquellos dominios celulares (postsinapsis, ramas del árbol dendrítico, etc.) efectivamente estimulados por la presentación del estímulo visual.

6.4.3.1 Relación entrada-salida en la adquisición de la MS

Para estudiar entonces si las NDM constituyen un sitio de plasticidad neuronal, analizamos a lo largo del entrenamiento la relación entre los PEP y los PAs evocados durante los ensayos de estimulación con el EVP. La figura 42 ilustra la magnitud de los PEP y el número de PAs para un entrenamiento masivo (las variables están normalizadas a la respuesta neuronal en el primer ensayo).

Como se puede observar en esta figura un entrenamiento masivo produce una disminución en la señal de entrada de las NDM que se ajusta estrechamente a su respuesta de salida. En este caso, la disminución en la entrada es suficiente para explicar la reducción de la salida neuronal sin que necesariamente medien cambios en la función de transferencia de las NDM durante el entrenamiento.

6.4.3.2 Relación entrada-salida en la adquisición de la MCS

En la figura 43 se ilustra el área de los PEP y el número de PAs para un entrenamiento espaciado. Aquí, se produce una disminución en la entrada que parece tener dos fases: una de caída rápida (hasta el ensayo 3, inclusive) y otra asintótica (del 3 al 15). En efecto, en esta última fase no observamos diferencias significativas entre el ensayo 3 y el 15 (t -test pareado, PEP ensayo 3 vs. PEP ensayo 15, $p > 0,3$, $n=10$). Sin embargo, en esta última fase la salida disminuye significativamente (t -test pareado, PAs ensayo 3 vs. PAs ensayo 15, $p < 0,01$, $n=10$). Esta modificación en la salida neuronal sin cambios en la entrada sugiere que durante un entrenamiento espaciado ocurrirían cambios en la función de transferencia de las NDM. Sin embargo, este resultado no es concluyente ya que, aún sin ser estadísticamente significativa, la curva de entrada muestra una tendencia decreciente. Habida cuenta de que la función que vincula la entrada con la salida

neuronal no es lineal, la leve disminución de la entrada ocurrida a lo largo de los ensayos podría explicar no obstante la disminución de la salida neuronal.

6.4.3.3 Relación entrada-salida en la MCS de largo término

Dado que existen abultadas evidencias acerca de que los mecanismos de plasticidad neuronal que operan a corto y largo término son diferentes (ej. Bourtchouladze et al., 1994; Byrne y Kandel, 1996; Abel et al., 1997), analizamos la relación entrada salida de las NDM cuando la MCS ya se hubo consolidado (experimento de la sección 6.3.4). El nuevo análisis de la respuesta de las NDM muestra que 1 día después del entrenamiento la entrada neuronal es idéntica para neuronas del grupo control y para neuronas del grupo entrenado (figura 44; *t*-test de dos colas, PEP control vs. PEP entrenado, $p=0,98$, $n=30$ para cada grupo experimental). Contrastantemente, la salida neuronal es significativamente diferente (*t*-test de dos colas, PAs control vs. PAs entrenado, $p<0,05$, $n=30$ para cada grupo). Estos resultados indicarían que al momento de evaluar la MCS de largo término existe una modificación de la función de transferencia de las NDM de *Chasmagnatus* como consecuencia del entrenamiento con el EVP.

Capítulo 7

Discusión

7.1 Distinción entre plasticidad sináptica y memoria

El aprendizaje, tiene lugar como resultado de modificaciones en las propiedades de conductividad y conectividad que ocurren a nivel de neuronas individuales. Claramente, algunas modificaciones de este tipo pueden simularse y estudiarse en neuronas expuestas a condiciones reducidas, a la vez que inducirse con procedimientos no fisiológicos. Ejemplos de esto son los abundantes estudios llevados a cabo en rodajas de cerebro o en neuronas en cultivo. En estos casos, la estimulación con trenes masivos de descargas eléctricas inducen modificaciones generalizadas de la eficiencia sináptica conocidas como potenciaciones y depresiones de largo término (por LTP y LTD respectivamente).

Sin embargo, los sistemas cerebrales operan almacenando un número gigantesco de complicados “recuerdos”, cada uno de los cuales contiene un elevadísimo número de bits de información. La información almacenada en un cerebro, difícilmente pueda entonces estar codificada a partir de cambios monotónicos similares que ocurran simultáneamente en un número muy alto de sinapsis, ocurran éstos en una misma o en diferentes neuronas. De funcionar así, estos sistemas presentarían límites de saturación inferiores a los que en realidad poseen. Teniendo en cuenta la altísima complejidad de las redes neuronales cerebrales, aún a nivel de microcircuitos de neuronas, es más factible que un determinado recuerdo resulte de un delicado rearrreglo de múltiples sinapsis, algunas de las cuales se harían más efectivas mientras que otras verían disminuida su capacidad de comunicación. Este último panorama, de ser correcto, aleja la posibilidad de estudiar la formación de la memoria de manera realista en preparaciones donde los cambios sinápticos se obtienen de manera masiva y muy poco discriminada.

Por otra parte, si bien se sustenta en modificaciones que ocurren en las neuronas individuales, la construcción de un recuerdo inevitablemente ocurre en un ser que debe estar vivo. En el organismo vivo e intacto, las neuronas individuales se hallan en un contexto sustancialmente distinto al de las condiciones que imponen las preparaciones reducidas. Basta solamente repasar los conocidos y radicales efectos de modificaciones en el comportamiento de las redes neuronales en presencia de diferentes niveles y combinaciones de hormonas circulantes (ej. Marder y Thirumalai, 2002). En el ser vivo, la posibilidad de formación de recuerdos es sensible a innumerables factores como pueden ser la fatiga, el estado emocional, etc., los que fisiológicamente llevan aparejados modificaciones de las hormonas circulantes. En este sentido, los cambios de funcionalidad neuronal que puedan inducirse en condiciones de extrema reducción como son las preparaciones de rebanadas de cerebro, difícilmente resulten homologables a aquéllos que son inducidos cuando el animal se encuentra aprendiendo.

También es importante señalar que las capacidades mnésicas de los seres vivos están relacionadas con las necesidades de aprendizaje de su entorno natural. Dicho de otro modo, los animales no están capacitados para aprender cualquier cosa sino aquello que les resulta biológicamente relevante. En este sentido, un modelo

ideal para el estudio de la memoria debería contemplar la relevancia biológica del aprendizaje en estudio.

Por todo esto, es fácil entender que para investigar los cambios que ocurren en las neuronas individuales como resultado del aprendizaje y la memoria, es deseable contar con modelos experimentales que permitan estudiar los cambios de funcionamiento neuronal en el animal vivo, generados por entrenamientos con estímulos naturales. Este ha sido uno de los propósitos del presente trabajo de tesis.

7.2 El modelo del cangrejo para estudios neurofisiológicos

Estudios en artrópodos han permitido descubrir numerosos principios fundamentales del funcionamiento del sistema nervioso (sección 1.2). No obstante, las preparaciones experimentales en artrópodos que se utilizan para estudiar la fisiología del sistema nervioso con registros electrofisiológicos (aún cuando se las denomina preparaciones semi intactas) son en general demasiado cruentas para estudiar fenómenos relacionados al aprendizaje. En crayfish para mantener viable la preparación es necesario enfriar a los animales, cambiar completamente su sangre por solución salina y perfundirlos continuamente (ej. Glantz, 1996). En la mosca (del género *Calliphora* o *Musca*), donde se estudian con intensidad los mecanismos de la detección visual de movimientos, se quitan los sacos aéreos, las traquea, el esófago, algunas glándulas y la proboscis; además, la incisión que se realiza deja al descubierto prácticamente la totalidad de lo que queda de la cabeza del animal y parte del abdomen (ej. Douglass y Strausfeld, 1995; Warzecha y Egelhaaf, 2000; Farrow et al., 2005). En este sentido, las características de las preparaciones experimentales en abejas, polillas, langostas y otros insectos, son similares a las de la mosca (Hammer, 1993; Christensen et al., 2003; Gabbiani et al., 2002).

En *Chasmagnathus*, para registrar intracelularmente neuronas del lóbulo óptico sólo se requiere realizar un pequeño orificio en la cutícula del pedúnculo. En los crustáceos la membrana de tejido conectivo que recubre el lóbulo óptico se encuentra reducida, por lo que a diferencia de otras preparaciones no es necesario utilizar enzimas digestivas ni continuar disecando el sistema nervioso para poder acceder con el electrodo de registro a las neuronas. Así, se pueden realizar registros intracelulares en el animal prácticamente intacto. Además, no es necesario anestesiarse o enfriar a los animales para lograr registros intracelulares estables, de modo tal que durante los registros el cangrejo se encuentra en estado alerta. La preparación se realiza de manera sencilla y rápida (aproximadamente 15 min), lo que constituye una ventaja práctica frente a otras preparaciones. Por otra parte, una vez finalizada la sesión de registro los animales siguen saludables por el tiempo que permanecen en el laboratorio sin que se observen diferencias comportamentales evidentes en relación a animales no tratados.

Una característica destacable de la preparación en *Chasmagnathus* es la estabilidad que alcanzan los registros electrofisiológicos intracelulares. La dureza del exoesqueleto del cangrejo permite sujetar firmemente al animal sin causarle daño. La estabilidad mecánica de la preparación permite, en muchos casos, que los

registros sean estables aún cuando el cangrejo mueve libremente sus patas caminadoras. El tiempo promedio de registro va desde 15 min a más 2 hs según el tipo celular estudiado. Estos tiempos son mucho mayores que los que se alcanzan en otras preparaciones semintactas (en la mosca de 3 a 45 min, Haag et al., 1997; Gauck y Borst, 1999).

Otra característica importante de la preparación en *Chasmagnathus* es su tolerancia. Este cangrejo resiste muy bien la manipulación experimental, aún estando expuesto al aire, por lo que no se hace necesario mantenerlo sumergido en agua salobre o suplir su sistema circulatorio. Esto no sólo simplifica la preparación sino que asegura una normal irrigación de los tejidos al tiempo que mantiene su sistema neuroendócrino íntegro y funcional. La resistencia a la manipulación experimental tendría su origen en que *Chasmagnathus* es un cangrejo eurihalino semiterrestre que vive en estuarios, por lo que está adaptado a regular constantemente su medio interno frente condiciones ambientales cambiantes que incluyen desenvolverse en agua de distintas salinidades y pasar varias horas del día al aire libre en condiciones de sequedad.

En resumen, el conjunto de condiciones descriptas ha permitido obtener los primeros registros electrofisiológicos intracelulares adquiridos durante un aprendizaje generado por un estímulo casi natural en un animal vivo, intacto y no anestesiado. Por esto, decimos que el cangrejo, habida cuenta de su bien probada capacidad mnésica, ofrece aspectos originales y ventajosos para el estudio de las bases celulares de la memoria con técnicas electrofisiológicas.

Si bien este trabajo de tesis estuvo dirigido a realizar estudios sobre los procesos de aprendizaje y memoria, el tipo de investigación que nos propusimos implicó necesariamente un desarrollo muy importante de aspectos descriptivos del procesamiento de la información visual en el cangrejo, no vinculados directamente con procesos mnésicos. Los datos aportados aquí sobre estos aspectos son en sí mismos de mucho interés, por lo que serán discutidos antes de avanzar sobre aquellos directamente relacionados con la memoria.

7.3 Visión en crustáceos

Los decápodos (Crustacea, Malacostraca) poseen un sistema visual muy desarrollado y despliegan sofisticados comportamientos guiados por la visión (ej. Hemmi y Zeil, 2003a,b; Zeil et al., 1989). La búsqueda y elección de refugios, la comunicación social y las respuestas antipredatorias son algunos de los comportamientos visuales estudiados en crustáceos. Sin embargo, la fisiología de la visión en este gran grupo de animales prácticamente no ha sido estudiada. Como mencionamos en la introducción, los trabajos que existen se concentran en torno a la estructura de los ojos compuestos y al análisis bioquímico de pigmentos fotosensibles en relación a la visión de color en estomatópodos (ej. Nilsson, 2004; Mazel et al., 2004). Los estudios realizados fundamentalmente en crayfish por Wiersma, Glantz y colaboradores (citados a lo largo de este trabajo) constituyen los únicos antecedentes que se tienen sobre las fisiología de interneuronas del sistema

visual en este grupo de animales. Sin embargo, la mayor parte de estos estudios se realizaron utilizando técnicas extracelulares. Por lo tanto, con excepción de los trabajos de Glantz en crayfish (sección 1.5.3 y 1.5.4), el presente trabajo de tesis constituye la primer investigación con registros intracelulares de la fisiología de interneuronas visuales de crustáceos, aportando la primer descripción de la ubicación y morfología de neuronas detectoras de movimiento en estos animales.

7.4 Interneuronas visuales de la lámina y de la médula

La clasificación de neuronas de la lámina y de la médula del cangrejo que adoptamos en el presente trabajo se hizo tomando como referencia los estudios previos sobre la fisiología y morfología de neuronas de estos neuropilos en crayfish (Kirk et al., 1982ab, 1983; Waldrop y Glantz 1985; Wang-Bennett y Glantz 1987ab; Pfeiffer y Glantz 1989, 1991). A pesar de las diferencias experimentales entre una y otra preparación, distintos tipos neuronales descritos en crayfish resultaron claramente identificables en *Chasmagnathus*. La identificación se realizó en base a criterios fisiológicos (perfil de respuesta a un pulso de luz) y morfológico (tinciones intracelulares). De este modo, se reconocieron en el cangrejo las neuronas Tan, las neuronas sustaining y las neuronas dimming descritas en crayfish.

Por otra parte, se identificaron fisiológica y morfológicamente otros tipos de neurona nunca antes descritas en crustáceos, como los diversos tipos de neuronas on-off. La figura 45 sintetiza el conocimiento actual sobre los distintos tipos neuronales de los neuropilos ópticos de crustáceos en base a los resultados obtenidos en esta tesis. Cabe aclarar, sin embargo, que el esquema contiene solamente a las neuronas que por su tamaño han podido ser registradas y teñidas intracelularmente. Estas neuronas, de acuerdo a lo que se observa con tinciones de plata reducida (Bodian) o impregnación selectiva (Golgi), representan tan sólo una mínima proporción de la gran variedad de tipos neuronales existentes en estos neuropilos (Sztarker et al., 2005).

7.5 Análisis comparativo de la visión en crustáceos

Hasta el presente trabajo la identificación fisiológica y morfológica de neuronas en el sistema visual de crustáceos se restringía a unos pocos tipos neuronales en la lámina y médula de una única especie, el crayfish *Procambarus clarkii*. La reactividad frente a estímulos visuales que muestran los cangrejos semiterrestres como *Chasmagnathus* es mucho mayor que la que despliegan animales como el crayfish. Estos últimos, son solitarios y pasan su vida sumergidos en aguas poco claras, donde la visión aguda no resulta de gran utilidad. Por el contrario, los cangrejos semiterrestres suelen vivir en comunidades numerosas y pasan largos períodos fuera del agua, en donde el sentido visual les es de gran utilidad para establecer comunicaciones intraespecíficas, detectar predadores, reconocer la ubicación de refugios, etc. En el marco de la fisiología y la anatomía

comparada vale preguntarse si la mayor capacidad visual del cangrejo respecto del crayfish resulta de la adquisición de nuevos elementos neurales en el sistema visual, o simplemente de un aumento en el número de los mismos elementos evolutivamente conservados entre las especies.

En los primeros dos neuropilos del cangrejo hallamos neuronas que, tanto por su respuesta a estímulos visuales como por su ubicación y morfología, resultaron fácilmente identificables con las Tan, sustaining y dimming de los crayfish. Este resultado podría interpretarse en términos de que las mayores capacidades visuales del cangrejo no resultan de la adquisición de nuevos elementos neurales, sino simplemente de un aumento en el número de estos elementos. Sin embargo, es importante considerar que en los dos primeros neuropilos se ejecutan funciones de procesamiento visual de orden relativamente elemental, entre las que se encuentran la medición de la intensidad general de luminosidad, la detección elemental de movimientos, etc. Estas funciones son inherentes al procesamiento visual aún en sistemas primitivos (Laughlin, 1981). Así, no resulta sorprendente que los elementos neurales de estos primeros neuropilos se encuentren conservados entre distintos grupos de crustáceos e incluso de insectos (Strausfeld, 1998). No obstante, las presiones de selección que impone la comunicación social y la detección de predadores a través de claves visuales, deben determinar en los cangrejos la existencia de filtros neurales de “reconocimiento” (*matching filters*, Clifford e Ibbotson, 2002) diferentes de aquellos que necesitan los crayfish. De acuerdo con esto, conjeturamos que las semejanzas que encontramos entre el cangrejo y el crayfish en relación a los componentes neurales de la lámina y la médula, no se mantendrían en la lóbula. En este último neuropilo se encontrarían elementos neurales divergentes, que actuarían como filtros de reconocimiento específicos de cada especie.

7.6 Neuronas detectoras de movimiento

La respuesta de las NDM aquí descrita se corresponde en muchos aspectos con la respuesta de fibras sensibles al movimiento estudiadas con registros extracelulares en distintas especies de decápodos. Estos aspectos incluyen: una respuesta preferencial por estímulos visuales en movimiento respecto a cambios generales en la intensidad de luz; la adaptación durante la presentación del estímulo de movimiento; una marcada disminución de la respuesta frente a la presentación repetida del estímulo de movimiento; una respuesta robusta para un amplio rango de contrastes e intensidades lumínicas; y, en algunos casos, sensibilidad por la estimulación mecánica. Es importante, sin embargo, destacar que la diversidad que se observa entre las NDM aquí estudiadas, en aspectos como son el potencial de reposo, la respuesta frente a un PL, diferencias en los campos receptivos, preferencia por la dirección del movimiento, sensibilidad por la estimulación mecánica, etc., indica claramente que se trata de un grupo heterogéneo, compuesto por varias subclases de neuronas.

La detección visual de movimiento requiere del procesamiento de información sobre los cambios espaciales y temporales en el patrón de intensidad lumínica originados por el movimiento de un objeto (ej. Exner, 1894; Koch et al., 1989). Esta percepción se alcanzaría, en muchos sistemas de vertebrados e invertebrados, a partir de correlacionar los cambios secuenciales en el tiempo, ocurridos en la actividad de unidades que evalúan la intensidad de luz en puntos vecinos del espacio (integración temporo espacial) (Reichardt, 1961; revisado en Clifford e Ibbotson, 2002). Como consecuencia de esta integración se puede detectar el movimiento en un campo visual pequeño (ej. Borst y Egelhaaf, 1989). La integración de la actividad de distintos detectores de campo pequeño permitiría la detección del movimiento sobre un campo visual más amplio (ej. Borst y Haag, 2002). De este modo, la información del movimiento para cada punto del espacio se codificaría en neuronas columnares mientras que neuronas tangenciales colectarían la información retinotópica del movimiento integrándola para un campo receptivo amplio (Douglass y Srausfeld, 1995).

El nivel de integración necesario para detectar movimiento en un campo visual amplio es mayor que el de neuronas especializadas en evaluar cambios estacionarios en la intensidad de luz (ej. Hubel y Wiesel, 1962; Dowling, 1979; Harris et al., 1989). Según esta consideración, esperábamos *a priori* que las NDM del cangrejo se ubiquen en el sistema visual río abajo de neuronas como las dimming o sustaining, las que tanto en crayfish como en *Chasmagnathus* se ubican en el segundo neuropilo óptico.

Por otra parte, el que algunas NDM muestren integración bimodal (visual y mecanosensorial) es coherente con una ubicación más central de estas neuronas en el sistema nervioso. Cabe destacar que, salvo por los trabajos de Wiersma y colaboradores en distintos crustáceos, el fenómeno de integración multimodal en neuronas del sistema visual de artrópodos no fue descrito previamente. En este sentido, la principal diferencia que existe con otras preparaciones experimentales en artrópodos radica en que en el cangrejo se preserva la total integridad del animal durante los experimentos electrofisiológicos.

Indefectiblemente, todas las NDM del cangrejo que se tiñeron en este estudio mostraron estar ubicadas en la lóbula, el tercer y último neuropilo con un arreglo retinotópico. Esta localización es consistente con lo que cabía esperar de acuerdo a los requerimientos para un detector de movimiento de campo visual amplio. Además de en la lóbula, las NDM arborizan también profusamente en el protocerebro lateral. El cuerpo celular se ubica por debajo de la lóbula y el axón abandona el lóbulo óptico por el tracto protocerebral. En la lóbula, el árbol dendrítico ramifica en una serie de neuritas tangenciales que corren paralelas entre sí en uno o en dos estratos, las que subdividiéndose recorren extensas porciones del mosaico retinotópico. Esta ubicación y disposición colectora de las dendritas de las NDM es semejante a la descrita para neuronas detectoras de movimiento de campo receptivo amplio de insectos (Gabbiani et al., 1999).

En algunas NDM se registraron potenciales de acción de dos y hasta tres amplitudes diferentes. Esto podría ser explicado por la existencia de más de un sitio de inicio de potenciales (ej. Calabrese y Kennedy, 1974; Meyrand et al., 1992;

Combes et al., 1993). Alternativamente, es posible que algunas NDM estén acopladas eléctricamente. Esta posibilidad se ve reforzada porque en varias de las tinciones intracelulares se observaron dos o más neuronas teñidas.

Si bien los campos receptivos de las NDM de *Chasmagnathus* pueden tener distinta ubicación y extensión, como se observó en muchos casos, aquí sólo estudiamos aquellas neuronas con sensibilidad a movimientos en la región dorsal del campo visual. Este criterio fisiológico de selección neuronal puede dar cuenta, al menos en parte, de la homogeneidad observada en la morfología celular. Si bien el número de NDM estudiadas en este trabajo es grande, esta no deja de ser una primer caracterización de su morfología. Es probable y deseable que conforme se avance con este tipo de estudios se puedan reconocer distintas variantes morfológicas, las que podrían corresponderse con diferencias en la respuesta fisiológica como las antes mencionadas.

7.7 NDM y la respuesta de escape

En sus estrategias de captura, algunos de los predadores naturales de los cangrejos como las gaviotas, los ostreros y otras aves marinas (Spivack y Sanchez, 1992; Bachmann y Martinez, 1999) se aproximan a su presa de maneras muy diversas: caminando, realizando vuelos planeados o vuelos en picada (Bachmann y Martinez, 1999; Copello y Favero, 2001). Esto implica que el cangrejo no puede basar su estrategia de reconocimiento del ataque en parámetros visuales simples del estímulo, como podrían ser un determinado ángulo subtendido o una velocidad de acercamiento fija. En referencia a este último parámetro las NDM no debieran estar sintonizadas a velocidades particulares, a no ser que exista un conjunto de NDM sintonizadas a las distintas velocidades relacionadas con las estrategias de predación.

La clasificación de fibras sensibles al movimiento realizada por Wiersma y colaboradores en distintos crustáceos reconoce la existencia de neuronas con sensibilidad preferencial por estímulos moviéndose a baja, media o alta velocidad (sección 1.5.5.1). En nuestro estudio no evaluamos la preferencia por la velocidad de movimiento de las NDM de *Chasmagnathus*. En efecto, con el objetivo de identificar neuronas involucradas en el fenómeno de aprendizaje visual previamente caracterizado en este animal, utilizamos como único estímulo de movimiento el EVP. Cabe preguntarse entonces ¿Cómo es posible que un mismo estímulo visual provoque respuestas intensas en diversas NDM? Una posible explicación es que una figura alargada como el EVP rotando a una única velocidad angular comprende múltiples velocidades tangenciales. La estimulación con múltiples velocidades tangenciales provocaría la respuesta simultánea de NDM sensibles a diferentes velocidades. Así, la forma y el movimiento angular del EVP permitirían explicar en parte la eficacia y la diversidad de respuestas neuronales que se obtienen con un único estímulo visual de movimiento.

Nuestros resultados muestran que tomadas en conjunto, las respuestas de las NDM al EVP tienen una dinámica temporal que refleja ajustadamente la dinámica

de la respuesta comportamental de escape al mismo estímulo visual. Resulta, sin embargo, interesante destacar que las respuestas de distintas NDM al EVP presentan dinámicas temporales diferentes. En efecto, tomados individualmente los perfiles de respuesta de las NDM no siempre ajustan a los perfiles de la respuesta de escape. Esto es consistente con que la identificación de los distintos tipos de ataques ejercidos por los predadores no se realizaría por neuronas especializadas en reconocer una velocidad particular, sino más bien que resultaría de la actividad conjunta y ponderada de neuronas con diferentes sintonías.

7.8 NDM y memoria

Distintos estudios comportamentales revelan que la formación de memoria depende, entre otros factores, de la frecuencia de estimulación con que se entrena a los animales (Hintzman, 1974). En distintos grupos de animales y utilizando distintos paradigmas de entrenamiento se observó que intervalos cortos entre ensayos de estimulación (entrenamientos masivos) dan lugar a una memoria de corta o intermedia duración, mientras que intervalos largos entre ensayos dan lugar a memorias de larga duración (Tully et al., 1994; Carew et al., 1972; Frost et al., 1985).

Experimentos comportamentales en *Chasmagnathus* muestran que un mismo número de ensayos de entrenamiento (15 ensayos) distribuidos en forma espaciada (cada 3 min) o masiva (cada 2 seg), producen una modificación del comportamiento que es equivalente en el corto término (< 1 min). Sin embargo, mientras el efecto del entrenamiento masivo desaparece a los 15 min, el entrenamiento espaciado produce una memoria que dura varios días. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la dinámica del cambio de respuesta de las NDM es función de la frecuencia de estimulación (figuras 36 y 37), coincidentemente con el fenómeno ampliamente descrito a nivel comportamental (ej. Pedreira et al., 1998) farmacológico (ej. Hermitte et al., 1999) y molecular (ej. Freudenthal et al., 1998). Más aún, los entrenamientos que generan una memoria duradera provocan cambios en la respuesta de las NDM que se mantienen y son detectables por al menos 1 día luego del entrenamiento. En conclusión, al menos parte del fenómeno de plasticidad neuronal que subyace a la memoria visual del cangrejo se ve reflejado en estas neuronas.

Que la respuesta de las NDM refleje la respuesta comportamental no implica necesariamente que los cambios plásticos ocurran efectivamente en estas neuronas. En efecto, estos cambios podrían ocurrir en neuronas directa o indirectamente presinápticas a las NDM. La presentación repetida del EVP no produjo cambios en neuronas del segundo neuropilo óptico (tangenciales, sustaining y dimming; figura 40). Aún cuando la relación funcional de estas últimas con las NDM no se conoce, en base a la estructura retinotópica columnar de los neuropilos es dable pensar que estos grupos neuronales serían estimuladas por elementos columnares comunes. Por lo tanto, la constancia en la respuesta de las neuronas del segundo neuropilo podría

servir como indicador de que la entrada a las NDM no se modifica durante la estimulación repetida con el EVP.

Por otra parte, neuronas on-off tampoco mostraron cambios en sus respuestas frente a la estimulación repetida con el EVP (figura 40). Este grupo heterogéneo de neuronas resulta particularmente interesante ya que, aún con diferencias morfológicas notables entre sí, todas ellas proyectan en la misma región de la lóbula en que se encuentra el árbol dendrítico de las NDM. La respuesta de estas neuronas on-off tampoco se modificó ante la estimulación repetida con el EVP.

Aunque los argumentos desarrollados sugieren que la entrada sináptica a las NDM no se modificaría durante la estimulación repetida con el EVP, y que por lo tanto los cambios plásticos podrían estar ocurriendo efectivamente en las NDM, los mismos no resultan en manera alguna concluyentes. El análisis de la relación de transferencia entre la señal de entrada (PEP) y la señal de salida (potenciales de acción) de las NDM durante la sesión de entrenamiento tampoco permite sacar conclusiones al respecto. Sin embargo, el mismo análisis aplicado al experimento de memoria de largo término resulta sumamente sugerente. En efecto, 24 hs luego del entrenamiento se observó una modificación importante y significativa de la señal de salida de las NDM de los animales entrenados, sin detectarse ninguna diferencia en la señal de entrada sináptica. Aún cuando existen distintas hipótesis alternativas para explicar la reducción de respuesta de las NDM, por ej. el desarrollo durante el entrenamiento de una actividad sináptica inhibitoria sobre estas neuronas en sitios cercanos a la zona de disparo, creemos que el conjunto de evidencias acumuladas en este trabajo, indican que la reducción observada en la salida de las NDM como consecuencia del entrenamiento se debe a modificaciones locales ocurridas en estas mismas neuronas. En otras palabras, que los cambios de comportamiento inducidos por el aprendizaje y la memoria en *Chasmagnathus* podrían ser explicados, en buena medida, por modificaciones que ocurren en las NDM.

A partir de los resultados de este trabajo es posible ahora intervenir intracelularmente para investigar aspectos del funcionamiento celular y molecular del aprendizaje y la memoria en el animal intacto. Es posible introducir bloqueantes específicos de canales y estudiar los cambios biofísicos que genera el aprendizaje. Más aún, habida cuenta que luego del registro intracelular los animales se recuperan completamente, es posible, por ejemplo, inyectar intracelularmente secuencias acopladas a moléculas reporteras para investigar su expresión como consecuencia de un posterior entrenamiento.

7.9 Aporte al conocimiento comparativo de la visión y de la memoria en artrópodos

Investigaciones recientes han modificado la concepción tradicional sobre las relaciones filogenéticas entre insectos y crustáceos, indicando que serían grupos hermanos. Entre las varias evidencias en favor de esta idea, se incluye el carácter sinapomórfico de los neuropilos ópticos entre ambos grupos. En efecto, tanto en crustáceos como en insectos existen tres neuropilos ópticos principales que se vinculan a través de dos quiasmas ópticos (Strausfeld y Nassel, 1980). Los

neuropilos comparten el mismo tipo de desarrollo embrionario y están compuestos por elementos neuronales semejantes (Harzsch et al., 1999a,b; Strausfeld et al., 1995; Strausfeld, 1998; Sinakevitch et al., 2003). Tratándose entonces de estructuras homólogas, los resultados que se obtienen a partir del estudio de los neuropilos ópticos de los crustáceos son, en buena medida extensibles a los insectos.

Investigaciones desarrolladas durante la última década han revelado resultados insospechados en referencia a las capacidades cognitivas de los artrópodos. En efecto, hoy resulta claro que estos animales con sus pequeños cerebros, además, de aprender y recordar por largo tiempo son capaces de categorizar en base a conceptos abstractos, aprender reglas, transferir el aprendizaje de reglas a diferentes modalidades sensoriales, etc. (Giurfa et al., 1996, 2001; Menzel y Giurfa, 1999). Estas capacidades, junto con la proclamada simplicidad de sus sistemas nerviosos, suelen alegarse como ventajas para utilizar artrópodos como modelos para el estudio de los mecanismos de la memoria. Resulta entonces importante destacar que hasta el momento no se había identificado ningún tipo neuronal involucrado en algún aprendizaje visual en este grupo de animales.

Así, a pesar de los muchos trabajos dedicados a estudiar la memoria visual en artrópodos, nuestros resultados constituyen la primera identificación de neuronas individuales relacionadas con este tipo de memoria, por lo que representan un avance considerable en el conocimiento de la neurobiología del aprendizaje visual de estos animales.

En artrópodos la mayoría de los estudios fisiológicos de procesamiento visual de movimiento fueron hechos en relación a la respuesta optomotora (ej. Wiersma y Fiore, 1971; Borst y Haag, 2002). Esta respuesta tiene como función estabilizar el flujo de la imagen panorámica que se genera cuando un animal se desplaza. Se trata así de una respuesta refleja que no se modifica ante la estimulación repetida. Tampoco, claro, se modifica la respuesta de las neuronas implicadas en su control. Estos estudios, por su importancia, han contribuido a la idea ampliamente generalizada de que los neuropilos ópticos de los artrópodos están exclusivamente dedicados al procesamiento visual rígido. Contrariamente a esta idea, los resultados de esta tesis y otros de nuestro laboratorio indican que en la lóbula: a) se integra información visual y mecanosensorial proveniente de diferentes regiones del cuerpo del animal; b) ocurrirían cambios plásticos que sustentan fenómenos de aprendizaje y memoria de largo término; c) se integra información binocular (Sztarker y Tomsic, 2004). Es claro, entonces, que contrariamente a la visión general, la lóbula de los artrópodos constituye un elevado centro cerebral de integración. Únicamente a modo ilustrativo vale pensar que, en términos del tipo de procesamiento funcional que encontramos realiza la lóbula, la misma constituye un centro de integración más elevado que la corteza visual primaria de los primates.

7.10 Consideraciones adicionales sobre las NDM, el comportamiento y la memoria

Las NDM de la lóbula responden de manera bastante específica al estímulo visual que evoca la respuesta de escape del cangrejo, es decir, su respuesta correlaciona con la señal de entrada al sistema. Por otra parte, estas neuronas reflejan fielmente la respuesta de escape y su modificación por aprendizaje, es decir, su respuesta correlaciona con la salida del sistema. En función del tipo de entrenamiento aplicado y de la memoria desarrollada, esta última correlación se sigue en el dominio del tiempo en un rango que va desde segundos hasta un día después del entrenamiento. Aún cuando los resultados señalan a las NDM como elementos importantes en el circuito de control de la respuesta de escape al estímulo visual, es importante señalar que la probabilidad e intensidad con que se evoca dicha respuesta depende de factores adicionales e independientes de la información visual. Por ejemplo, ante el mismo EVP los animales escapan con mayor probabilidad e intensidad si se encuentran semisumergidos, por el contrario evitan el escape y optan por una estrategia de ocultamiento cuando se hallan sobre un sustrato de fango blando. Claramente, aunque el estímulo visual pueda ser el disparador de la respuesta de escape, el animal no descansa únicamente en este canal de información sensorial para tomar la decisión comportamental. En esta tesis, la respuesta de las NDM frente al EVP se investigó manteniendo a los animales bajo una única condición experimental. Con el objetivo de saber si las NDM son elementos importantes en la toma de decisiones del animal, es necesario investigar si factores no visuales que alteran la respuesta comportamental al EVP afectan igualmente la respuesta al mismo estímulo en estas neuronas.

La memoria visual de largo término de *Chasmagnathus* está determinada por una asociación entre el EVP y el contexto, de manera tal que los animales sólo evocan la memoria aprendida si son evaluados en el mismo contexto en donde fueron entrenados (Tomsic et al., 1998). Los experimentos de esta tesis demuestran que las NDM reflejan la memoria aprendida, sin embargo, la evaluación neurofisiológica se realizó siempre en el mismo contexto en donde tuvo lugar el entrenamiento de los animales. Por lo tanto, de estos experimentos no es posible conocer si el componente contextual de la memoria se encuentra asociado al nivel de las NDM. Para esto, es necesario investigar si el efecto del cambio de contexto que impide la evocación de la memoria a nivel comportamental se refleja también en la respuesta de las NDM. En caso de que así fuera, este resultado indicaría que las NDM son un núcleo medular del aprendizaje y la memoria que estudiamos en *Chasmagnathus*.

7.11 Conclusiones

Los principales aportes de este trabajo de tesis pueden resumirse en los siguientes puntos:

_ Desarrollamos una preparación que permite investigar la fisiología neuronal, de neuronas cerebrales, a través de registros intracelulares en un animal intacto mientras se encuentra aprendiendo.

_ Realizamos la primera identificación de neuronas individuales involucradas en memorias visuales en un artrópodo.

_ Demostramos que, contrariamente a la visión generalizada que se tenía acerca del papel funcional de los neuropilos ópticos de artrópodos, la lóbula constituye un centro distinguido de integración cerebral.

Participación y agradecimientos finales

La Lic. Julieta Sztarker participó directamente en múltiples aspectos de esta tesis, especialmente en el experimento de retención de largo término de la figura 38 y en el análisis de la relación entrada-salida de las NDM.

La Dra. Beatriz Dimmant y el Dr. Alejandro Delorenzi me enseñaron los primeros pasos de lo que posteriormente constituiría el trabajo histológico de esta tesis. Angel Vidal colaboró en distintos aspectos técnicos, fundamentalmente en el dispositivo de medición de la respuesta de escape de los animales.

El Lic. Pablo Jercog realizó los dibujos definitivos de las figuras 32 y 33 y la Lic. Violeta Medan la ampliación de la figura 22.

A todos ellos mi agradecimiento y reconocimiento.

Bibliografía

Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TAS, Kandel ER, y Bourtchouladze R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88: 615–626. (1997).

Adrian ED. The analysis of the nervous system. Sherrington Memorial Lecture. *Proc. R. Soc. Med.* 50: 993–998. (1957).

Albright TD, Jessell TM, Kandel ER y Posner MI. Neural science: a century of progress and the mysteries that remain. *Neuron* 25: 1-55. (2000).

Alkon DL. Membrane depolarization accumulates during acquisition of an associative behavioral change. *Science* 210(4476): 1375-1376. (1980).

Alkon DL, Lederhendler I y Shoukimas JJ. Primary changes of membrane currents during retention of associative learning. *Science* 215(4533): 693-695. (1982).

Bachmann S, Martinez MM. Feeding tactics of the american oystercatcher (*Haematopus palliatus*) on Mar Chiquita coastal lagoon, Argentina. *Ornitología Neotropical* 10: 81-84. (1999).

Arechiga H y Yanagisawa K. Inhibition of visual units in the crayfish. *Vision Res.* Apr;13(4):731-44. (1973)

Berón de Astrada M y Tomsic D. Physiology and morphology of visual movement detector neurons in a crab (Decapoda: Brachyura). *J Comp Physiol A* 188: 539-551. (2002).

Bitterman ME, Menzel R, Fietz A y Schafer S. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J Comp Psychol.* 97(2):107-19. (1983).

Blaustein DN, Derby CD, Simmons RB y Beall AC. Structure of the brain and medulla terminalis of the spiny lobster and the crayfish *Procambarus clarkii*, with an emphasis on olfactory centers. *J. Crustacean Biol.* 8: 493-519. (1988).

Borst A y Egelhaaf M. Principles of visual motion detection. *Trends Neurosci.* 12: 297–306. (1989).

Borst A y Haag J. Neural networks in the cockpit of the fly. *J Comp Physiol A* 188: 419-437. (2002).

Bourtchouladze RA, Franguelli B, Bendy J, Cioffi D, Schutz. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP responsive element binding protein. *Cell* 79: 59–68. (1994).

Bullock TH, y Horridge GA. Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates. Vols. 1 and 2, W. H. Freeman, San Francisco. (1965).

Byrne JH, y Kandel ER. Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J. Neurosci.* 16: 425–435. (1996).

Calabrese RL y Kennedy D. Multiple sites of spike initiation in a single dendritic system. *Brain Res* 82: 316-321. (1974).

Carew TJ, Pinskaer HM, y Kandel ER. Long-term habituation of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *J. Neurobiol.* 20: 1-9. (1972).

- Carew TJ, Hawkins RD, y Kandel ER. Differential classical conditioning of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *Science* 219: 397–400. (1983).
- Castellucci V, Pinsker H, Kupfermann I y Kandel ER. Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 167: 1745–1748. (1970).
- Chen L, Zhang S y Srinivasan MV. Global perception in small brains: topological pattern recognition in honey bees. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(11): 6884-6889. (2003).
- Christensen TA, Lei H y Hildebrand JG. Coordination of central odor representations through transient, non-oscillatory synchronization of glomerular output neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(19): 11076-81. (2003).
- Clifford CW e Ibbotson MR. Fundamental mechanisms of visual motion detection: models, cells and functions. *Prog Neurobiol.* 68(6): 409-437. (2002).
- Collett TS y Collett M. Memory use in insect visual navigation. *Nat Rev Neurosci.* 3(7): 542-552. (2002).
- Combes D, Simmers J, Nonnot L y Moulin M. Tetrodotoxin-sensitive dendritic spiking and control of axonal firing in a lobster mechanoreceptor neuron. *J Physiol* 460: 581-602. (1993).
- Copello S y Favero M. Foraging ecology of Olrog's gull *Larus atlanticus* in Mar Chiquita lagoon (Buenos Aires, Argentina): are there age-related differences. *Bird Conservation International* 11: 175-188. (2001).
- Cronin TW y Takahiko H. Spectral Sensitivity in crustacean eyes. In: *Studies In Crustacean Neuroscience: Comparative Approaches To The Investigation Of The Nervous System*. K. Wiese Ed. (2002).
- Douglass JK y Strausfeld NJ. Visual motion detection circuits in flies: peripheral motion computation by identified small-field retinotopic neurons. *J Neurosci.* 15(8): 5596-5611. (1995).
- Dowling JE. Information processing by local circuits: the vertebrate retina as a model system. En: Schmitt FO y Worden FG (Eds.), *The Neurosciences: Fourth Study Program*. MIT Press, Cambridge, págs. 163–181. (1979).
- Dubnau J, Chiang AS y Tully T. Neural substrates of memory: from synapse to system. *J Neurobiol.* 54(1): 238-253. (2003).
- Eckert R, Randall D y Augustine G. *Fisiología animal, mecanismos y adaptaciones*. Interamericana-McGraw- Hill. 3 ed. Cap XIII págs. 451-452. (1990).
- Egelhaaf M, Borst A. Motion computation and visual orientation in flies. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* Apr;104(4):659-73. (1993).
- Egelhaaf M y Kern R. Vision in flying insects. *Curr Opin Neurobiol.* 12(6):699-706. (2002).
- Exner S. Entwurf zu Einer Physiologischen Erklärung der Psychischen Erscheinungen. I. Teil. Deuticke, Leipzig, págs. 37–140. (1894).
- Farrow K, Borst A, Haag J. Sharing receptive fields with your neighbors: tuning the vertical system cells to wide field motion. *J Neurosci.* 25(15): 3985-3993. (2005).
- Fingerman M. The endocrine mechanism of crustaceans. *J. Crustacean Biol.* 7(1): 1-24. (1987).
- Fraser PJ. Interneurons in crab connectives (*Carcinus maenas* (L.)). Directional statocyst fibres. *J Exp Biol.* Dec;61(3):615-28. (1974).

- Frenkel L, Freudenthal R, Romano A, Nahmod VE, Maldonado H y Delorenzi A. Angiotensin II and the transcription factor Rel/NF-kappaB link environmental water shortage with memory improvement. *Neuroscience* 115(4): 1079-1087. (2002).
- Freudenthal R, Locatelli F, Hermitte G, Maldonado H, Lafourcade C, Delorenzi A y Romano A. Kappa-B like DNA-binding activity is enhanced after spaced training that induces long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neurosci Lett.* 242(3): 143-146. (1998).
- Frost WN, Castellucci VF, Hawkin SR y Kandel ER. Monosynaptic connection from sensory neuron from the gill and the siphon withdrawal reflex in *Aplysia* participate in the storage of long-term memory and sensitization. *Proc Natl Acad of Sci. USA* 82: 8266-8269. (1985).
- Gabbiani F, Krapp HG, Koch C y Laurent G. Multiplicative computation in a visual neuron sensitive to looming. *Nature* 420(6913): 320-324. (2002).
- Gabbiani F, Krapp HG y Laurent G. Computation of object approach by a wide-field, motion-sensitive neuron. *J Neurosci.* 19(3): 1122-1141. (1999).
- Gauck V y Borst A. Spatial response properties of contralateral inhibited lobula plate tangential cells in the fly visual system. *J Comp Neurol.* 406(1): 51-71. (1999).
- Gerber B y Menzel R. Contextual modulation of memory consolidation. *Learn Mem.* 7(3): 151-158. (2000).
- Gilbert CD, Sigman M y Crist RE. The neural basis of perceptual learning. *Neuron.* Sep 13;31(5):681-97. (2001).
- Giurfa M. Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Curr Opin Neurobiol.* 13(6): 726-735. (2003).
- Giurfa M, Eichmann B y Menzel R. Symmetry perception in an insect. *Nature* 382: 458-461. (1996).
- Giurfa M. y Menzel R. Insect visual perception: complex abilities of simple nervous systems. *Curr Opin Neurobiol.* 7(4): 505-513. (1997).
- Giurfa M, Zhang S, Jenett A, Menzel R y Srinivasan MV. The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect. *Nature* 410(6831): 930-933. (2001).
- Glantz RM. Five classes of visual interneurons in the optic nerve of the hermit crab. *J Neurobiol.*;4(4):301-19. (1973)
- Glantz RM. The visually evoked defense reflex of the crayfish: habituation, facilitation, and the influence of picrotoxin. *J Neurobiol* 5: 263-280. (1974a).
- Glantz RM. Habituation of the motion detectors of the crayfish optic nerve: Their relationship to the visual evoked defense reflex. *J Neurobiol* 5: 489-510. (1974b).
- Glantz RM. Defense reflex and motion detector responsiveness to approaching targets: the motion detector trigger to the defense reflex pathway. *J Comp Physiol A* 95: 297-314. (1974c).
- Glantz RM. Visual input and motor output of command interneurons of the defense reflex pathway in the crayfish.. En: *Arthropods*. Hoyh E Ed.. Plenum press, New York, págs. 1254-274. (1977).
- Glantz RM. Directional selectivity in a nonspiking interneuron of the crayfish optic lobe: evaluation of a linear model. *J Neurophysiol.* 72(1):180-93. (1994).

- Glantz RM. Polarization sensitivity in the crayfish optic lobe: peripheral contributions to opponency and directionally selective motion detection. *J Neurophysiol* 76: 3304-3414. (1996).
- Glantz RM. Polarization analysis in the crayfish visual system. *J Exp Biol.* 204(14): 2383-2390. (2001).
- Glantz RM y Bartels A. The spatiotemporal transfer functions of crayfish lamina monopolar neurons. *J Neurophysiol* 6: 2168-2182. (1994).
- Glantz RM y Clyde SM. Signal processing in the crayfish optic lobe: contrast, motion and polarization vision. In: *Studies In Crustacean Neuroscience: Comparative Approaches To The Investigation Of The Nervous System.* K. Wiese Ed. (2002).
- Glantz RM y McIsaac A. Two-channel polarization analyzer in the sustaining fiber-dimming fiber ensemble of crayfish visual system. *J Neurophysiol.* 80(5): 2571-2583. (1998).
- Glantz RM, Miller CS y Nassel DR. Tachykinin-related peptide and GABA-mediated presynaptic inhibition of crayfish photoreceptors. *J Neurosci.* 20(5): 1780-90. (2000).
- Glantz RM, Wyatt C y Mahncke H. Directionally selective motion detection in the sustaining fibers of the crayfish optic nerve: linear and nonlinear mechanisms. *J Neurophysiol* 74: 142-152. (1995).
- Grossman Y, Parnas I y Spira ME. Differential conduction block in branches of a bifurcating axon. *J Physiol* 295: 283-305. (1979).
- Grzywacz NM, Amthor FR, Merwine DK. Directional hyperacuity in ganglion cells of the rabbit retina. *Vis Neurosci.* Sep-Oct;11(5):1019-25. (1994).
- Gupta A. Evolutionary trends in the central and mushroom bodies of the arthropod brain. A dilemma. En *Arthropod brain. Its evolution development, structure and functions.* (Gupata ed) New York: Willey and Sons. (1997).
- Haag J, Theunissen F y Borst A. The intrinsic electrophysiological characteristics of fly lobula plate tangential cells: II. Active membrane properties. *J Comput Neurosci.* 4(4):349-369. (1997).
- Hammer M. An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366: 59-63. (1993).
- Harris RA, O'Carroll DC y Laughlin SB. Adaptation and the temporal delay filter of fly motion detectors. *Vis. Res.* 39: 2603-2613. (1999).
- Hartline HK. Inhibition of activity of visual receptors by illuminating nearby retinal elements in the *Limulus* eye. *Federation Proceedings*, 8: 69. (1949).
- Hartline HK y Graham CH. Nerve impulses from single receptors in the eye. *J. Cell Comp. Physiol.* 1, 277-295. (1932).
- Hartline HK, Wagner HG y Ratliff F. Inhibition in the eye of *Limulus*. *J General Physiology*, 39: 651-673. (1956).
- Harzsch S. The phylogenetic significance of crustacean optic neuropils and chiasmata: a re-examination. *J Comp Neurol.* 453(1): 10-21. (2002).
- Harzsch S, Benton J, Dawirs RR y Beltz B. A new look at embrionic development of the visual system in dacapod crustaceans: neuropil formation, neurogenesis, and apoptotic cell death. *J Neurobiol* 39: 294-306. (1999a).

- Harzsch S, Miller J, Benton J y Beltz B. From embryo to adult: persistent neurogenesis and apoptotic cell death shape the lobster deutocerebrum. *J Neurosci* 19: 3472–3485. (1999b).
- Heisenberg M, Wolf R y Brembs B. Flexibility in a single behavioral variable of *Drosophila*. *Learn Mem.* 8(1): 1-10. (2001).
- Hemmi JM y Zeil J. Robust judgement of inter-object distance by an arthropod. *Nature* 421(6919): 160-163. (2003a).
- Hemmi JM y Zeil J. Burrow surveillance in fiddler crabs. I. Description of behaviour. *J Exp Biol.* 206(Pt 22): 3935-3950. (2003b).
- Hermitte G, Pedreira ME, Tomsic D y Maldonado H. Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long-term habituation after spaced, but not massed, training in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem.* 71(1): 34-49. (1999).
- Hintzman DI. Theoretical implications of the spacing effect. *Theories in cognitive psychology* (Solso RL, ed), págs. 77–99. Hillsdale, NJ: Erlbaum. (1974).
- Hodgkin AL. Evidence for electrical transmission in nerve. Parts I and II. *J. Physiol.* 90: 183–232. (1937).
- Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* 116: 449–472. (1952a).
- Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* 116: 473–496. (1952b).
- Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* 116: 497–506. (1952c).
- Hodgkin AL, Huxley AF y Katz B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* 116: 424–448. (1952).
- Holtmaat JGD, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd MG, Zhang X, y Svoboda K. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* 45: 279–291. (2005).
- Hubel DH y Wiesel TN. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex.. *J Physiol.* 1962 Jan;160:106-54. (1962).
- Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM. Part II. En: *Principles of neural science*. Appleton & Lange. 3^a ed. (2000).
- Kandel ER y Spencer WA. Cellular neurophysiological approaches in the study of learning. *Physiol. Rev.* 48: 65–134. (1968).
- Kirk MD. The crayfish visual system: Intracellular studies and morphologies of identified neurons. Tesis doctoral, Rice University, Houston, Texas. (1982).
- Kirk MD, Waldrop B. y Glantz RM. The crayfish sustaining fibers. Responses to illumination, membrane properties and adaptatation. *J Comp Physiol* 150: 419-425. (1982a).
- Kirk MD, Waldrop B. y Glantz RM. The crayfish sustaining fibers. Morfological representation of visual receptive fields in the second optic neurropil. *J Comp Physiol* 146: 175-179. (1982b).
- Kirk, MD, Waldrop B y Glantz RM. Retinal illumination produces synaptic inhibition of a neurosecretory

- organ in the crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *J Neurobiol* 14(6): 473-480. (1983).
- Koch C, Wang HT, Mathur B. Computing motion in the primate's visual system. *J Exp Biol.* 146: 115-139. (1989).
- Koffka, K. *Principles of Gestalt Psychology* (New York: Harcourt, Brace). (1935).
- Krapp HG y Gabbiani F. Spatial distribution of inputs and local receptive field properties of a wide-field, looming sensitive neuron. *J Neurophysiol.* Apr;93(4):2240-53. (2005).
- Labhart T y Wiersma CA. Habituation and inhibition in a class of visual interneurons of the rock lobster, *Panulirus interruptus*. *Comp Biochem Physiol A.*;55(3):219-24. (1976).
- Land M y Layne J. The visual control of behaviour in fiddler crabs. II. Tracking control systems in courtship and defense. *J Comp Physiol* 177: 91-103. (1995).
- Laughlin, S. B. Neural principles in the peripheral nervous systems of invertebrates. En: *Handbook of Sensory Physiology. Vision in Invertebrates.* H. Autrum Ed. Berlin: Springer-Verlag. Vol. VII, págs. 133-280. (1981).
- Layne JE. Retinal location is the key to identifying predators in fiddler crabs (*Uca pugilator*). *J Exp Biol* 201: 2253-2261. (1998).
- Liu L, Wolf R, Ernst R, Heisenberg M. Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. *Nature.* 1999 Aug 19;400(6746):753-6.
- Locatelli F, Maldonado H y Romano A. Two critical periods for cAMP-dependent protein kinase activity during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem.* 77(2): 234-49. (2002).
- Lozada M, Romano A y Maldonado H. Long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiol Behav.* 47(1): 35-41. (1990).
- Magee JC. Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat Rev Neurosci.* 1(3): 181-90. (2000).
- Maldonado H. Crustaceans as models to investigate memory illustrated by extensive behavioral and physiological studies in *Chasmagnathus*. En: *The crustacean nervous system* (Wiese Ed), págs: 314-327. Springer-Verlag, Berlin. (2002)
- Maldonado H, Romano A y Tomsic D. Long-term habituation (LTH) in the crab *Chasmagnathus*: a model for behavioral and mechanistic studies of memory. *Braz J Med Biol Res.* 30(7): 813-26. (1997).
- Marder E y Thirumalai V. Cellular, synaptic and network effects of neuromodulation. *Neural Netw.* 15(4-6): 479-493. (2002).
- Mazel CH, Cronin TW, Caldwell RL y Marshall NJ. Fluorescent enhancement of signaling in a mantis shrimp. *Science* 303(5654): 51. (2004).
- Medan V, Oliva D y Tomsic D. Preferences for Direction of Movement on Visual Neurons of a Crab. *Soc Neuroethol Abstr* 7: 142. (2004).
- Mellon D y Munger SD. Nontopographic projection of olfactory sensory neurons in the crayfish brain. *J Comp Neurol* 296: 253-262. (1990).
- Menzel R y Giurfa M. Cognition by a mini brain. *Nature* 400(6746): 718-9. (1999).

- Menzel R y Giurfa M. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends Cogn Sci.* 5(2): 62-71. (2001).
- Menzel R y Muller U. Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu Rev Neurosci.* 19: 379-404. (1996).
- Merlo E, Freudenthal R y Romano A. The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience* 112(1): 161-172. (2002).
- Meyrand P, Weimann JM y Marder E. Multiple axonal spike initiation zones in a motor neuron: serotonin activation. *J Neurosci* 12: 2803-2812. (1992).
- Miyashita Y. Cognitive memory: cellular and network machineries and their top-down control. *Science* 306(5695): 435-440. (2004).
- Mountcastle VB. The view from within: pathways to the study of perception. *Johns Hopkins Medical Journal*, 136:109-131. (1975).
- Nassel DR. The organisation of the lamina ganglionaris of the prawn, *Pandalus borealis*. *Cell Tissue Res.* 163: 445-464. (1975).
- Nassel DR. Types and arrangements of neurons in the crayfish optic lamina. *Cell Tissue Res.* 179: 45-75. (1977).
- Nassel, DR. y Elofsson R. Comparative anatomy of the crustacean brain. En: *Arthropod Brain: Its Evolution, Development, Structure, and Functions.* (A Gupta Ed.). Wiley and Sons, New York. (1987).
- Nassel DR y Waterman TH. Golgi EM evidence for visual information channeling in the crayfish lamina ganglionaris. *Brain Res.* 130: 556-563. (1977).
- Newsome WT, Britten KH, Movshon JA. Neuronal correlates of a perceptual decision. *Nature.* 1989 Sep 7;341(6237):52-4.
- Nicholls JG y Kuffler SW. Neurons as conductors of electricity. En *From Neuron to Brain. A cellular approach to the function of the nervous system.* Ed. Sinauer Associates, Inc. Cap. 7, págs. 132-145. (1976).
- Nichols MJ, Newsome WT. The neurobiology of cognition. *Nature.* Dec 2;402-406. (1999)
- Nicolelis MAL y Ribeiro S. Multielectrode recordings: the next steps. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12: 602-606. (2002).
- Nilsson DE. Eye ancestry: old genes for new eyes. *Curr Biol.* 6(1): 39-42. (1996).
- Nilsson DE. Related Eye evolution: a question of genetic promiscuity. *Curr Opin Neurobiol.* 14(4): 407-14. (2004).
- Osorio D y Bacon JP. A good eye for arthropod evolution. *Bioassays* 16: 419-424. (1994).
- Pavlov I. Reflejos condicionados e inhibiciones. Ediciones Península. Barcelona. (1975).
- Pedreira ME, Dimant B y Maldonado H. Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav.* 54(3): 611-617. (1996).

- Pedreira ME, Romano A, Tomsic D, Lozada M y Maldonado H. Massed and spaced training build up different components of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Animal learning and behavior* 26(1): 34-45. (1998).
- Pereyra P, de la Iglesia HO y Maldonado H. Training-to-testing intervals different from 24h impair habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Physiol Behav.* 59(1):19-25. (1996).
- Pereyra P, Gonzalez Portino E y Maldonado H. Long-lasting and context-specific freezing preference is acquired after spaced repeated presentations of a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem.* 74(2): 119-34. (2000).
- Pfeiffer L y Glantz M. Cholinergic synapses and the organization of contrast detection in the crayfish optic lobe. *J Neurosci.* 9(6): 1872-1882. (1989).
- Pfeiffer L. y Glantz M. Gaba-mediated inhibition of visual interneurons in the crayfish medulla. *J Comp Physiol. A* 168: 373-381. (1991).
- Ramón y Cajal S. The structure and connexions of neurons. En *Nobel Lectures: Physiology or Medicine (1901–1921)*. (Amsterdam: Elsevier) (1967), págs. 220–253. (1906).
- Ramón y Cajal S. *Recuerdos de mi vida: Historia de mi labor científica*. Cap 25. Madrid: Alianza. (1995).
- Reichardt W. Autocorrelation, a principle for the evaluation of sensory information by the central nervous system. En: Rosenblith, W.A. (Ed.), *Sensory Communication*. Wiley, New York, págs. 303– 317. (1961).
- Richter S. Evolution of optical design in the Malacostracea (Crustacea). En: *Studies In Crustacean Neuroscience: Comparative Approaches To The Investigation Of The Nervous System*. K. Wiese Ed. (2002).
- Romano A, Lozada M y Maldonado H. Effect of naloxone pretreatment on habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Behav Neural Biol.* 53(1): 113-22. (1990).
- Ronacher B y Wehner R. Dessert ants *Cataglyphis fortis* use self-induced optic flow to measure distances travelled. *J Comp Physiol (A)* 177:21-27. (1995).
- Roye, DB. The central distribution of movement sensitive afferent fibers from the antennular short hair sensilla of *Callinectes sapidus*. *Mar. Behav. Physiol.* 12: 181-196. (1986).
- Sachse S y Galizia CG. The coding of odour-intensity in the honeybee antennal lobe: local computation optimizes odour representation. *Eur J Neurosci.* 18(8): 2119-2132. (2003).
- Sandeman DC. The vascular circulation in the brain, optic lobes and thoracic ganglia of the crab *Carcinus*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 168 (10): 82-90. (1967).
- Sandeman DC. The site of synaptic activity and impulse initiation in an identified motoneurone in the crab brain. *J Exp Biol* 50: 771-784. (1969).
- Sandeman DC. Organization of the central nervous system. En: *The Biology of the crustacea*. Vol. 4. págs. 1-31. Ed. Sandeman & Atwood. Academic Press, New York. (1982).
- Sandeman DC, Sandeman R, Derby C y Schmidt M. Morphology of the brain of crayfish, crabs and spiny lobsters: A common nomenclature for homologous structures. *Biol Bull* 183:304–326. (1992).
- Sandeman DC, Scholtz GS y Sandeman RE. Brain evolution in decapod crustacea. *J Exp Zool* 265: 112-133. (1993).

- Sandeman DC, y Denburg J. The central projections of chemoreceptor axons in the crayfish revealed by axoplasmic transport. *Brain Res.* 115: 492-496. (1976).
- Sandeman R y Sandeman DC. "Impoverished" and "enriched" living conditions influence the proliferation and survival of neurons in crayfish brain. *J Neurobiol* 45: 215-226. (2000).
- Schreurs BG, Gusev PA, Tomsic D, Alkon DL y Shi T. Intracellular correlates of acquisition and long-term memory of classical conditioning in Purkinje cell dendrites in slices of rabbit cerebellar lobule HVI. *J Neurosci.* 18(14): 5498-5507. (1998).
- Sinakevitch I, Douglass JK, Scholtz G, Loesel R y Strausfeld NJ. Conserved and convergent organization in the optic lobes of insects and isopods, with reference to other crustacean taxa. *J Comp Neurol.* 467(2): 150-172. (2003).
- Spivak E y Sanches N. Prey selection by *Larus belcheri atlanticus* in Mar Chiquita lagoon, Buenos Aires, Argentina: a possible explanation for its discontinuous distribution. *Revista Chilena de Historia Natural* 65: 209-220. (1992).
- Squire L y Kandel ER. *Memory: From Mind to Molecules.* (New York: Scientific American Books). (1999).
- Srinivasan MV. Pattern recognition in the honeybee: recent progress. *J Insect Physiol.* 40: 183-194. (1994).
- Srinivasan MV. Homing in on ant navigation. *Nature* 411(6839): 752-753. (2001).
- Srinivasan MV, Zhang SW y Rolfe B. Is pattern vision in insects mediated by "cortical" processing? *Nature* 362: 539-540. (2001).
- Stach S, Benard J y Giurfa M. Local-feature assembling in visual pattern recognition and generalization in honeybees. *Nature* 429(6993): 758-761. (2004).
- Stewart WW. Lucifer dyes-highly fluorescent dyes for biological tracing. *Nature* 292(5818): 17-21. (1981).
- Strausfeld NJ. Crustacean-insect relationships: the use of brain characters to derive phylogeny amongst segmented invertebrates. *Brain Behav Evol.*(4-5):186-206. (1998).
- Strausfeld NJ, Buschbeck EK y Gomez RS. The arthropod mushroom body: Its functional roles, evolutionary enigmas and mistaken identities. En: *The nervous system of the invertebrates: An evolutionary and comparative approach.* (Breidbach O y Kutsch W Eds.). Birkhauser Verlag Basel, Suiza. (1995).
- Strausfeld NJ y Nassel DR. Neuroarchitectures serving compound eyes of crustacea and insects. En *Handbook of Sensory Physiology. Vol. II: Vision in Invertebrates,* (Autrum H Ed.). Págs. 1-132. Springer-Verlag, New York. (1980).
- Sullivan JM y Beltz BS. Neural Pathways connecting the deutocerebrum and lateral protocerebrum in the brains of decapod crustaceans. *J Comp Neuro.* 441: 9-22. (2001).
- Sztarker J. Interneuronas monoculares y binoculares: indicios funcionales de la organización circuital del sistema visual en el cangrejo *Chasmagnathus*. Tesis de licenciatura. Universidad de Buenos Aires. (2000).
- Sztarker J, Strausfeld NJ, y Tomsic D. Organization of optic lobes that support motion detection in a semiterrestrial crab. *J Comp. Neurol.* Aceptado. (2005).

- Sztarker J y Tomsic D. Binocular visual integration in the Crustacean nervous system. *J Comp Physiol A* 190: 951-962. (2004).
- Tang S, Wolf R, Xu S, Heisenberg M. Visual pattern recognition in *Drosophila* is invariant for retinal position. *Science*. (2004).
- Thompson RF y Spencer WA. Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol. Rev.* 73:16-43. (1966).
- Tomsic D. Percepción nociceptiva y habituación a un estímulo visual de peligro en el cangrejo *Chasmagnathus*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. (1993).
- Tomsic D, Maldonado H y Rakitin A. Morphine and GABA: effects on perception, escape response and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res Bull.* 26(5): 699-706. (1991).
- Tomsic D y Maldonado H. Central effect of morphine pretreatment on short- and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav.* 36(4): 787-793. (1990).
- Tomsic D, Massoni V y Maldonado H. Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs: Ontogenic ecological and opioid modulation correlates. *J comp Physiol.* 173: 621-633. (1993).
- Tomsic D, Romano A y Maldonado H. Behavioral and mechanistic bases of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Adv Exp Med Biol.* 446: 17-35. (1998).
- Thorndike EL. Animal intelligence: an experimental study of the association processes in animals. *Psychological Review Monograph*. (1898).
- Tully T. *Drosophila* learning: behavior and biochemistry. *Behav Genet.* 14(5): 527-557. (1984).
- Tully T, Preat T, Boyton SC, y Del Vecchio M. Genetic dissection of consolidate memory in *Drosophila*. *Cell.* 79: 35-47. (1994).
- Ugolini A, Melis C, Tiribilli B y Castellini C. The sun, the moon and the Sandhopper. En: *Studies In Crustacean Neuroscience: Comparative Approaches To The Investigation Of The Nervous System.* (Wiese K Ed.). (2002).
- Utting M, Agricola HJ, Sandeman R y Sademan D. Central complex in the brain of crayfish and its possible homology with that of insects. *J Comp Neurol.* 416: 245-261. (2000).
- Von Frisch, K. The dance language and orientation of bees. Harvard Univ Press. (1967).
- Waldrop B y Glantz R. Nonspiking local interneurons mediate surround inhibition of crayfish sustaining fibers. *J Comp Physiol* 156: 763-774. (1985).
- Wang-Bennett LT y Glantz RM. The functional organization of the crayfish lamina ganglionaris. I. Nonspiking monopolar neurons. *J Comp Physiol* 161: 131-145. (1987a).
- Wang-Bennett LT y Glantz RM. The functional organization of the crayfish lamina ganglionaris. II. Large field spiking and nonspiking cells. *J Comp Physiol* 161: 147-160. (1987b).
- Wang-Bennett LT, Pfeiffer C, Arnold J y Glantz RM. Acetylcholine in the crayfish optic lobe: concentration profile and cellular localization. *J Neurosci.* 9(6): 1864-1871. (1989).
- Warzecha A y Egelhaaf M. Response latency of a motion-sensitive neuron in the fly visual system: dependence on stimulus parameters and physiological conditions. *Vision Res.* 40(21): 2973-2983. (2000).

- Waterman TH. Polarization sensitivity. En: Handbook of sensory physiology, Vol. VII/ 6B (Autrum H Ed.). Berlin-Heidelberg-New York: Springer. (1980).
- Waterman TH y Wiersma CAG. Electrical responses in decapod crustacean visual systems. *J Cell Comp Physiol* 61: 1-16. (1963).
- Waterman TH, Wiersma CAG y Bush BM. Afferent visual responses in the optic nerve of the crab *Podophthalmus*. *J Cell Comp Physiol* 63: 135-155. (1964).
- Weckstrom M, Laughlin SB. Visual ecology and voltage-gated ion channels in insect photoreceptors. *Trends Neurosc* 18: 17-21. (1995).
- Wiersma CAG. Integration in the visual pathway of crustacea. *Symp Soc Exp Biol* 20: 151-177. (1966).
- Wiersma CAG. Reflexes and the central nervous system. En: *The Physiology of Crustacea*, vol 2. Waterman TH ed, Academic Press, New York, págs. 241-279. (1961).
- Wiersma CA, Fiore L. Unidirectional rotation neurones in the optomotor system of the crab, *Carcinus*. *J Exp Biol.* 54(2): 507-13. (1971).
- Wiersma CAG, Hou HE y Martini EM. Visually reacting neuronal units in the optic nerve of the crab *Pachygrapsus crassipes*. *Proc. K. Ned. Akad. Wet.* 80: 135-143. (1977).
- Wiersma CAG, Roach JLM y Glantz RM. Neural integration in the optic system. En: *The biology of the crustacea*, vol 4. Neural integration and Behavior. (Sandeman DC y Atwood HL Ed.). New York: Academic Press, págs 1-31. (1982).
- Wiersma CAG y Yamaguchi T. The integration of visual stimuli in the rock lobster. *Vision Res* 7:197-204. (1967a).
- Wiersma CAG y Yamaguchi T. Integration of visual stimuli by the crayfish central nervous system. *J Exp Biol* 47:409-431. (1967b).
- Wood HL y Glantz RM. Distributed processing by visual interneurons of crayfish brain. I. Response characteristics and synaptic interactions. *J Neurophysiol.* 43(3): 729-740. (1980a)
- Wood HL, Glantz RM. Distributed processing by visual interneurons of crayfish brain. II. Network organization and stimulus modulation of synaptic efficacy. *J Neurophysiol.* 43(3): 741-753. (1980b).
- York B y Wiersma CAG. Visual processing in the rock lobster (crustacea). *Progress in Neurobiol* 5: 127-166. (1975).
- Yoshino M, Kondoh Y y Hisada M. Projections of the statocyst sensory neurons associated with crescent hairs in the crayfish, *Procambarus clarkii* Giard. *Cell Tissue Res.* 230: 37-48. (1983).
- Young JZ. Structure of nerve fibres and synapses in some invertebrates. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 4: 1-6. (1936).
- Zars T, Fischer M, Schulz R y Heisenberg M. Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* 288(5466): 672-675. (2000).
- Zeil J. The control of optic flow during learning flights. *J Comp Physiol (A)* 180: 25-38. (1996).
- Zeil J, Nalbach G y Nalbach HO. Eyes, eye stalks and the visual world of semi-terrestrial crabs. *J Comp Physiol* 159: 801-811. (1986).

Zeil J, Nalbach G y Nalbach HO. Spatial vision in a flat world: optical and neural adaptations in arthropods. En: Neurobiology of sensory systems. (Singh RN y Strausfeld NJ Eds.) Plenum Press, New York, pp 123-137. (1989).

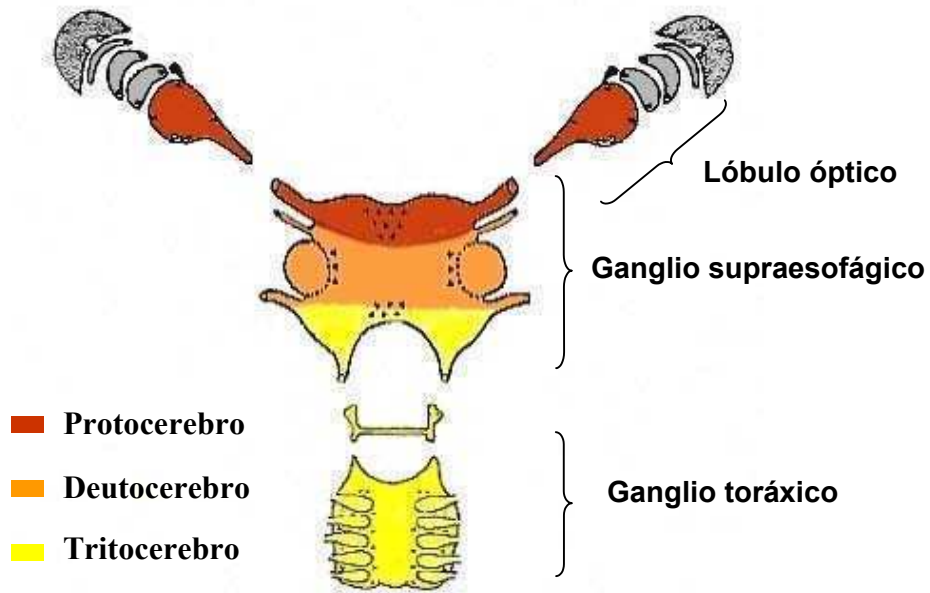
Zhang SW, Srinivasan MV y Collett T. Convergent processing in honeybee vision: multiple channels for the recognition of shape. Proc Natl Acad Sci USA. 92(7):3029-3031. (1995).

Figura 1: El cangrejo *Chasmagnathus granulatus*.

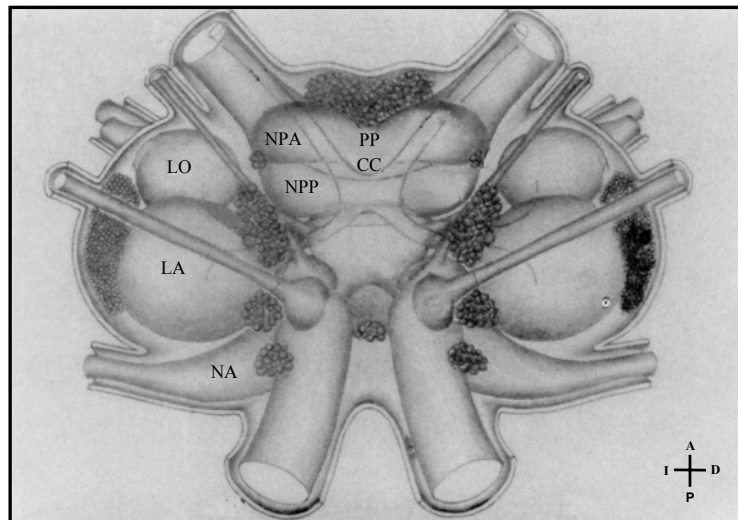


Un cangrejo *Chasmagnathus granulatus* macho en el laboratorio. En el extremo de los pedúnculos móviles se pueden ver sus ojos.

Figura 2: El sistema nervioso de un decápodo adulto.

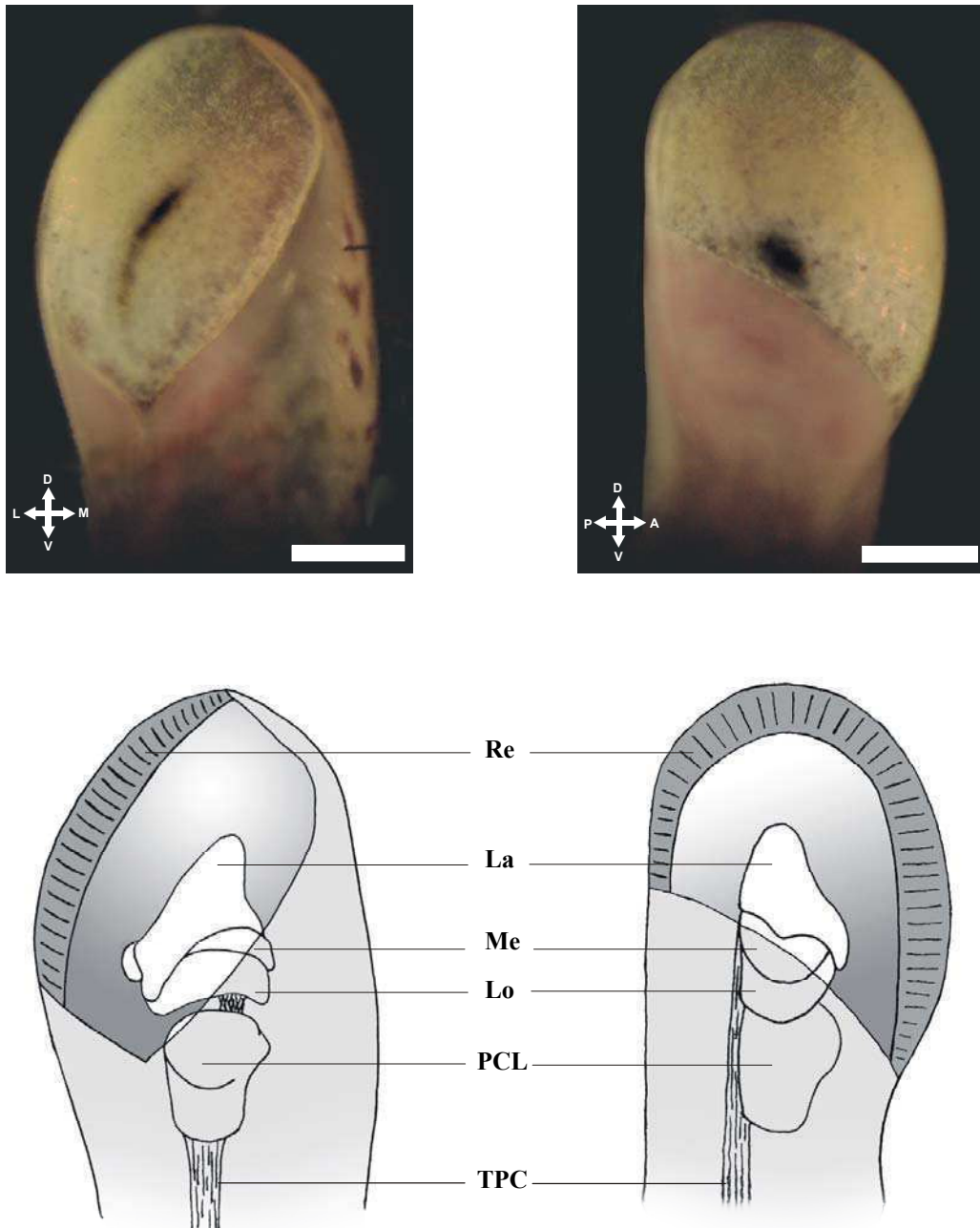


Esquema del sistema nervioso de un decápodo adulto. Los tres centros nerviosos principales son el lóbulo óptico (estructura par), el ganglio supraesofágico y el ganglio torácico. El lóbulo óptico se ubica dentro del pedúnculo ocular y se conecta al ganglio supraesofágico por el tracto protocerebral. El ganglio supraesofágico se ubica en la región anterior ventral del cuerpo del animal (cefalotórax) y el ganglio torácico también en posición ventral pero más caudal que el supraesofágico. En este esquema se representa en *colores* el origen embrionario de los distintos centros nerviosos. Rojo: protocerebro; naranja: deutocerebro; amarillo: tritocerebro; gris: otro origen.

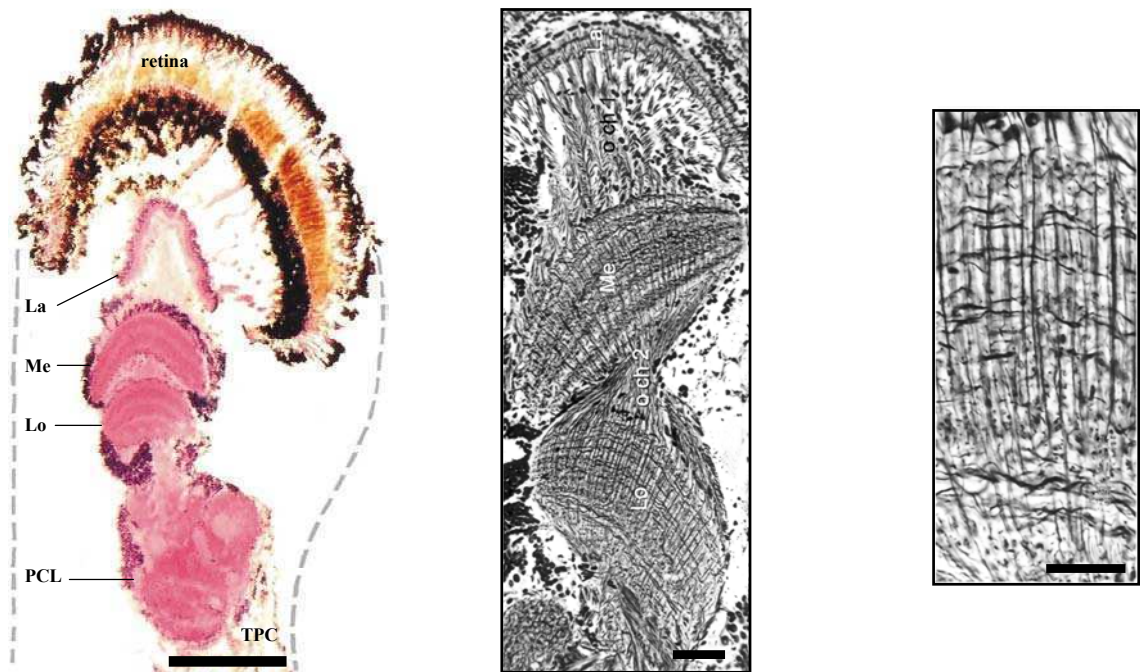
Figura 3: Estructura del ganglio supraesofágico.

Esquema del ganglio supraesofágico de un cangrejo desde una vista dorsal. Algunos de los neuropilos que lo conforman son el neuropilo protocerebral anterior (NPA), el neuropilo protocerebral posterior (NPP), el puente protocerebral (PP), el cuerpo central (CC), el lóbulo olfatorio (LO), el neuropilo lateral de la antena I (NA) y el lóbulo accesorio (LA). Si bien en el esquema no se ilustran todos los agrupamientos de cuerpos neuronales, aquí se puede observar cómo estos se encuentran ubicados en la periferia de los neuropilos. Esquema original hecho por Sandeman (1992). Coordenadas: A, anterior; P, posterior; I, izquierda y D, derecha.

Figura 4: Ojo compuesto y lóbulo óptico.

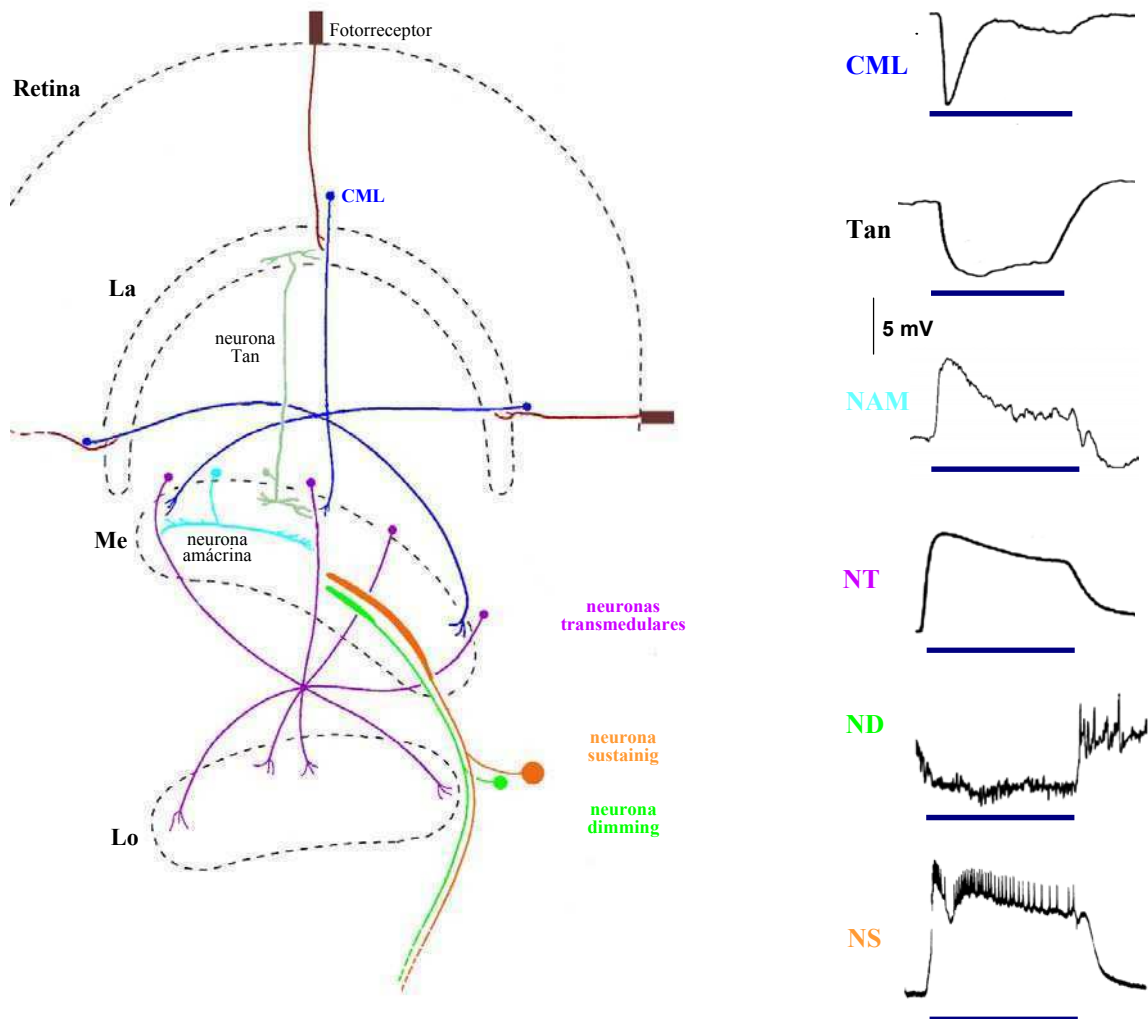


El pedúnculo ocular derecho de un cangrejo *Chasmagnathus granulatus*. Sobre la *izquierda* se lo observa desde una perspectiva anterior y sobre la *derecha* desde una perspectiva lateral. El ojo compuesto, en la mitad superior del pedúnculo, se ve con una tonalidad amarillada. La mancha negra en la retina corresponde a la pseudopupila. La cutícula o exoesqueleto del pedúnculo se ve en tono rosado y marrón claro. *Abajo a la izquierda* se muestra un esquema del pedúnculo desde una perspectiva anterior y *abajo a la derecha* desde una perspectiva lateral. Por transparencia se ilustra la disposición y dimensiones de los distintos neuropilos que conforman el lóbulo óptico. Estos neuropilos son: la lámina (La), la médula (Me), la lóbula (Lo) y el protocerebro lateral (PCL). El tracto protocerebral (TPC) comunica al lóbulo óptico con el ganglio supraesofágico. Las escalas de tamaño representan 500 μm . Esquema hecho por Berón de Astrada y Tomsic (2002).

Figura 5: Citoarquitectura de los neuropilos ópticos.

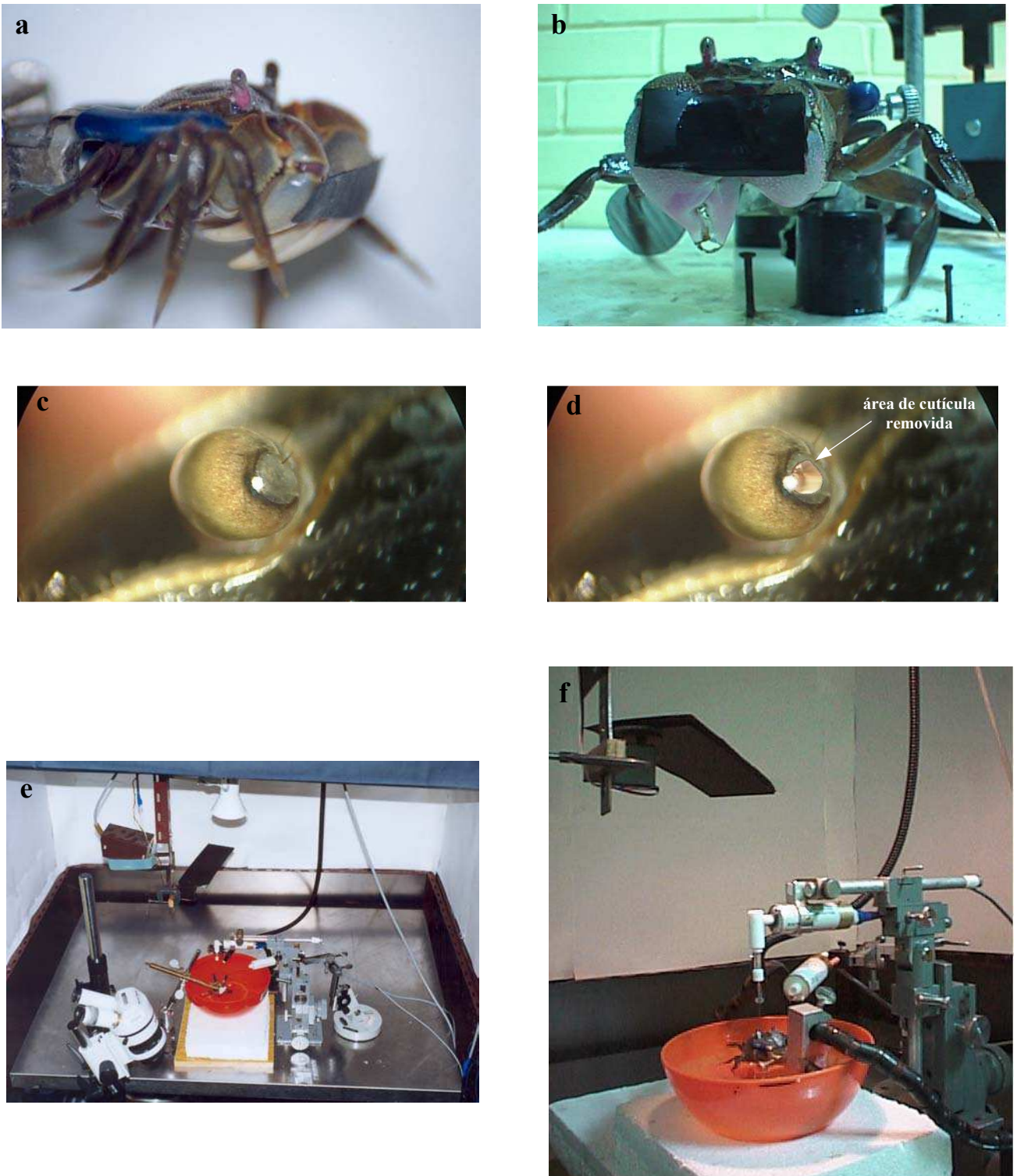
En la foto de la *izquierda* se ilustra una rebanada de la retina y del lóbulo óptico de *Chasmagnathus*. El preparado está teñido con eosina hematoxilina por lo que en rosado se tiñen las regiones neuríticas y en violeta oscuro los cuerpos neuronales. Estos se encuentran en la superficie de los neuropilos mientras que las neuritas constituyen casi la totalidad del volumen del neuropilo. En el *centro* se muestra una tinción de plata de los tres neuropilos ópticos: la lámina (La), la médula (Me) y la lóbula (Lo). Obsérvese la estructura ordenada de estos neuropilos: los elementos neuronales se encuentran dispuestos formando arreglos columnares y laminares (horizontales). La foto de la *derecha* es una ampliación de la foto del centro donde pueden observarse con mayor detalle la estructura columnar y los estratos tangenciales de la médula. Las *escalas* de tamaño representan: 500 μm en la figura de la izquierda, 120 μm en la del centro y 10 μm en la de la derecha. PCL y TPC señalan el protocerebro lateral y el tracto protocerebral respectivamente. OCH 1 y OCH 2 señalan el primer y segundo quiasma óptico. La figura de la izquierda corresponde a un preparado de *Chasmagnathus* hecho por el autor y las figuras del centro y de la derecha fueron tomadas de Sinakevitch et al. (2003) y corresponden a un langostino.

Figura 6: Elementos del sistema visual de crustáceos.



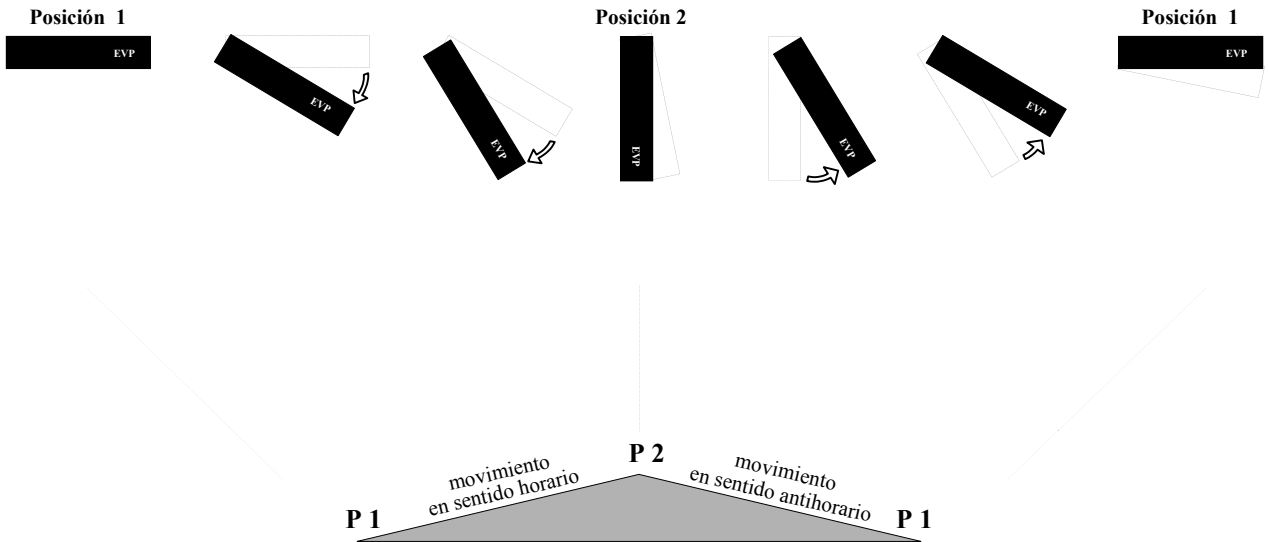
A la *izquierda* se muestra un esquema de la ubicación y morfología general de las interneuronas mejor estudiadas de los neuropilos ópticos de crayfish. En el esquema se puede observar la disposición columnar y/o tangencial de estos elementos. Los fotorreceptores de cada omatidia transducen la información lumínica a nivel de la retina y sus axones proyectan retinotópicamente a la lámina donde hacen sinapsis directamente con las células monopolares de la lámina (CML). Estas interneuronas proyectan retinotópicamente de la lámina a la médula. Allí transmiten la información a las neuronas columnares del neuropilo, las neuronas transmedulares (NT). Algunas de las NT proyectan sobre la misma médula (no están en el esquema) y otras, también retinotópicamente, sobre la lóbula. Las NT que arborizan en la médula inervarían a las neuronas sustaining (NS), a las neuronas dimming (ND) y probablemente a las neuronas amácrinas de la médula (NAM). Estas últimas inhibirían lateralmente a las NT de columnas vecinas. Otras de las interneuronas que arborizan en la médula son las neuronas Tan, las que estarían involucradas en transmitir información centrífuga desde la médula hacia la lámina. Las NS y ND colectan e integran la información proveniente de un mosaico extenso de columnas y la transmiten al ganglio supraesofágico. No existen aún estudios sobre neuronas identificadas de la lóbula. A la *derecha* se muestran registros intracelulares de la respuesta frente a un pulso de luz (PL) de algunas de las interneuronas recién descritas. Las tres primeras neuronas graficadas responden únicamente de manera gradual al PL mientras que las NS y ND responden disparando potenciales de acción. Debajo de cada registro, la barra representa la estimulación con un PL de un 1 seg de duración. La escala de voltaje es la misma para todos los registros. El esquema ha sido modificado de Glantz (2002). Los registros fueron copiados desde diferentes publicaciones de Glantz y colaboradores.

Figura 7: La preparación experimental para estudios electrofisiológicos en *Chasmagnathus*.



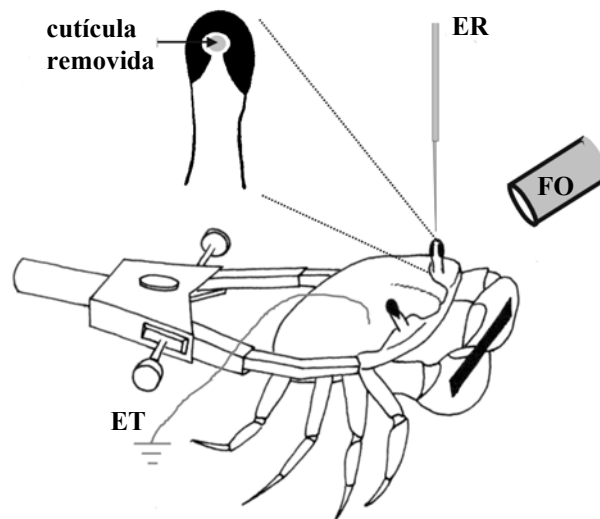
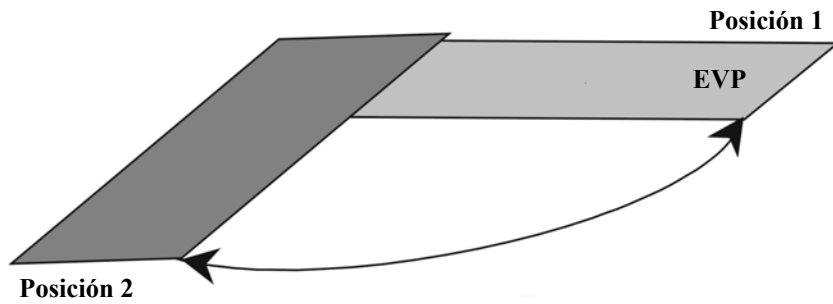
a) Vista lateral de la preparación, notar el brazo azul de la pinza regulable con que se sujeta al cangrejo y la banda negra de goma con que se sujetan sus quelas. **b)** Vista frontal de la preparación con los pedúnculos oculares fijados en posición. **c)** Vista superior del ojo compuesto que incluye el área de cutícula que se remueve para la penetración del electrodo. **d)** Vista superior del ojo compuesto una vez removida parte de la cutícula. **e)** Panorama del dispositivo experimental. **f)** Foto de la preparación experimental donde se distinguen: el cangrejo sujeto y semisumergido en agua, el micromanipulador acoplado al electrodo de registro, el estímulo visual de peligro (EVP), y la fibra óptica que baja del techo (por detrás del electrodo).

Figura 8: Desplazamiento del EVP.



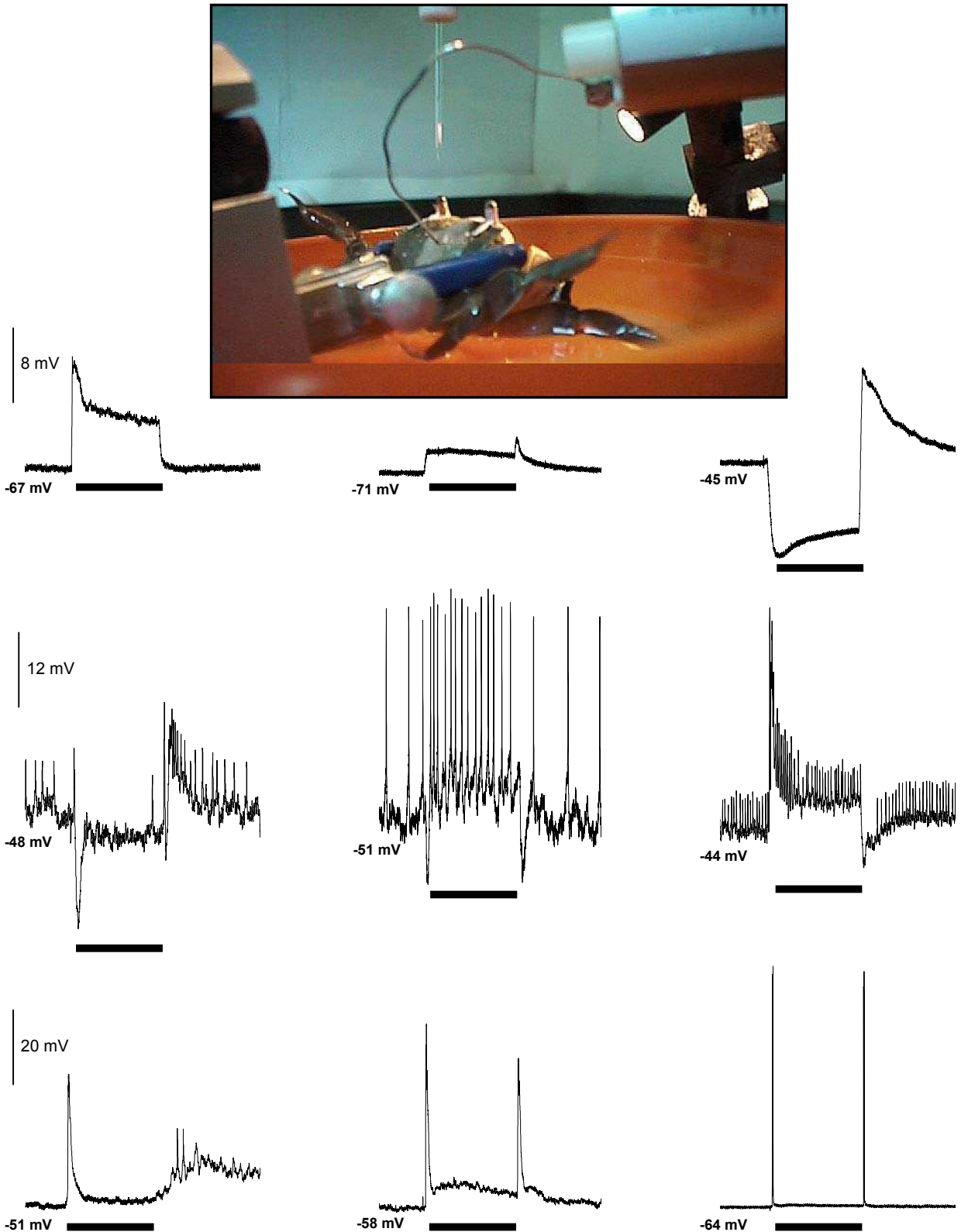
En el *panel superior*, se ilustra la trayectoria y el sentido de desplazamiento de la pantalla que en conjunto constituyen el EVP que usamos en este trabajo. La pantalla, pivoteando sobre uno de sus extremos, recorre primero 90° desde una posición 1 hasta una posición 2 y, sin pausa, desanda los mismos 90° desde la posición 2 hasta volver a la posición 1. Visto desde arriba (como en este esquema) el desplazamiento de la pantalla en la primera parte del ciclo se realiza en sentido horario y la segunda parte del ciclo en sentido antihorario. El ciclo completo dura 2,2 seg. En el *panel inferior*, el triángulo representa el ciclo de estimulación con el EVP. A lo largo de la tesis usaremos este símbolo para representar la estimulación con el EVP, lo que facilita la identificación de la posición y del sentido de desplazamiento de la pantalla. P1 y P2 significan posición 1 y posición 2 respectivamente.

Figura 9: Esquema de la preparación experimental y de los estímulos visuales.



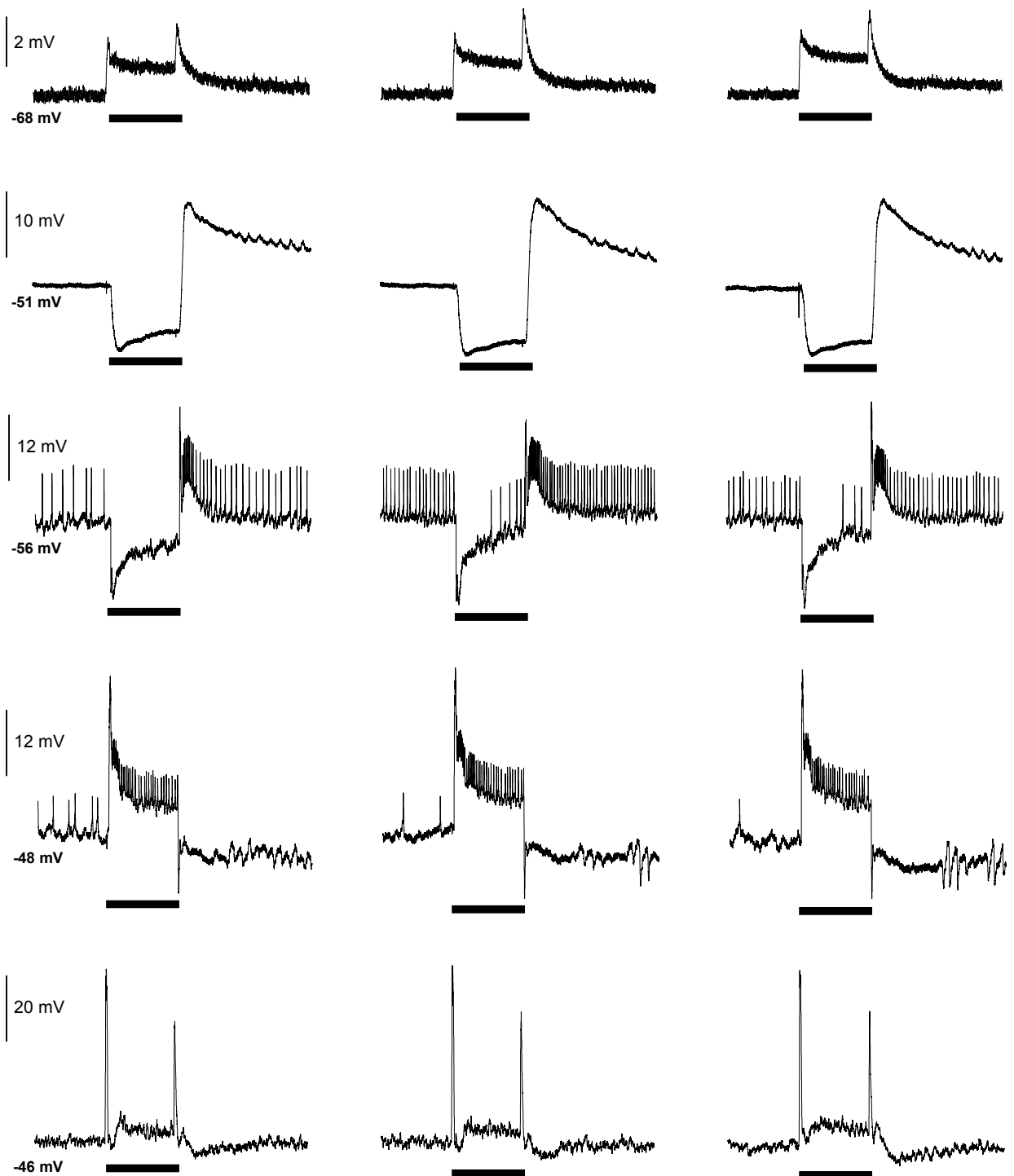
Esta figura resume las características de la preparación experimental que desarrollamos y utilizamos en este trabajo. Puede observarse, además, un esquema del pedúnculo desde una perspectiva medial y el área de cutícula que se le remueve. Las abreviaturas corresponden a: EVP, estímulo visual de peligro; FO, fibra óptica; ER, electrodo de registro; y ET, electrodo de tierra.

Figura 10: Registros intracelulares en el cangrejo intacto.

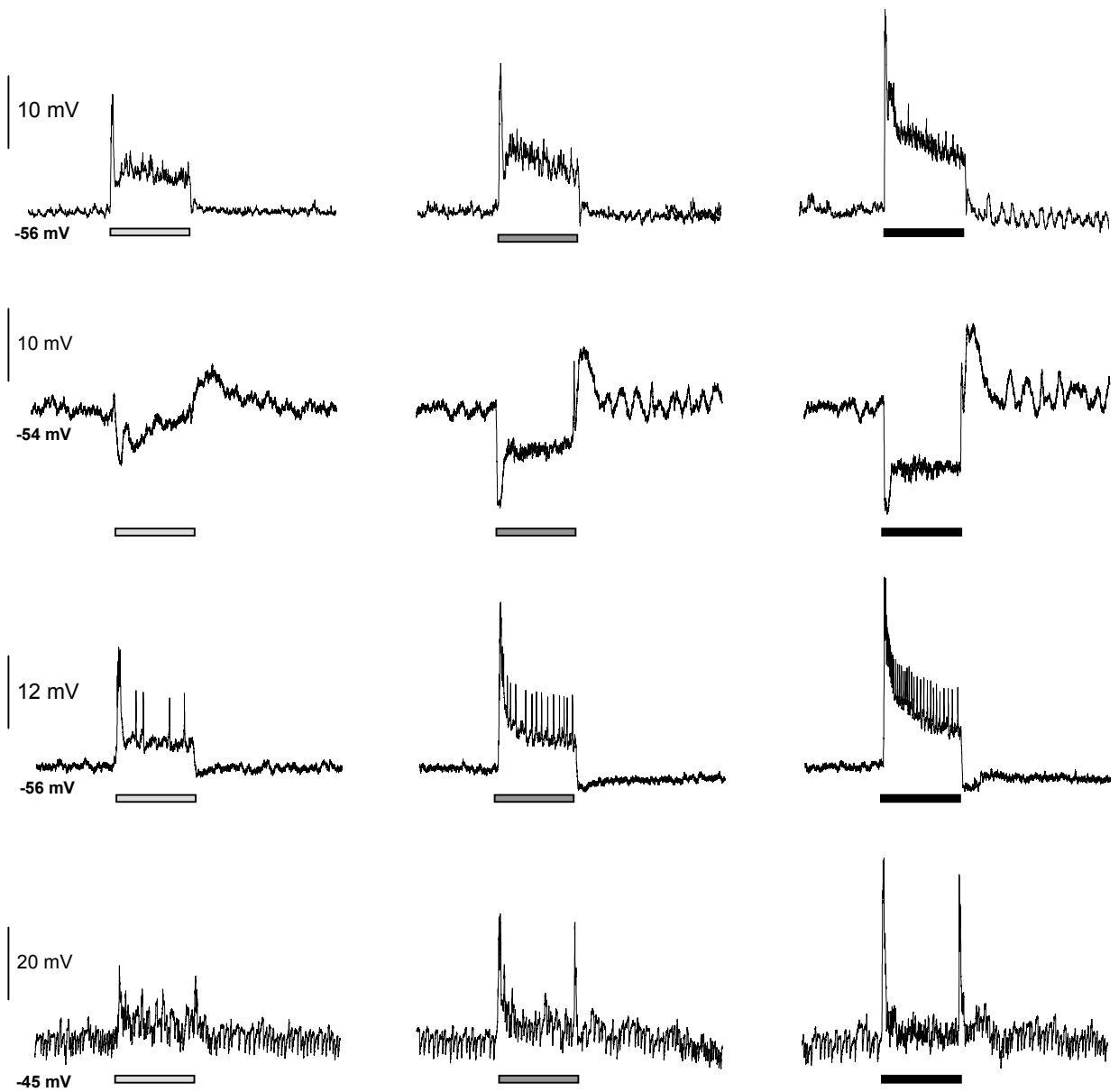


La *foto* muestra al cangrejo semisumergido en agua moviendo sus patas caminadoras al mismo tiempo que se registra intracelularmente la actividad de interneuronas del lóbulo óptico. Los registros de la figura muestran la respuesta a un pulso de luz (PL) de distintas interneuronas del cangrejo. En la *fila superior* se muestran registros de neuronas con respuestas pasivas tónicas al PL, en la *fila media* registros de neuronas que también responden de manera tónica al PL pero que disparan potenciales de acción (PAs) y en la *fila inferior* registros de neuronas que frente al mismo estímulo responden de manera fásica. Debajo, a la izquierda de cada registro se indica el potencial de membrana de reposo. La *barra negra* representa la estimulación con un PL de 1 segundo de duración.

Figura 11: Reproducibilidad de los registros.

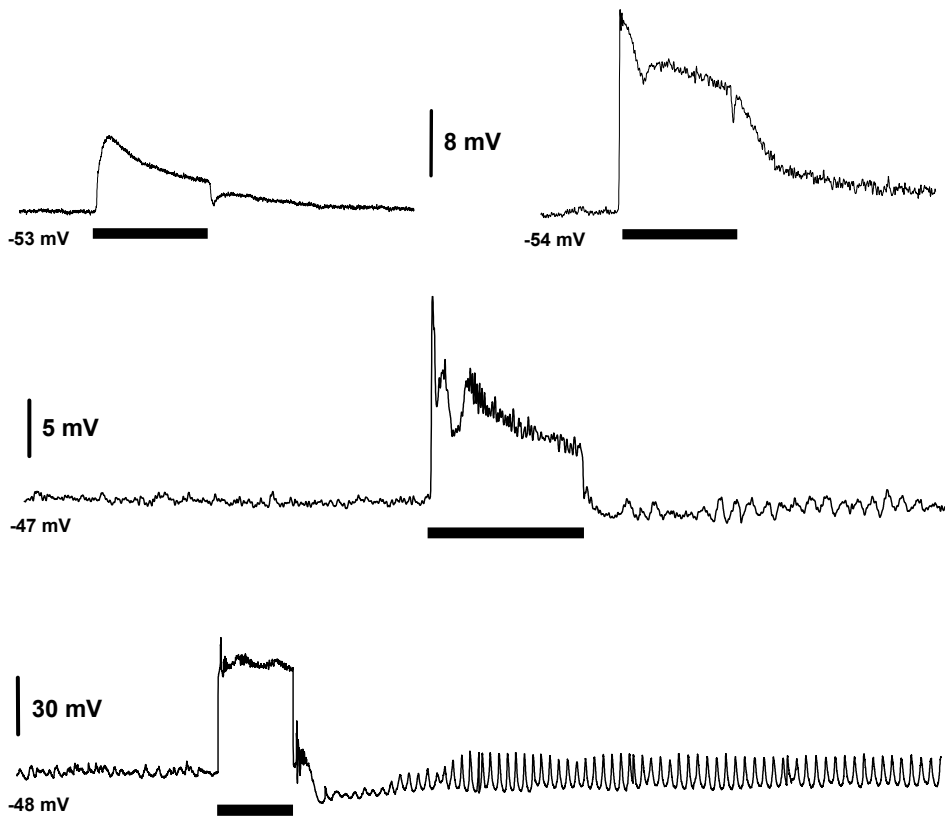


Cada *fila* muestra la respuesta de una neurona distinta frente a la presentación repetida del PL. En cada caso el intervalo entre presentaciones del estímulo es de 10 minutos. No se observan diferencias en las respuestas neuronales al PL por el tiempo que duran estos registros intracelulares. Este resultado se repite aún cuando en muchos casos los registros se extienden por más de 2 horas. La consistencia en la respuesta neuronal frente a la estimulación visual da cuenta de la viabilidad celular por el tiempo que duran los registros en la preparación experimental. La *barra negra* indica la estimulación con un PL de 1 segundo de duración.

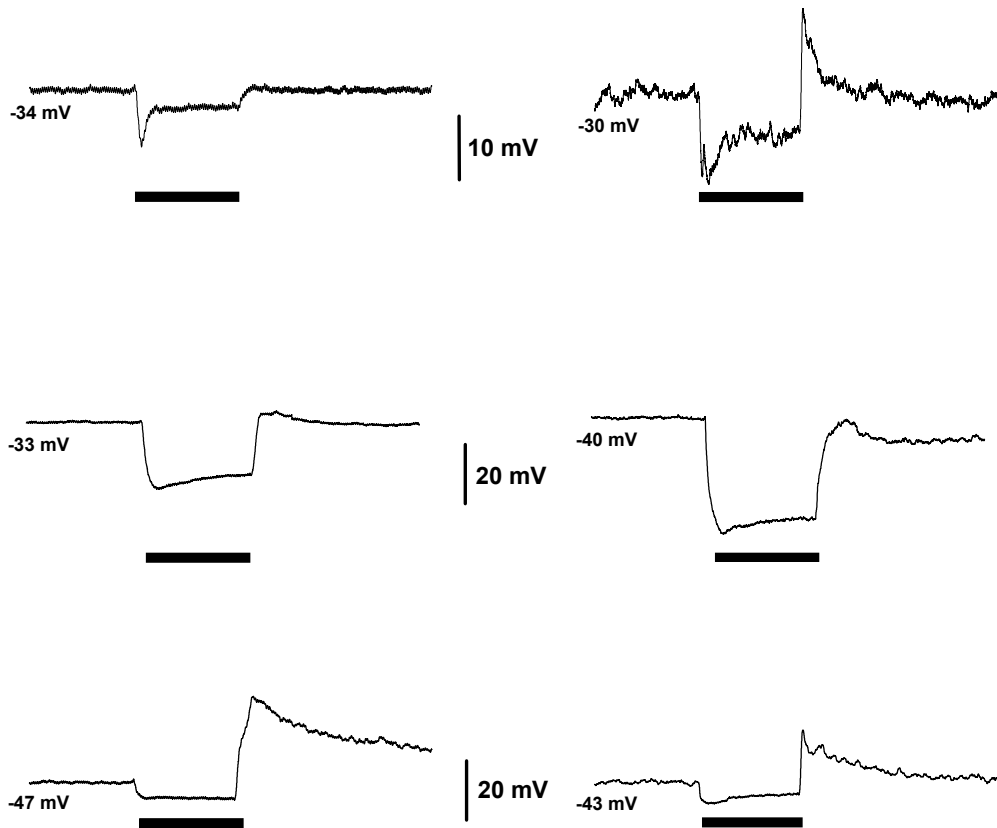
Figura 12: Dependencia de la respuesta neuronal por la intensidad del PL.

Cada *fila* muestra la respuesta de una neurona distinta frente a la estimulación repetida a intensidades crecientes del PL. En las neuronas estudiadas la respuesta al PL aumentó conforme crecía la intensidad de estimulación. Este resultado se obtuvo con independencia del orden en que se realizó la secuencia de estimulación (intensidad creciente, decreciente o al azar). La *barra gris claro* representa una intensidad de estimulación de 1 W/m^2 (*columna de la izquierda*), la *barra gris oscuro* representa 10 W/m^2 (*columna central*), y la *barra negra* 120 W/m^2 (*columna de la derecha*, intensidad del PL en todos los experimentos de esta tesis). El intervalo entre presentaciones del PL fue de 1 minuto y este duró 1 segundo en todos los casos.

Figura 13: Neuronas pasivas tónicas depolarizantes.

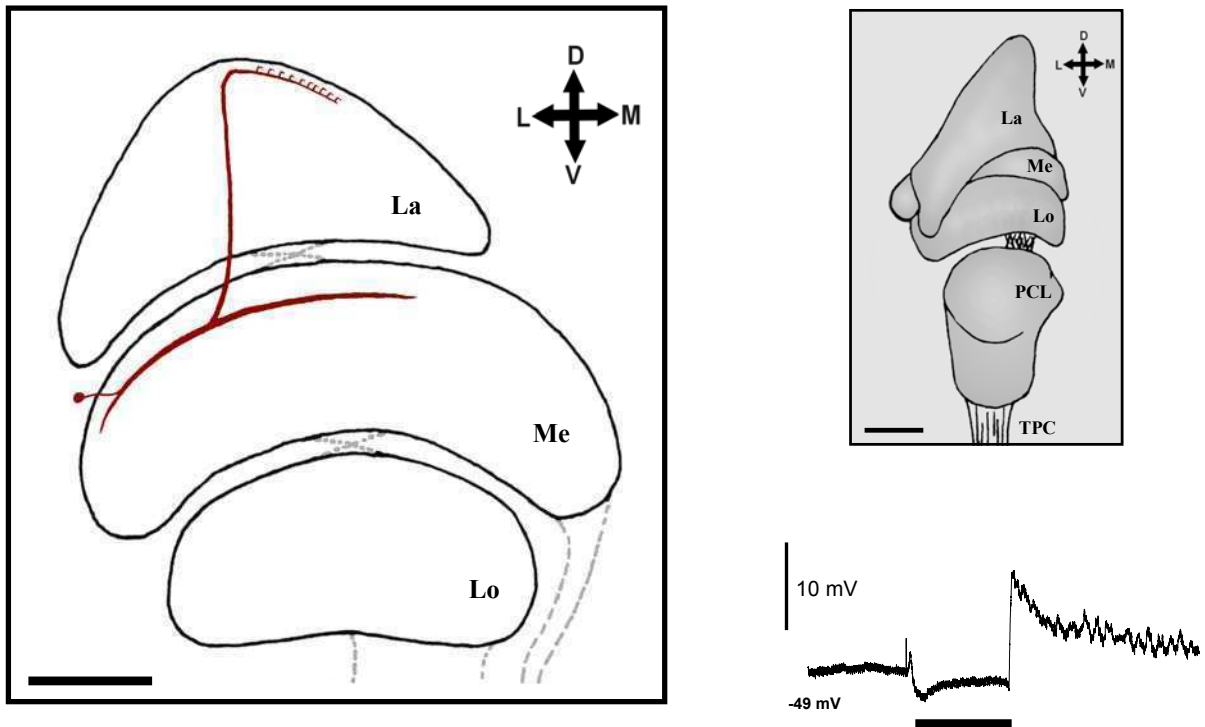


Estas neuronas del cangrejo responden con una depolarización gradual frente a un PL. En crayfish se describieron dos tipos neuronales con este perfil de respuesta: neuronas transmedulares y neuronas amácrinas de la médula. Los registros muestran la respuesta al PL de neuronas de *Chasmagnathus* que corresponderían a alguno de estos tipos neuronales descritos en crayfish. Los trazos de la *fila media* e *inferior* muestran además las oscilaciones del potenciales de membrana que en muchas de las neuronas estudiadas se registran después del apagado del PL. La *barra negra* representa la estimulación con un PL de 1 segundo de duración.

Figura 14: Neuronas pasivas tónicas hiperpolarizantes.

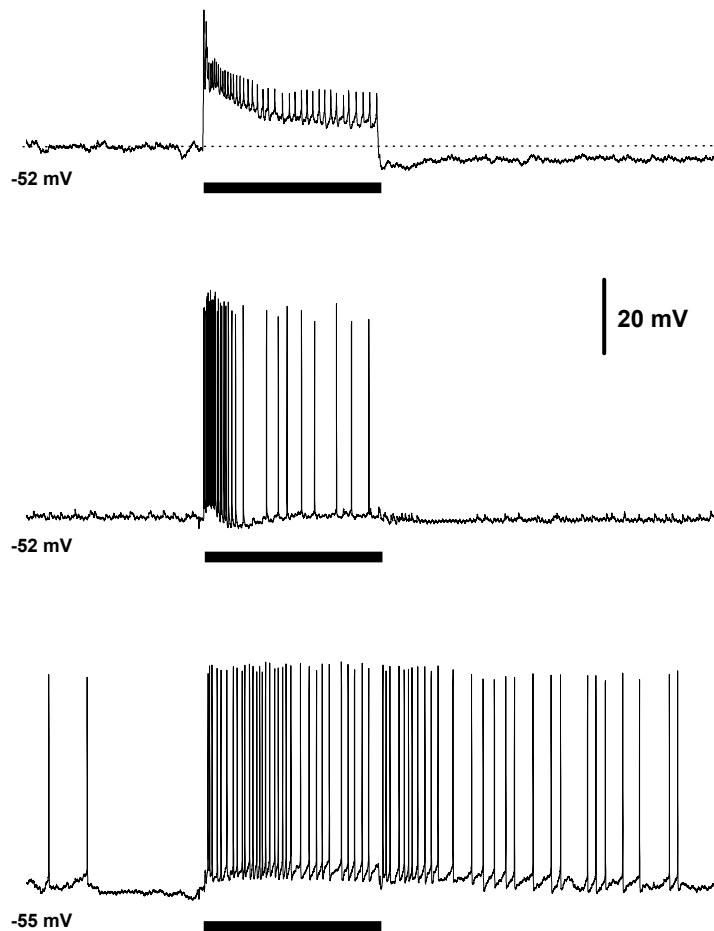
La característica común de estas neuronas de *Chasmagnathus* es su respuesta gradual hiperpolarizante frente al PL. En crayfish se describieron tres clases neuronales con este tipo de respuesta. Según el curso temporal de la hiperpolarización durante la presentación del PL y la posterior depolarización, las neuronas de la *fila superior* corresponderían a neuronas monopolares de la lámina de crayfish; las de la *fila media* a neuronas amácrinas de la lámina; y las de la *fila inferior* a neuronas Tan. Barra: PL de 1 segundo.

Figura 15: Ubicación y morfología general de neuronas Tan del cangrejo.

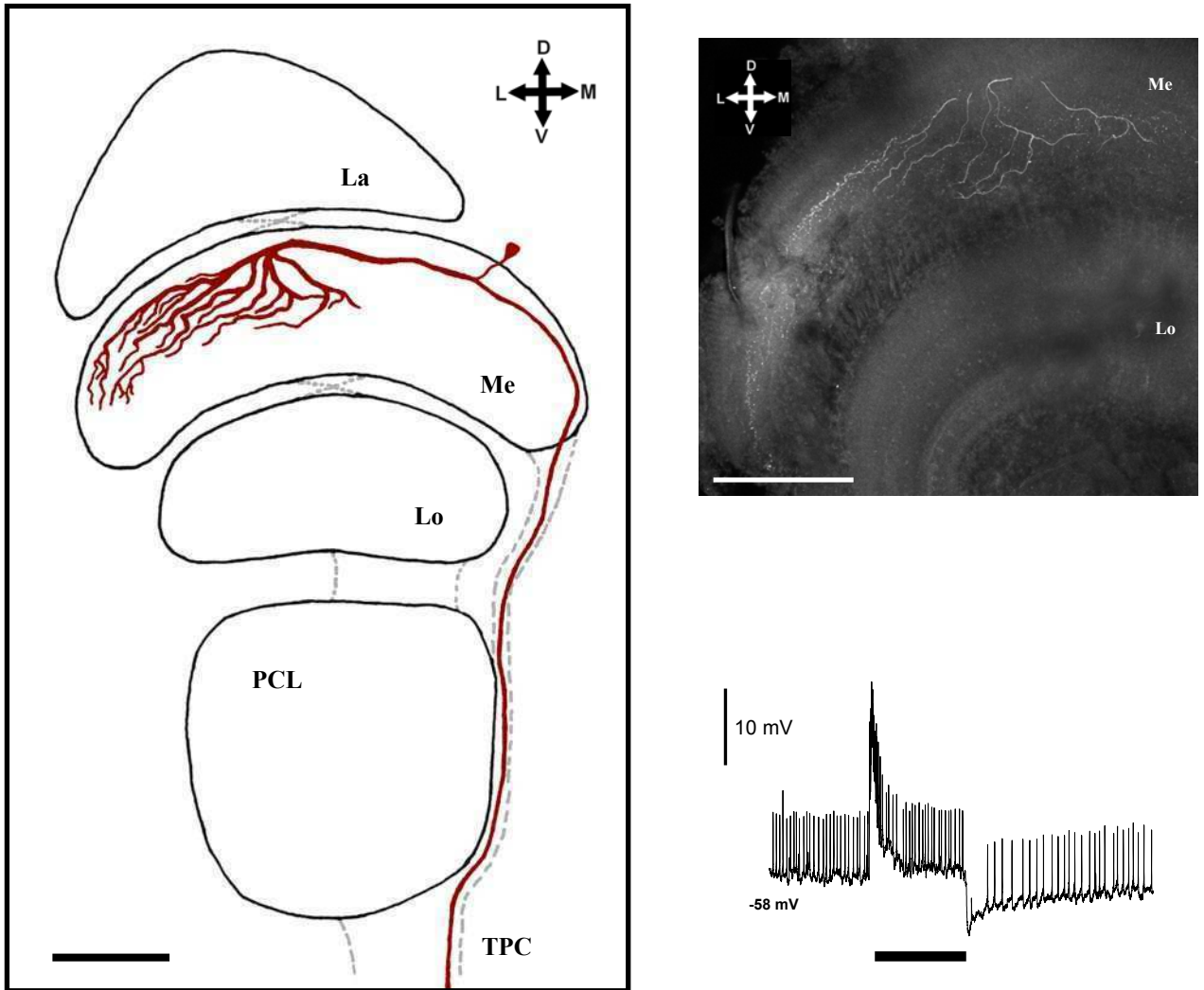


Panel de la izquierda: reconstrucción desde una perspectiva anterior de la ubicación y morfología general de una neurona Tan del cangrejo. Todas las neuronas Tan teñidas ($n=6$) se ubican en la lámina y en la médula. En los preparados en que se pudo identificar el soma se lo encontró en la capa de cuerpos celulares ubicada por encima de la médula. Si bien en la neurona que se reconstruye aquí se observó una sola neurita tangencial en la médula, en general, las neuronas Tan arborizan más profusamente en este neuropilo (siempre de manera tangencial por un mismo estrato). Estos procesos tangenciales convergen en una neurita principal que asciende hacia la lámina donde arboriza en procesos más delgados que se distribuyen entre las columnas del mosaico retinotópico. En algunos casos se observó que estos procesos se disponen en los dos estratos horizontales del neuropilo. La reconstrucción en 2D de la neurona de esta figura se realizó dibujando los segmentos neuronales observados con un microscopio de fluorescencia en cortes seriados anteriores del lóbulo óptico. Las escalas de tamaño representan 150 μm . Abreviaturas como en la figura 4. *Abajo a la derecha* se muestra la respuesta al PL (antes de inyectar Lucifer yellow) de la neurona Tan que se reconstruyó aquí.

Figura 16: Neuronas sustaining.

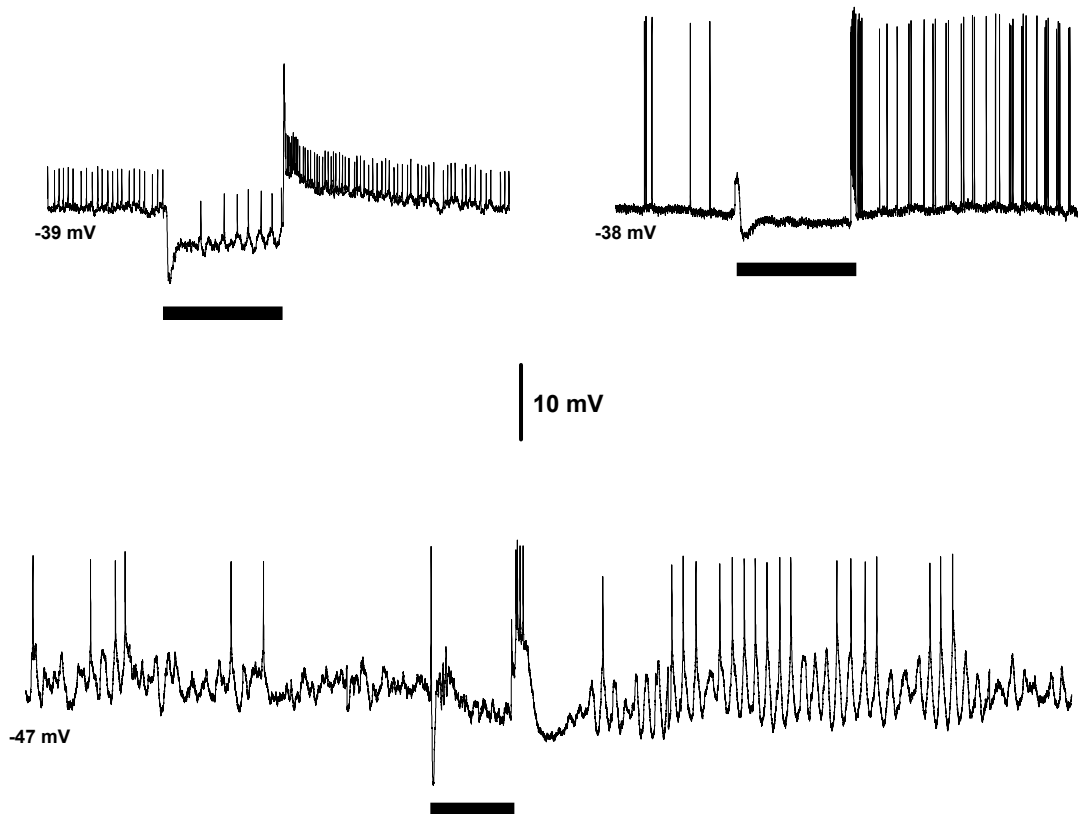


Los tres registros que se muestran aquí corresponden a neuronas sustaining del cangrejo. Los tres tienen en común una respuesta sostenida con disparo de PAs frente a un PL. La neurona del *registro superior* muestra un perfil de respuesta similar al reportado en crayfish, caracterizado por un potencial excitatorio (PEP) importante durante el PL y una hiperpolarización al finalizar el estímulo. El *registro del medio* si bien no tiene exactamente estas características correspondería también a una neurona sustaining (ver texto). El *registro inferior*, en cambio, no presenta una inhibición ni una hiperpolarización en respuesta al apagado de la luz, lo que indicaría que se trata de una clase de neurona sustaining no descrita anteriormente. *Barra horizontal*: PL de 1 segundo.

Figura 17: Ubicación y morfología de las neuronas sustaining.

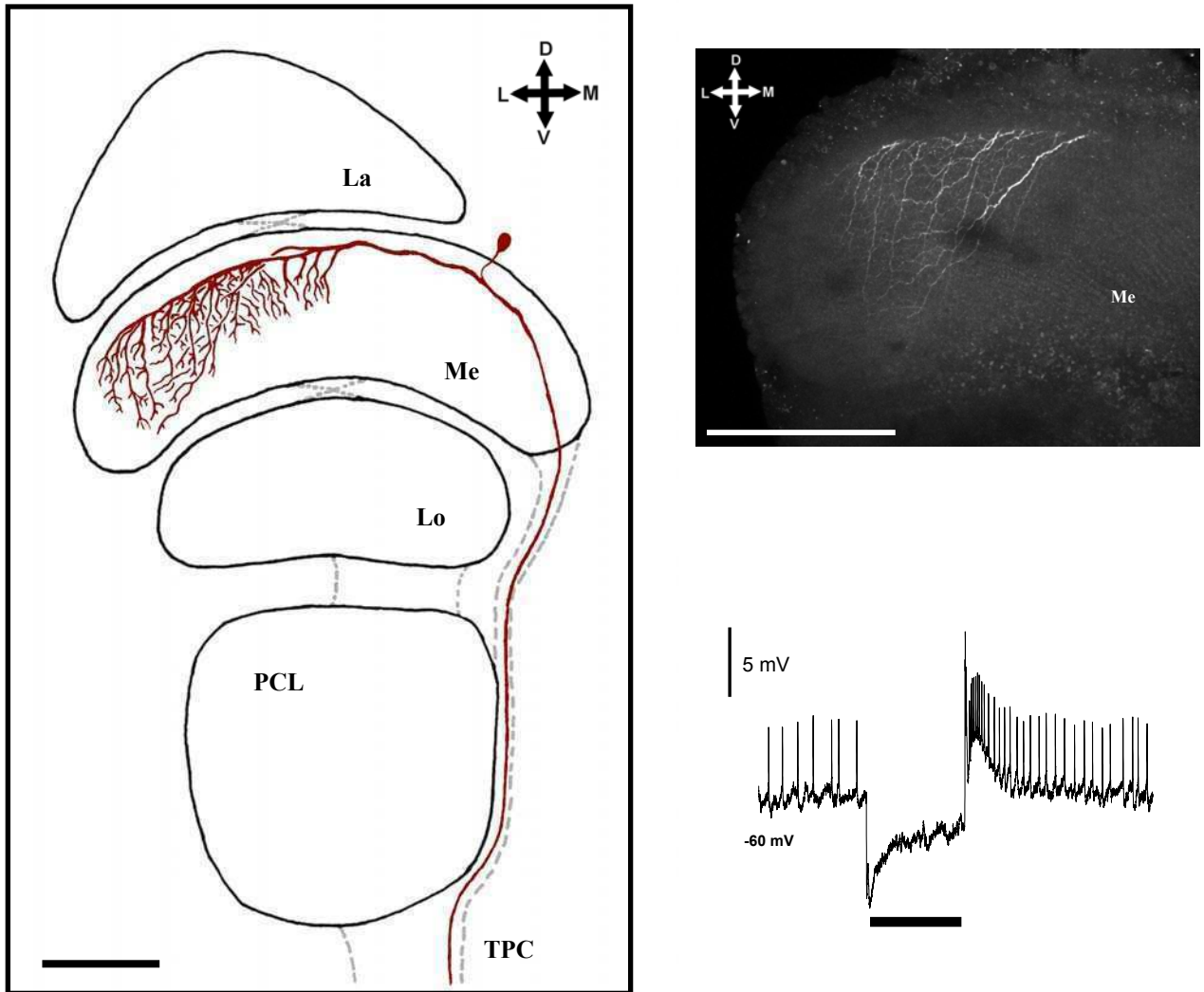
Panel de la izquierda: reconstrucción desde una perspectiva anterior de la ubicación y morfología de una neurona sustaining del cangrejo. Todas las neuronas sustaining teñidas ($n=7$) arborizan en un estrato de la médula. La forma de estas arborizaciones consiste en un conjunto de procesos tangenciales paralelos que corren por un mismo estrato en sentido latero medial. Estos procesos convergen en una neurita más gruesa que da lugar al axón. En la mayoría de las neuronas teñidas pudimos observar que el axón proyecta hacia el ganglio supraesofágico a través del tracto protocerebral. El soma de las neuronas sustaining lo encontramos en la capa de cuerpos celulares ubicada por encima de la médula y se conecta al axón a través de una neurita delgada. La reconstrucción en 2D de la neurona de esta figura se realizó dibujando los segmentos neuronales observados en secciones (ópticas) seriadas anteriores del lóbulo óptico (cada sección de $4\ \mu\text{m}$ de profundidad aproximadamente). En la *foto*, una sección óptica anterior de $30\ \mu\text{m}$ de profundidad, se observa una parte anterior de la arborización neuronal en la médula. Cabe aclarar que por tener la médula forma de domo, los procesos que se extienden por un mismo estrato tangencial impresionan en la reconstrucción en 2D (y en las secciones ópticas gruesas) como ocupando varios de estos estratos. Las escalas de tamaño de la foto y de la reconstrucción neuronal representan en ambos casos $150\ \mu\text{m}$. *Abajo a la derecha* se muestra la respuesta al PL (antes de inyectar neurobiotina) de la neurona sustaining que se reconstruyó aquí. Las abreviaturas como en las figuras anteriores.

Figura 18: Neuronas dimming.



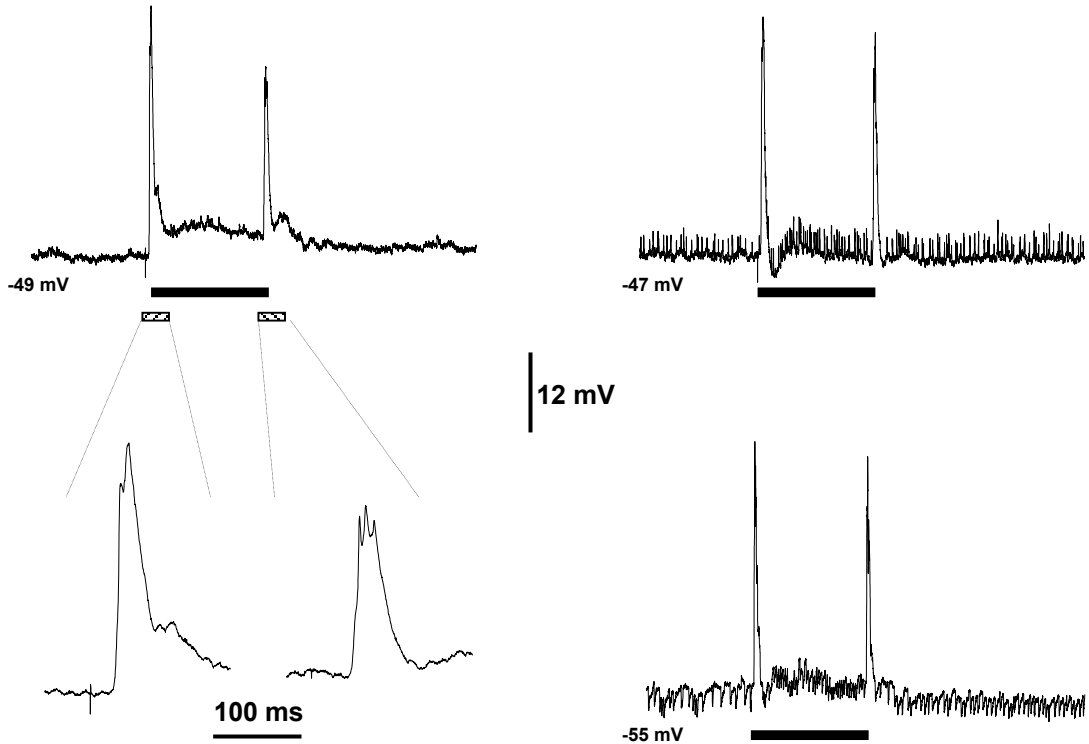
Los neuronas dimming tienen en común el disparo espontáneo de PAs en oscuridad y una reducción de la tasa disparo en condiciones de iluminación. Inmediatamente después de una estimulación intensa con luz presentan en general una depolarización acompañada por un incremento de la tasa de disparo de PAs. Los trazos de la figura ilustran los perfiles de respuesta que se registran en distintas neuronas de este tipo en *Chasmagnathus*. El registro *superior derecho* y el *inferior* muestran además las oscilaciones del potencial eléctrico que en muchas de estas neuronas se registran después del apagado del PL. *Barra horizontal*: PL de 1 segundo.

Figura 19: Ubicación y morfología de las neuronas dimming.



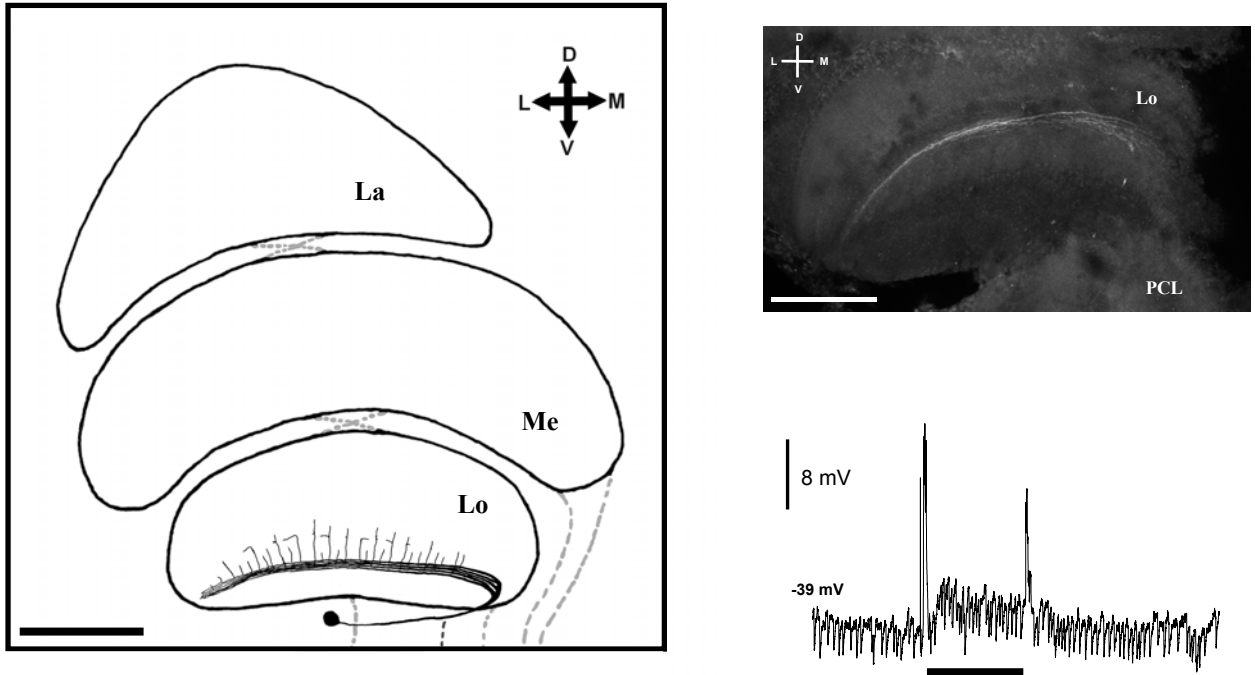
Panel de la izquierda: reconstrucción desde una perspectiva anterior de la ubicación y morfología de una neurona dimming del cangrejo. Todas las neuronas dimming teñidas ($n=8$) arborizan en un estrato de la médula. La forma de estas arborizaciones consiste en un conjunto de procesos tangenciales paralelos que corren por un mismo estrato en sentido lateromedial. Estos procesos convergen en una neurita más gruesa que da lugar al axón. En la mayoría de las neuronas teñidas pudimos observar que el axón proyecta hacia el ganglio supraesofágico a través del tracto protocerebral. El soma de las neuronas dimming lo encontramos en la capa de cuerpos celulares ubicada por encima de la médula y se conecta al axón a través de una neurita delgada. La reconstrucción en 2D de la neurona de esta figura se realizó dibujando los segmentos neuronales observados en secciones (ópticas) seriadas anteriores del lóbulo óptico (cada sección de $4\ \mu\text{m}$ de profundidad aproximadamente). En la *foto*, una sección óptica anterior de $50\ \mu\text{m}$ de profundidad, se observa una parte anterior de la arborización neuronal en la médula. Las escalas de tamaño de la foto y de la reconstrucción neuronal representan en ambos casos $150\ \mu\text{m}$. *Abajo a la derecha* se muestra la respuesta al PL (antes de inyectar neurobiotina) de la neurona dimming que se reconstruyó aquí. Las abreviaturas como en las figuras anteriores.

Figura 20: Neuronas on-off.



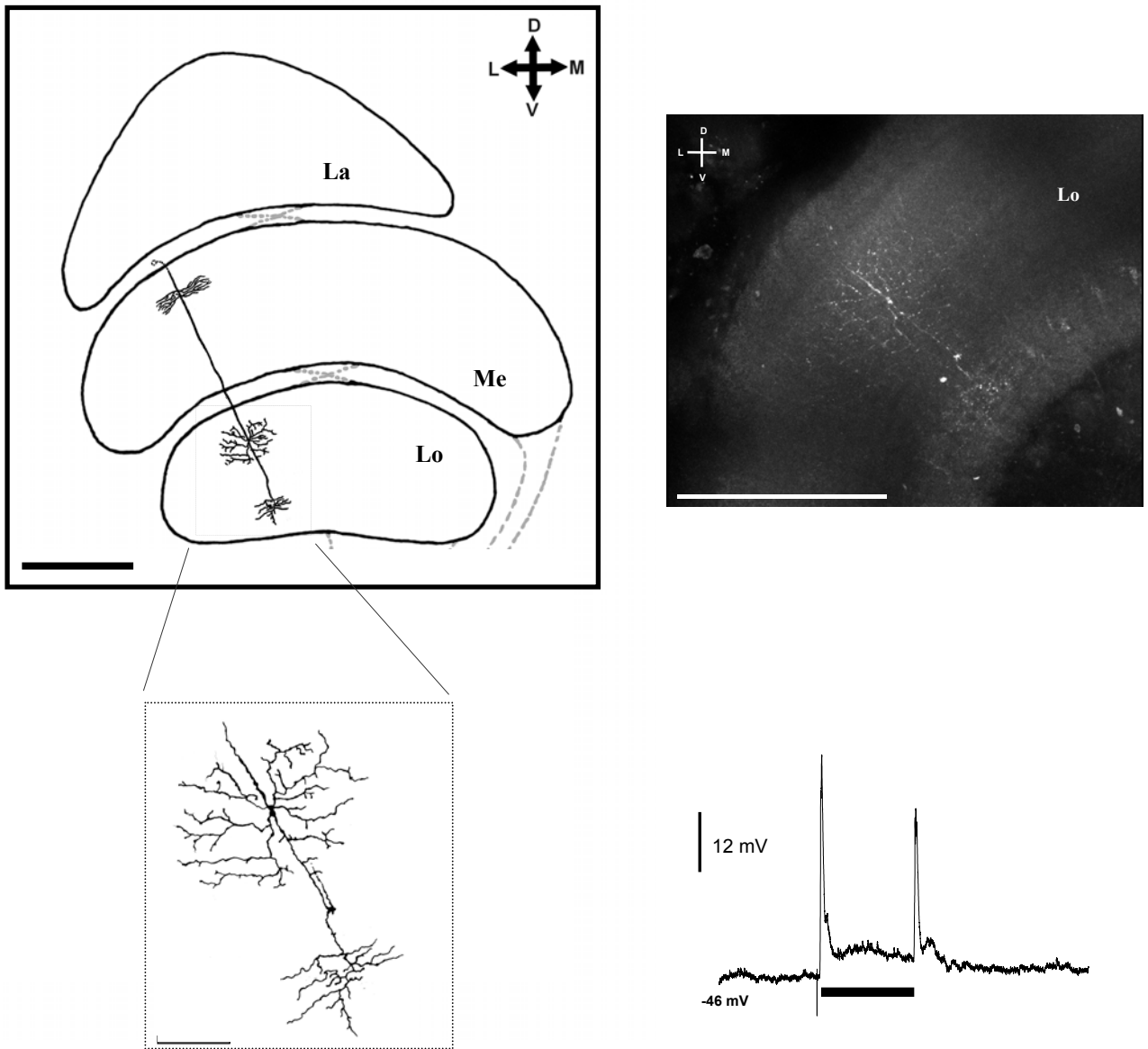
Registro de tres neuronas del cangrejo que responden con una depolarización gradual fásica al encendido y apagado de la luz (neuronas on-off). Este tipo de respuesta neuronal no fue descrito previamente en artrópodos. *Columna de la izquierda*: registro de una neurona on-off sin actividad sináptica espontánea evidente; *debajo*: ampliación de partes del mismo registro donde puede apreciarse que la respuesta al PL es gradual. *Columna de la derecha arriba*: registro de una neurona on-off con potenciales excitatorios espontáneos; *columna de la derecha abajo*: registro de otra neurona de este tipo pero en este caso con potenciales inhibitorios espontáneos. *Barra horizontal*: PL de 1 segundo.

Figura 21: Ubicación y morfología de las neuronas on-off con procesos tangenciales en la lóbula.



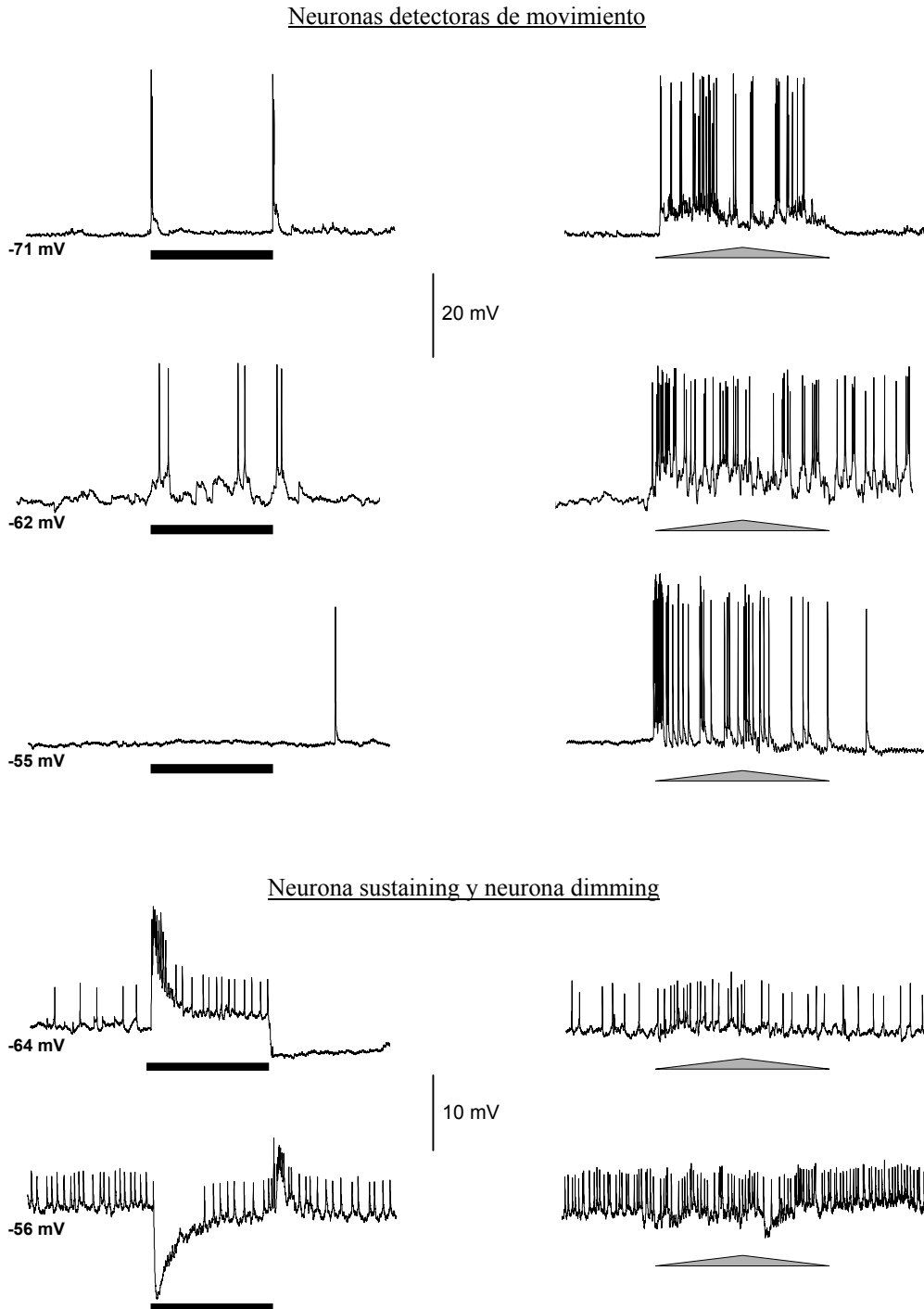
Panel de la izquierda: reconstrucción desde una perspectiva anterior de la ubicación y morfología de una neurona on-off del cangrejo que aparentemente sólo arboriza en la lóbula. Estas arborizaciones consisten en un conjunto de procesos tangenciales paralelos que corren por un mismo estrato en sentido lateromedial. Los procesos convergen en una neurita principal gruesa sobre la región medial de la lóbula. El soma de estas neuronas lo encontramos en la capa de cuerpos celulares ubicada por debajo de la lóbula y se conecta a la neurita principal a través de una neurita delgada. En 2 de las 4 tinciones realizadas pudimos observar que de las neuritas tangenciales proyectan delgados procesos columnares que ascienden verticalmente por el mosaico retinotópico. En algunos casos, estos procesos columnares se reencausan tangencialmente por un estrato superior al de las neuritas tangenciales primarias. También en 2 de las 4 tinciones se observó que la neurita principal se continúa en una fibra delgada que parece descender hacia el protocerebro lateral. Si bien la tinción de estas neuronas se veía muy nítida en la lóbula, no pudimos seguir el recorrido neuronal en el protocerebro. La reconstrucción en 2D de la neurona de esta figura se realizó dibujando los segmentos neuronales observados en secciones (ópticas) seriadas anteriores del lóbulo óptico (cada sección de 4 μm de profundidad aproximadamente). La *foto* es una sección óptica anterior de 100 μm de profundidad. Las *escalas* de tamaño en ambos casos representan 150 μm . *Abajo a la derecha* se muestra la respuesta al PL (antes de inyectar neurobiotina) de la neurona on-off que se reconstruyó aquí.

Figura 22: Neurona on-off columnar



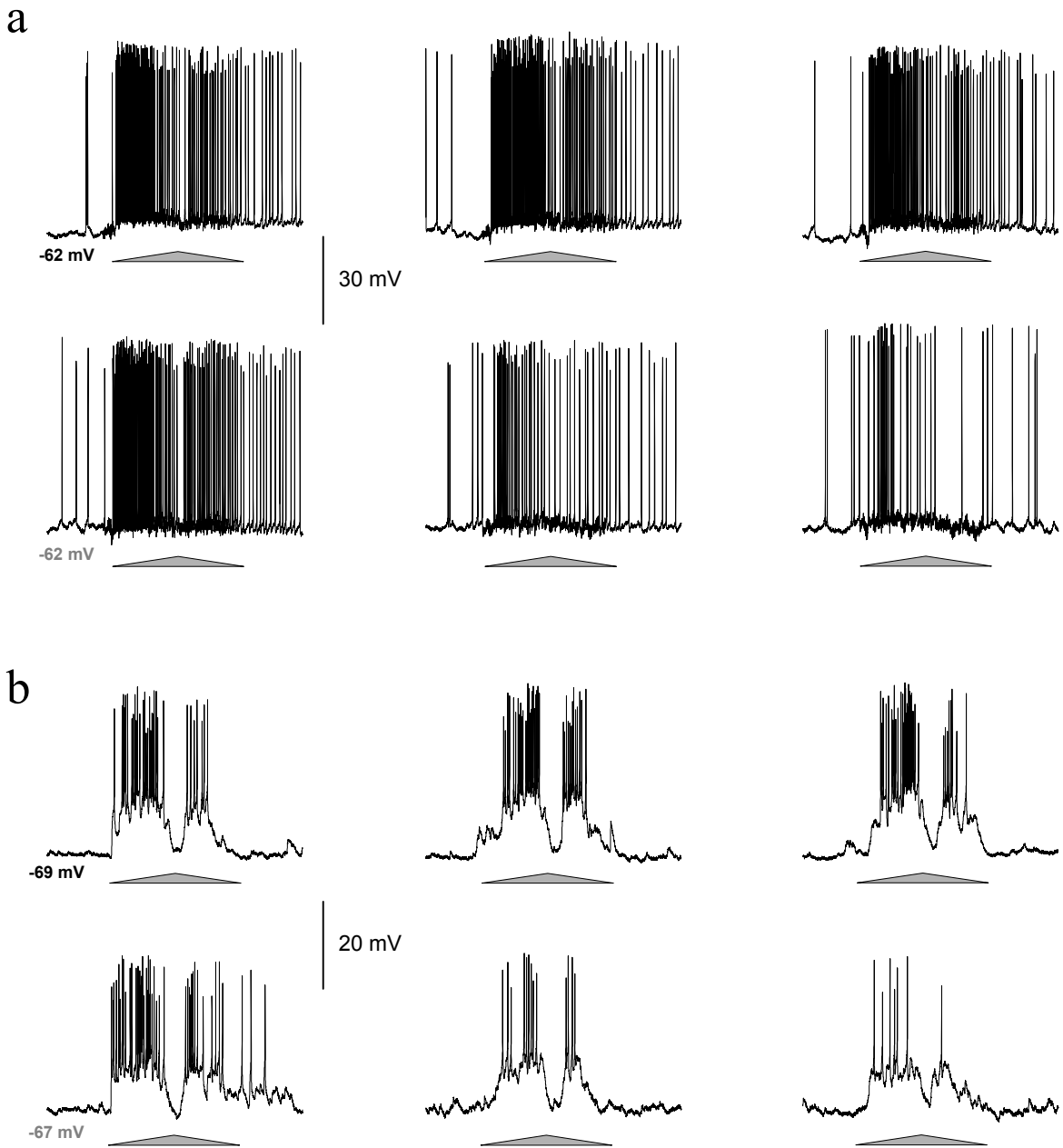
Panel de la izquierda: reconstrucción desde una perspectiva anterior de la ubicación y morfología de una neurona on-off columnar del cangrejo. La forma básica de la neurona consiste en una neurita principal delgada que proyecta columnarmente desde la médula hasta la lóbula. En la médula la neurona arboriza en un estrato distal y en la lóbula en uno distal y en otro proximal. En la *ampliación* de la reconstrucción se ilustran con mayor detalle las arborizaciones de la neurona en los dos estratos de la lóbula. Las arborizaciones de la lóbula como las de la médula se disponen en cada caso a lo largo de un único estrato horizontal, donde adoptan una distribución radial. Llama la atención que esta neurona columnar no muestra ningún entrecruzamiento al proyectar de la médula a la lóbula a través del segundo quiasma óptico. La reconstrucción en 2D de la neurona de esta figura se realizó dibujando los segmentos neuronales observados en secciones (ópticas) seriadas anteriores del lóbulo óptico (cada sección de 4 μm de profundidad aproximadamente). En la *foto* se distinguen la neurita principal y las arborizaciones de la neurona en la lóbula (la foto es una sección óptica anterior de 30 μm de profundidad). Las *escalas* del esquema y de la foto representan 150 μm . La *escala* de la ampliación representa 30 μm . *Abajo a la derecha* se muestra la respuesta al PL (antes de inyectar neurobiotina) que tuvo esta neurona on-off columnar.

Figura 23: Respuesta neuronal frente a un estímulo visual estacionario (PL) y frente a un estímulo visual en movimiento (EVP).



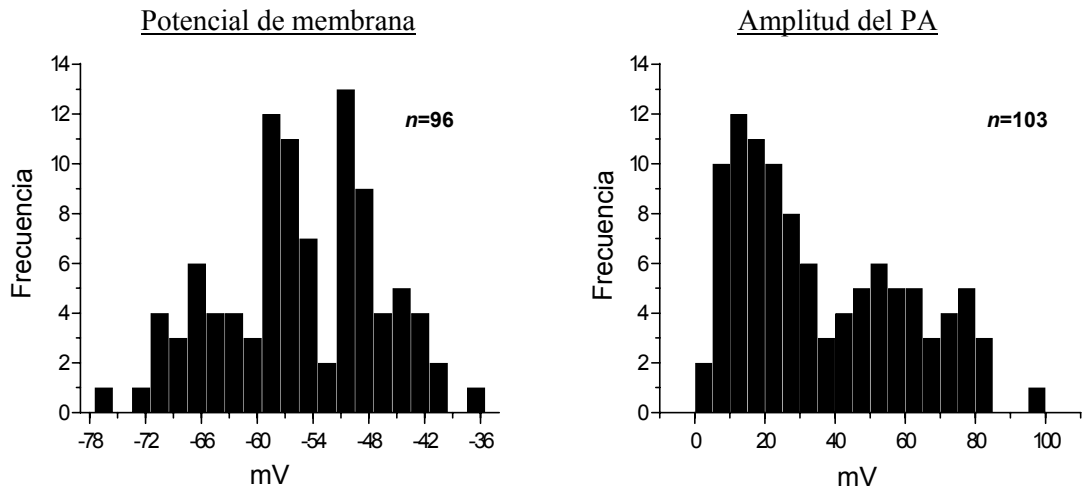
Distintos tipos neuronales pueden ser distinguidos en base a su sensibilidad por un cambio estacionario en la intensidad de luz (*columna de la izquierda*, respuesta al PL) y a su sensibilidad por una imagen en movimiento (*columna de la derecha*, respuesta al EVP). En esta figura se muestra la respuesta de: tres neuronas detectoras de movimiento (NDM), una neurona sustaining y una dimming. Cada fila muestra las respuestas de una misma célula a ambos estímulos. Aquí se puede apreciar la mayor sensibilidad de las NDM por el movimiento de la figura que por un PL, en contraste con lo que ocurre para los otros tipos neuronales ejemplificados. La *barra horizontal* representa un PL de 1 seg de duración. En esta y las figuras que siguen los dos lados superiores del *triángulo* representan la dirección inicial y final de movimiento de la pantalla; el vértice superior corresponde al momento en que la figura invierte su dirección de movimiento. La *base del triángulo* representa el tiempo total de movimiento de la pantalla, 2,2 seg. Notar que las escalas temporales de la columna de la izquierda y de la derecha son distintas.

Figura 24: Consistencia en la respuesta de las NDM y su reducción por la presentación repetida del EVP



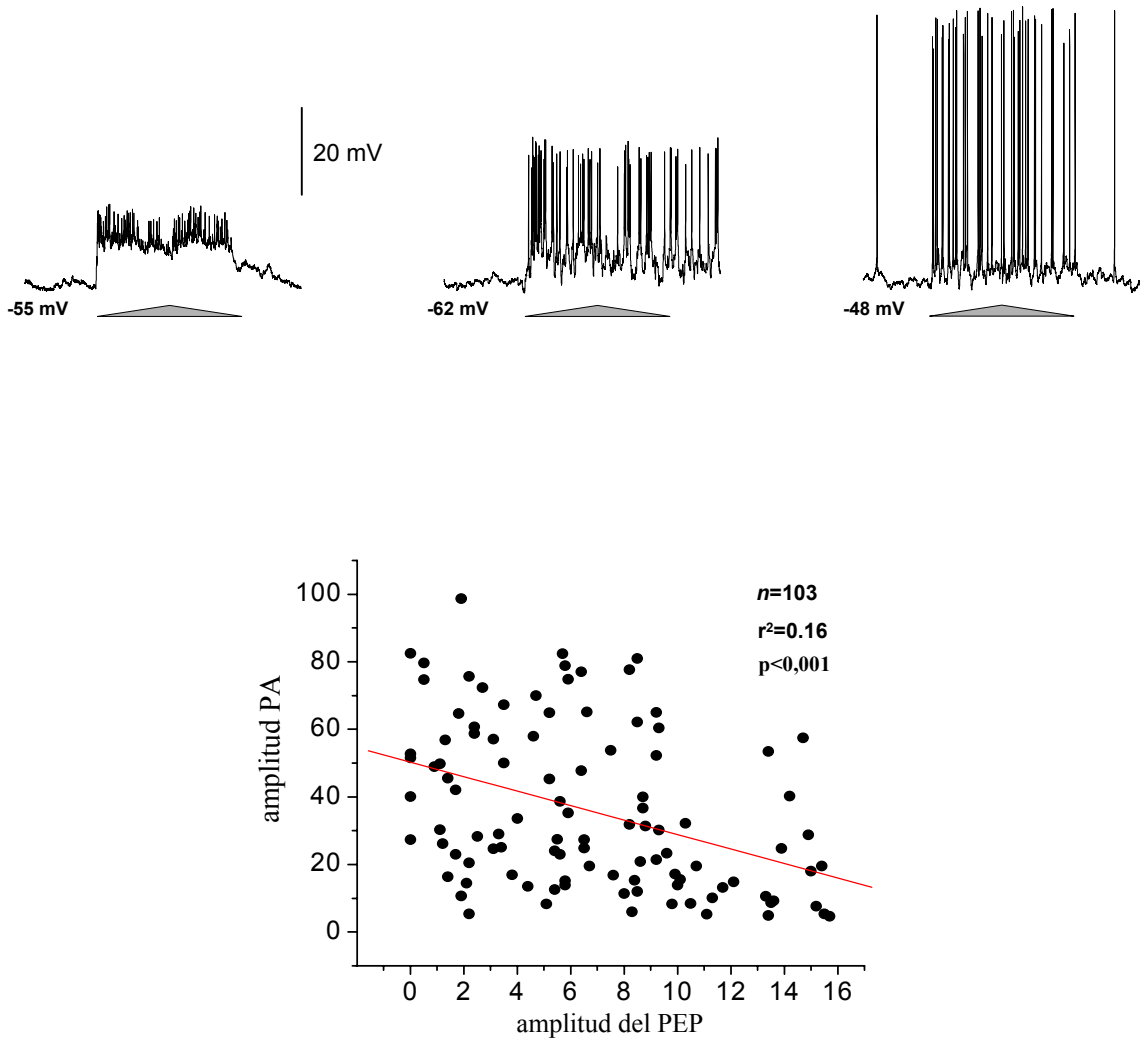
Aquí se ilustra la respuesta de dos NDM frente a la presentación repetida del EVP. Los registros de una neurona se presentan en las dos *filas superiores* y los de la otra en las dos *filas inferiores*. Para cada neurona los tres registros de la fila superior corresponden a presentaciones sucesivas del EVP separadas por intervalos de 10 min, mientras que los registros de las filas inferiores corresponden a presentaciones separadas por solo 10 segundos. Como puede apreciarse, la respuesta de estas neuronas al EVP es claramente reproducible (*fila superior* de cada neurona). Sin embargo, cuando el EVP se presenta a intervalos cortos de tiempo su respuesta se reduce notoriamente (*fila inferior* de cada neurona).

Figura 25: Potencial de membrana y amplitud de los PAs registrados en las NDM.



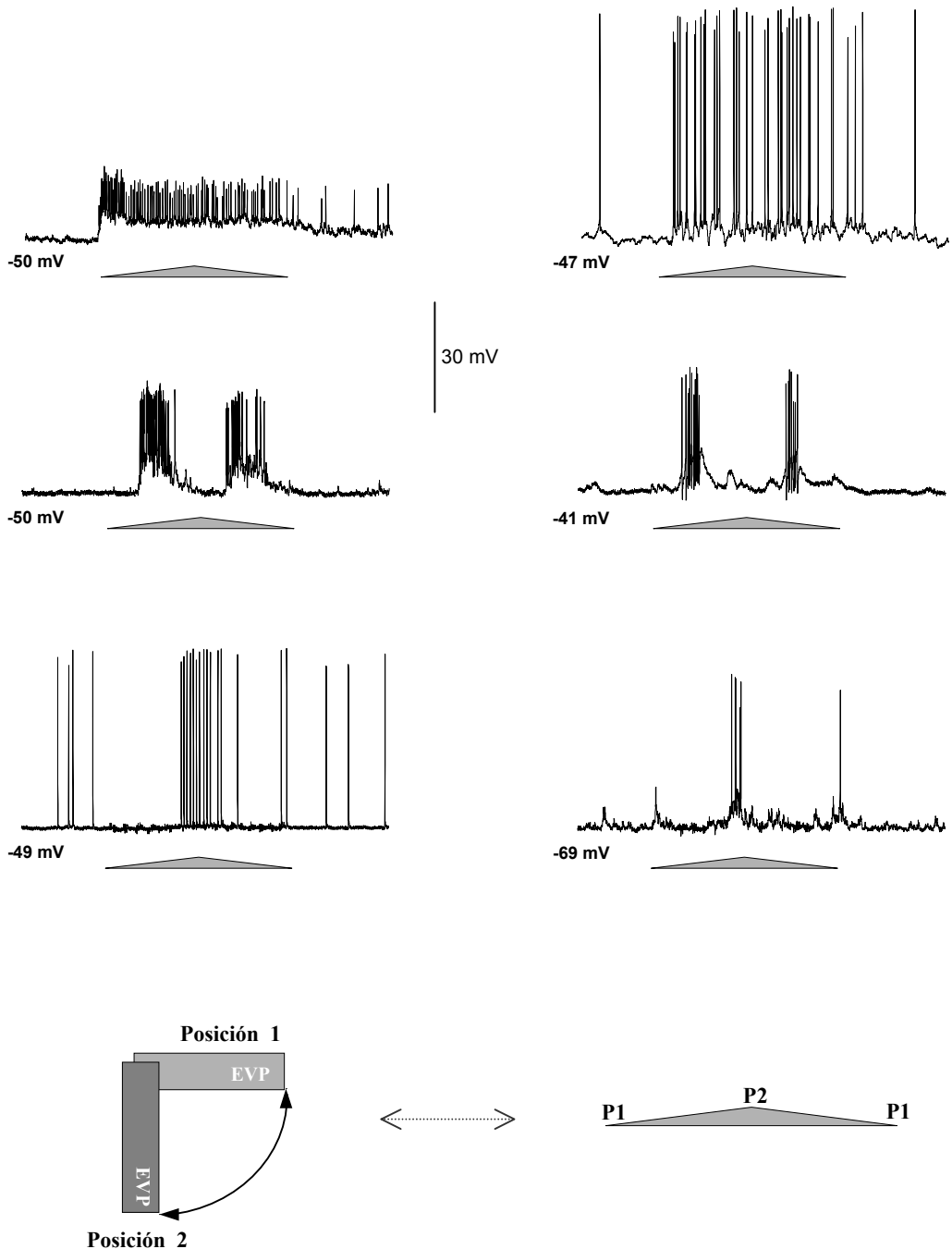
Análisis de la distribución de frecuencias del potencial de reposo de membrana (PM) y de la amplitud de los PAs registrados en distintas NDM. La distribución de frecuencias de ambas variables sugiere que habría al menos tres máximos para cada caso. En ambos casos, el rango en que se ubicó la variable fue particionado en 20 intervalos de frecuencia. De este modo el bin para el PM es de 2 mV y para los PA de 5 mV. La amplitud de los PAs fue medida desde el potencial de reposo hasta el pico del PA. Los registros en los que no se pudo determinar con confianza el PM (en general por deriva del *off-set*) no se incluyeron en este análisis.

Figura 26: Relación entre el potencial excitatorio postsináptico y la amplitud de los PAs de las NDM.



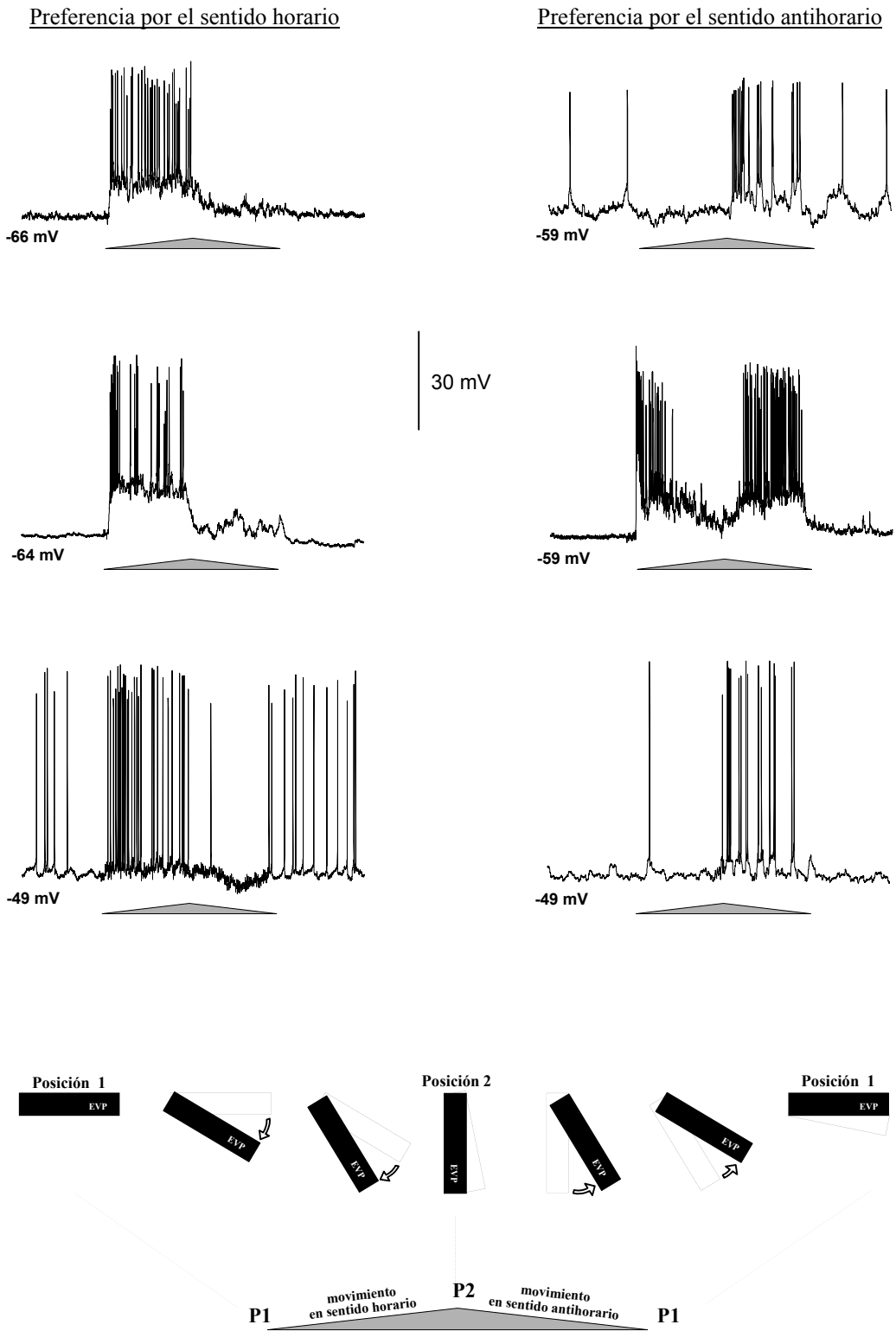
En esta figura se ilustra una característica que se observa con mucha frecuencia: el tamaño del potencial excitatorio postsináptico (PEP) parece estar inversamente correlacionado con la amplitud de los PAs. El análisis de correlación realizado para estudiar el grado de asociación entre las dos variables muestra que estas están relacionadas efectivamente de manera inversa ($p<0,001$). Los PEP se midieron desde el valor máximo que alcanzan hasta el potencial de reposo de membrana y los PAs desde su pico al potencial de reposo. Los ejes del gráfico están en mV.

Figura 27: Campos receptivos de las NDM.



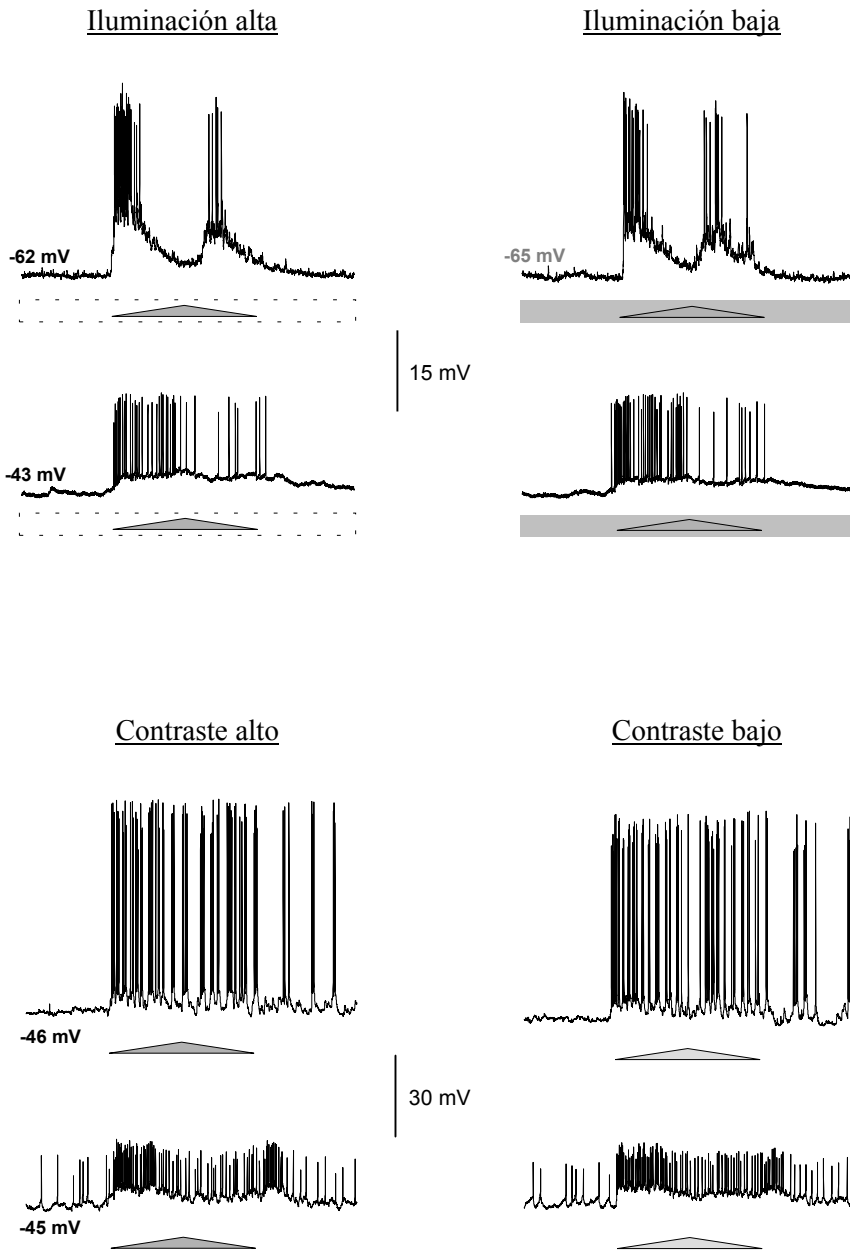
Los registros de la *fila superior* corresponden a neuronas cuyos campos receptivos se extienden por toda el área por la que se desplaza el EVP. Los registros de la *fila media* son de células cuyos campos receptivos se ubican sobre el área del espacio donde el EVP comienza y finaliza su recorrido (posición 1). Los registros de la *fila inferior* son de células cuyos campos receptivos se encuentran en torno al área donde el EVP invierte su dirección de movimiento (posición 2). *Abajo*, vista superior del recorrido del EVP.

Figura 28: Preferencia por la dirección del movimiento en NDM.



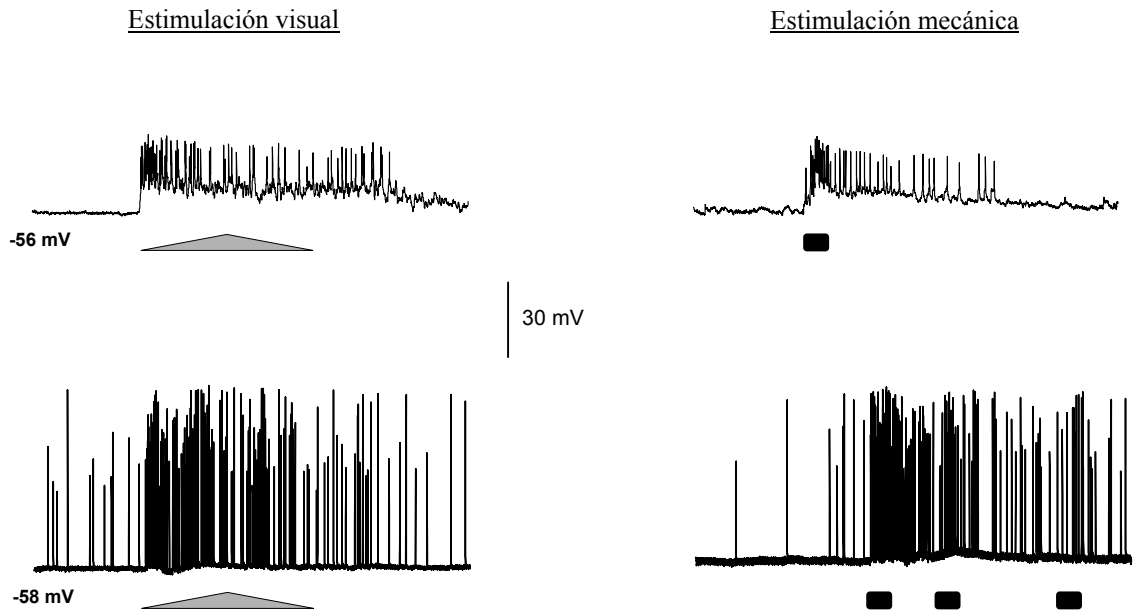
A pesar de que el EVP despliega un movimiento circular que no es el ideal para estudiar propiedades relacionadas a la dirección del movimiento, algunas NDM muestran una clara preferencia por la dirección de desplazamiento de la pantalla. Los registros de la *columna de la izquierda* corresponden a células que responden principalmente al desplazamiento del EVP en sentido horario mientras que los registros de la *columna de la derecha* corresponden a células que responden preferencialmente al desplazamiento en sentido antihorario. *Abajo*: descripción del EVP.

Figura 29: Efecto de la luminosidad general y del contraste en la respuesta de las NDM.



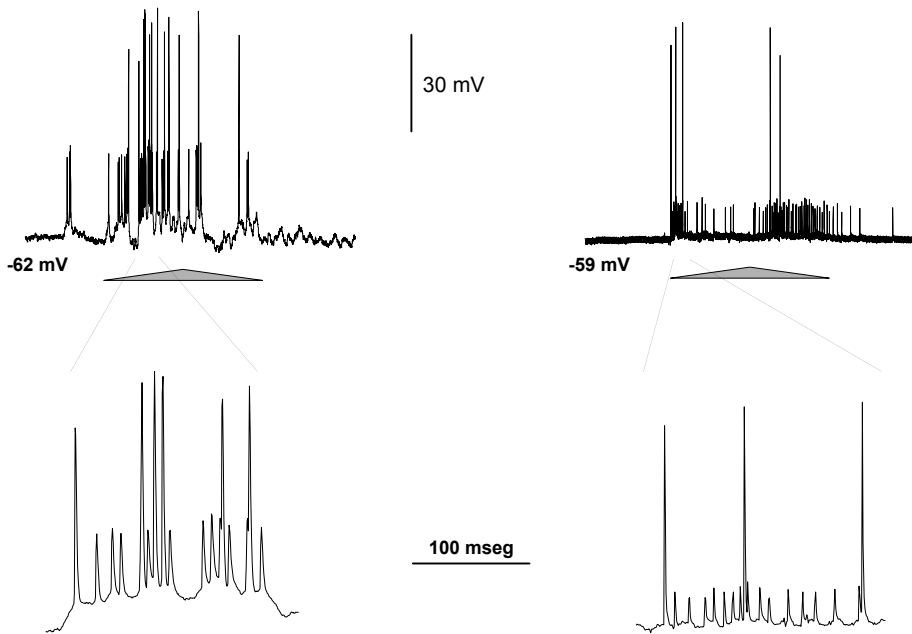
En el *panel superior* se ilustra la respuesta al EVP de dos NDM (una por fila) en condiciones alta (2 W/m^2) y baja (20 mW/m^2) iluminación del interior de la jaula de Faraday. En el *panel inferior* se ilustra la respuesta de dos NDM (una por fila) para el EVP de alto contraste que se utiliza normalmente (pantalla negra) y para un EVP de bajo contraste (para ello se utiliza una pantalla blanca). En ambas situaciones el fondo es el techo blanco de la jaula de Faraday. En el *panel superior* se representa el bajo nivel de iluminación con un fondo oscuro donde se inscribe el triángulo. En el *panel inferior* se representa la figura blanca que constituye el EVP de bajo contraste con un tono gris claro.

Figura 30: Sensibilidad por estímulos mecánicos en las NDM.



Se muestra la respuesta al EVP y a la estimulación mecánica de dos NDM (una en cada fila). En la *columna de la izquierda* se muestra la respuesta al EVP y en la *columna de la derecha* la respuesta cuando se tocó suavemente con un pincel el caparazón del animal. La estimulación mecánica se realizó en condiciones de oscuridad y después de repetir el movimiento del pincel antes de tocar efectivamente al animal para descartar que la respuesta fuera de origen visual. En NDM que mostraron sensibilidad mecanosensorial la aplicación local de un pulso de aire provocó una respuesta similar a la provocada por el pincel. Las *barras negras* representan el momento aproximado en que se aplicó el estímulo mecánico.

Figura 31: Potenciales de acción de distinta amplitud en una misma NDM.



En algunas NDM se registraron potenciales acción de dos y hasta tres amplitudes distintas. Las diferencias en las amplitudes de los PAs se mantuvieron constantes por el tiempo que duró la penetración celular. En la *parte superior* de la figura se ilustra la respuesta al EVP de dos NDM. En la *parte inferior* de la figura se ilustra un segmento del registro neuronal con la misma escala de voltaje pero con la base temporal expandida.

Figura 32: Ubicación y morfología de NDM biestratificadas.

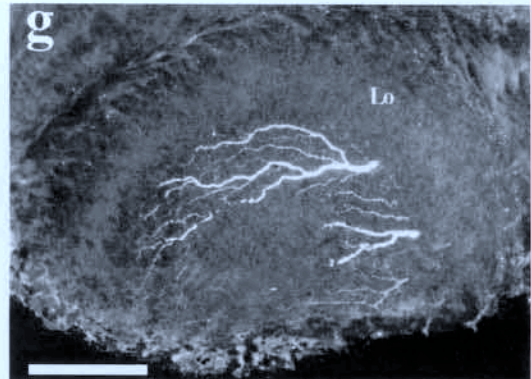
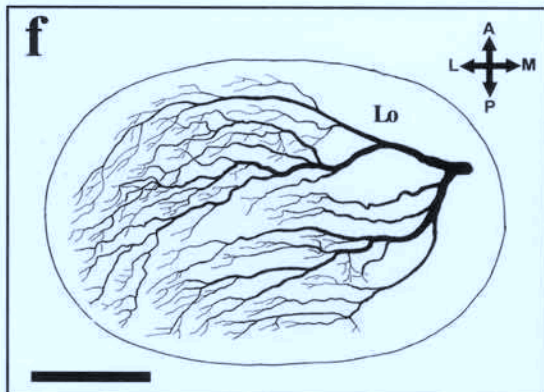
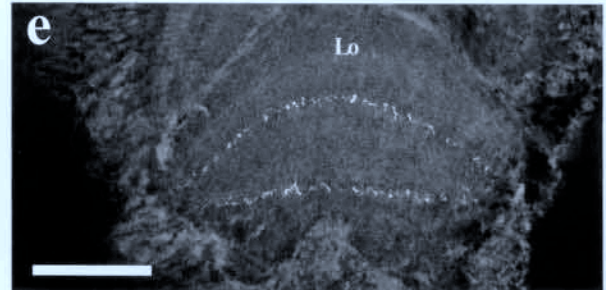
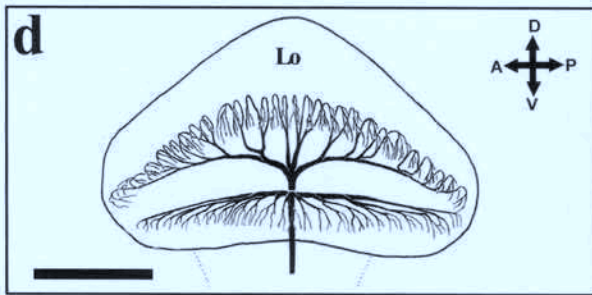
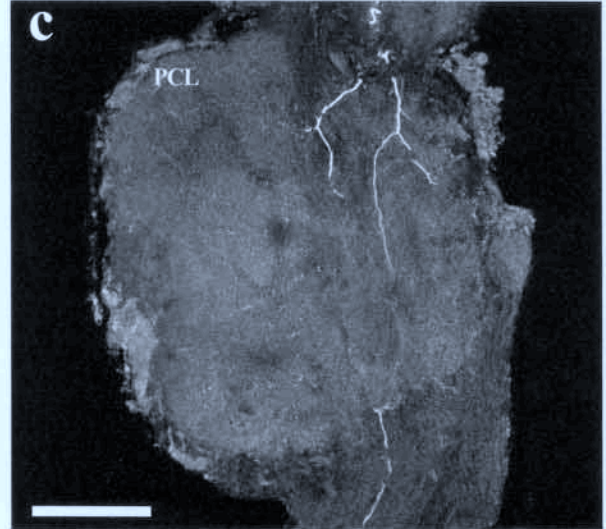
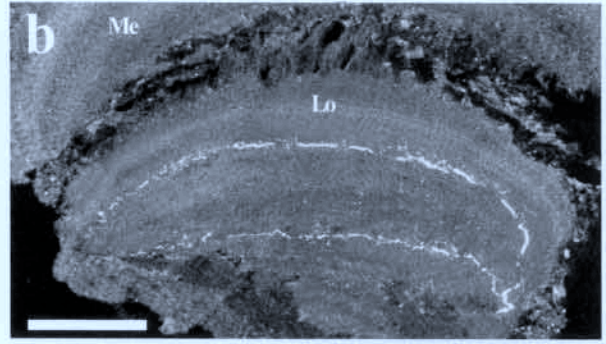
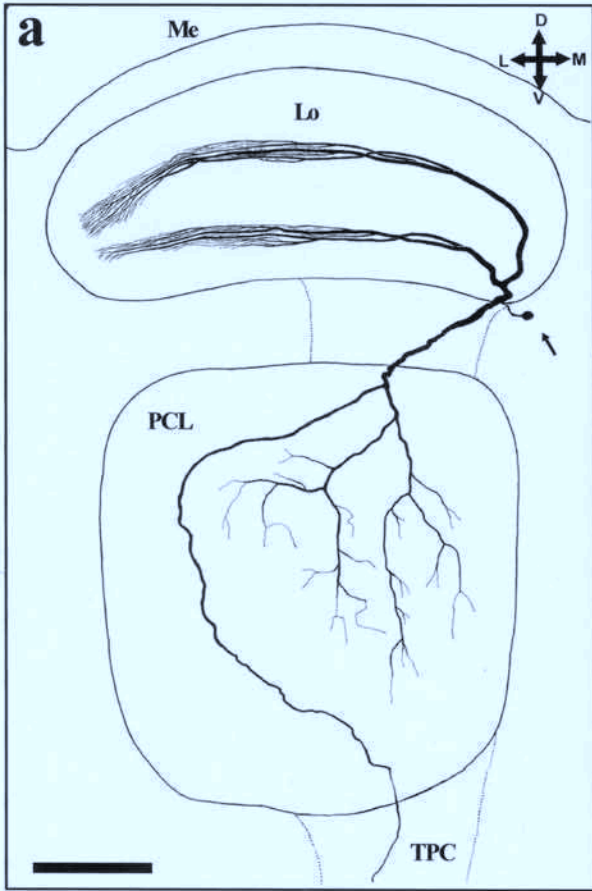
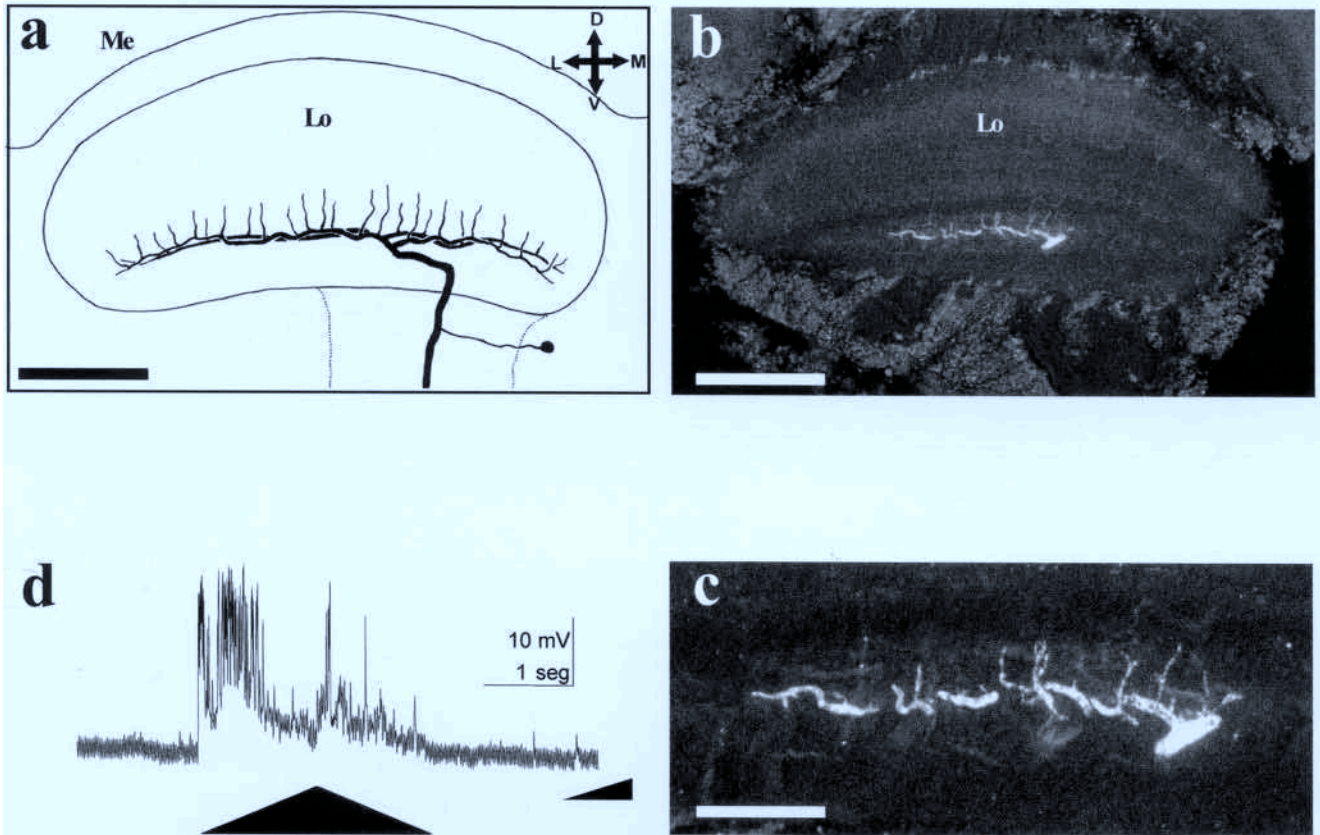


Figura 33: Ubicación y morfología de NDM monoestratificadas.

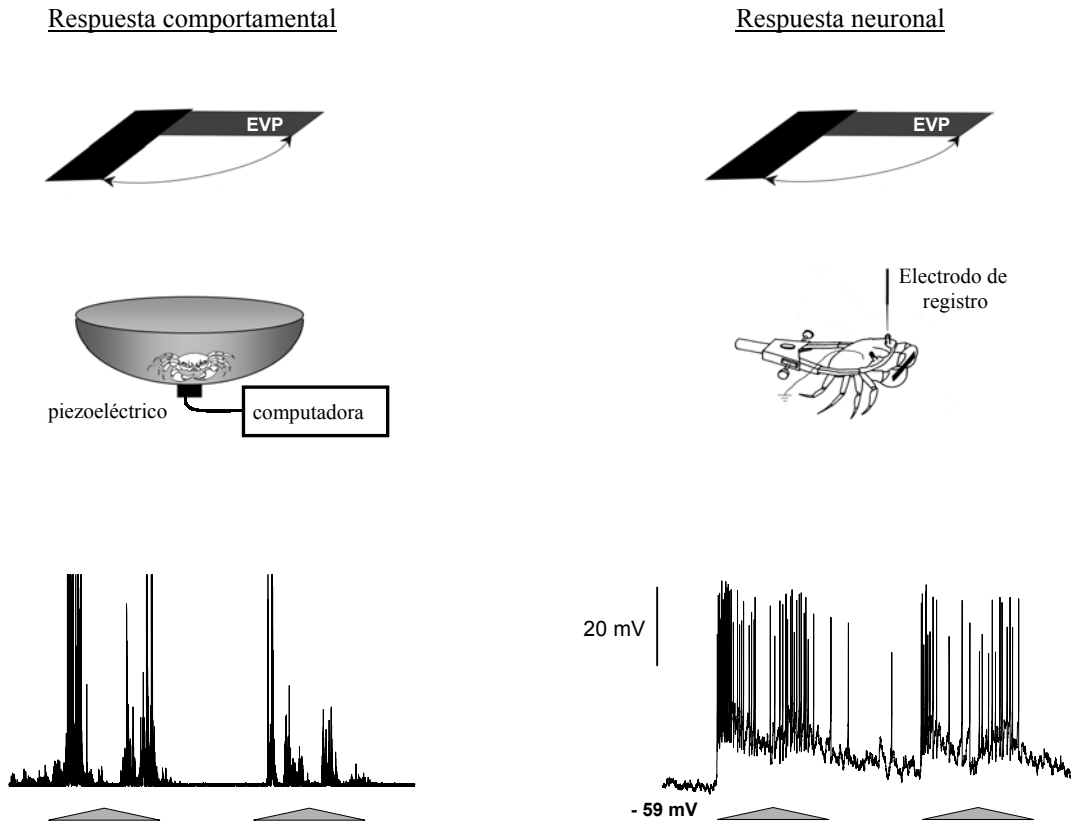


Figuras 32 y 33. Ubicación y estructura general de las NDM. Todas las NDM teñidas arborizan en la lóbula y en el protocerebro lateral. En los casos en que el soma pudo ser identificado lo encontramos en la capa de cuerpos celulares ubicada por debajo de la lóbula ($n=23$). Cada preparado fue cortado (o seccionado óptimamente) de manera seriada en uno de los planos ortogonales para luego reconstruir la morfología general de la NDM correspondiente (figura 32a, d, f y 33a). A la derecha se muestra la fotografía de una de las secciones de cada preparado (figura 32b, c, g y 33a) en que se basó la reconstrucción celular correspondiente. En la lóbula las arborizaciones consisten en un conjunto de procesos tangenciales paralelos que corren por dos o un estrato del neuropilo en sentido lateromedial (figuras 32 y 33 respectivamente). Estos procesos convergen en una neurita principal que ramifica internándose en el protocerebro. En la mayoría de las neuronas teñidas pudimos observar que después de atravesar el protocerebro el axón proyecta hacia el ganglio supraesofágico por el tracto protocerebral.

Figura 32. El diagrama **a** muestra desde una perspectiva anterior la reconstrucción de una NDM que arboriza en dos estratos de la lóbula. En **d** también se ilustra una NDM biestratificada pero desde una perspectiva lateral (la lóbula únicamente). Desde esta vista las dendritas corren perpendiculares al plano de la figura por lo que en la sección del tejido (**e**) las neuritas aparecen como (dos) series de puntos. La reconstrucción hecha en **f** corresponde a una vista dorsal de la morfología dendrítica. Notar que desde esta perspectiva las dendritas corren paralelas al plano de la figura. La respuesta al EVP de la neurona teñida que se muestra en **b** y **c** corresponde al registro del medio de la figura 26; la respuesta de la neurona teñida en **e** corresponde al registro de la izquierda de la misma figura. Las escalas de tamaño representan 100 μm . En todos los casos las tinciones fueron hechas utilizando Lucifer yellow. Las abreviaturas como en las figuras anteriores.

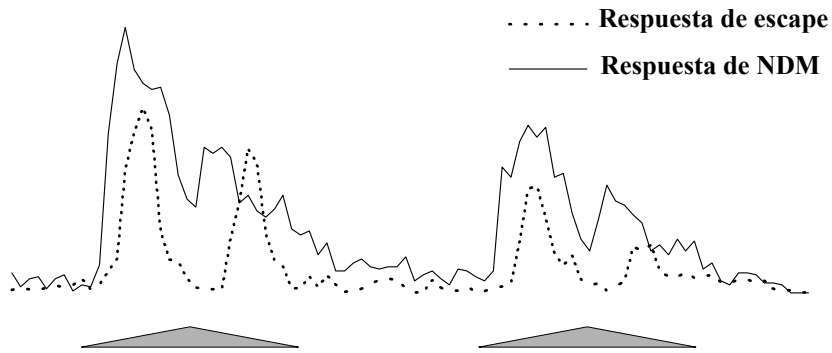
Figura 33. El diagrama **a** muestra desde una perspectiva anterior la reconstrucción de una NDM que arboriza en un único estrato de la lóbula. La reconstrucción se realizó a partir de secciones seriadas del tejido como la que se ilustra en **b**. A mayor aumento de esta neurona se observaron delgadas proyecciones dendríticas que ascendían verticalmente por la lóbula (**c**). En **d** se muestra la respuesta de la neurona al EVP antes de inyectarle Lucifer yellow. Escalas de tamaño: 100, 60 μm (**a**, **b**), 30 μm (**c**).

Figura 34: Registro de la respuesta comportamental y de la respuesta neuronal.



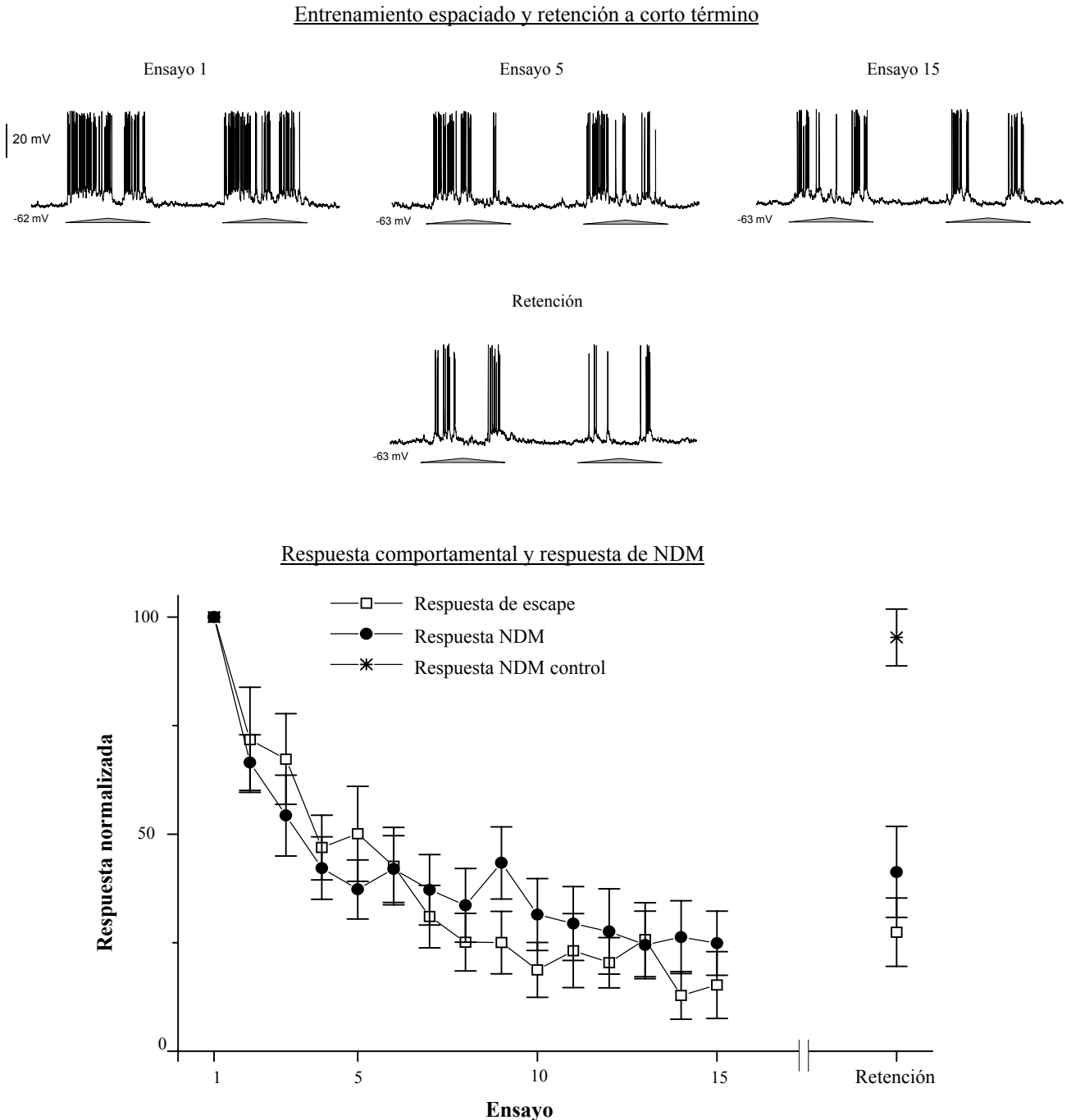
Dispositivos experimentales para medir la respuesta comportamental y la respuesta neuronal. En la *columna de la izquierda* se grafica el actómetro donde se registra la respuesta de escape (RE) de los animales frente al EVP. Los experimentos comportamentales de este capítulo se realizaron dentro de la jaula de Faraday de modo que cuando los cangrejos estuvieran sobre el centro del recipiente, su posición fuera la misma que cuando se realizan los registros electrofisiológicos. El actómetro cuenta con un piezoeléctrico que permite transducir las vibraciones del recipiente (provocadas por la RE) en señales eléctricas. Estas deflexiones en el potencial son digitalizadas y registradas por una computadora mediante el mismo equipo de adquisición que utilizamos para los registros electrofisiológicos. Así, el pateo de los animales se registra de manera rápida y precisa. Debajo del actómetro se muestra el registro de la RE de un cangrejo frente a un ensayo de estimulación con el EVP (unidades arbitrarias de voltaje). En la *columna de la derecha* se muestra un esquema de la preparación para realizar registros electrofisiológicos y debajo la respuesta de una NDM frente a un ensayo de estimulación con el EVP. *Triángulo*, definido como en la figura 23. *Notar* que un ensayo de estimulación consiste en dos ciclos de movimiento del EVP separados por 2 segundos.

Figura 35: Histograma periestímulo de la respuesta comportamental y neuronal frente a un ensayo de estimulación con el EVP.



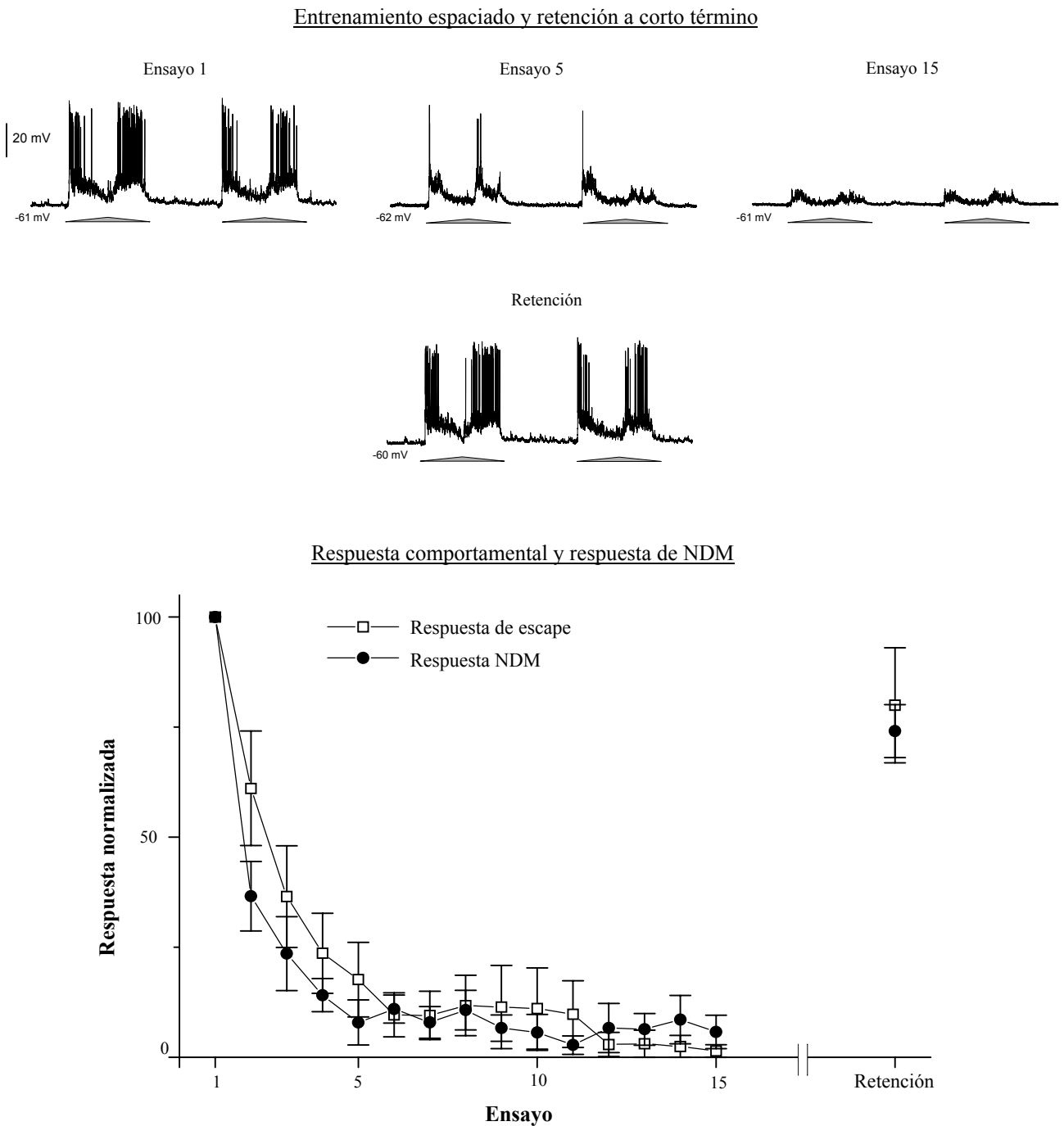
Actividad comportamental y neuronal en el dominio del tiempo durante un ensayo de estimulación con el EVP. Para construir el histograma se registró la RE de 40 cangrejos (una por animal) y la respuesta de 40 NDM (también una por animal). El número de picos de voltaje (respuesta comportamental) y el número de PAs (respuesta neuronal) son los eventos que se grafican en este histograma temporal de actividad (ver registros de la figura 34). Cada punto de las curvas aquí graficadas representa la suma de eventos que ocurren durante un intervalo de 20 milisegundos. Un análisis de correlación entre estas curvas confirmó que la respuesta comportamental y la respuesta neuronal están correlacionadas (ver texto). La respuesta de estas interneuronas visuales anticipa la RE en 80-120 milisegundos aproximadamente. La base del triángulo representa 2,2 seg.

Figura 36: Respuesta neuronal y comportamental durante la adquisición y retención a corto término de la MCS.

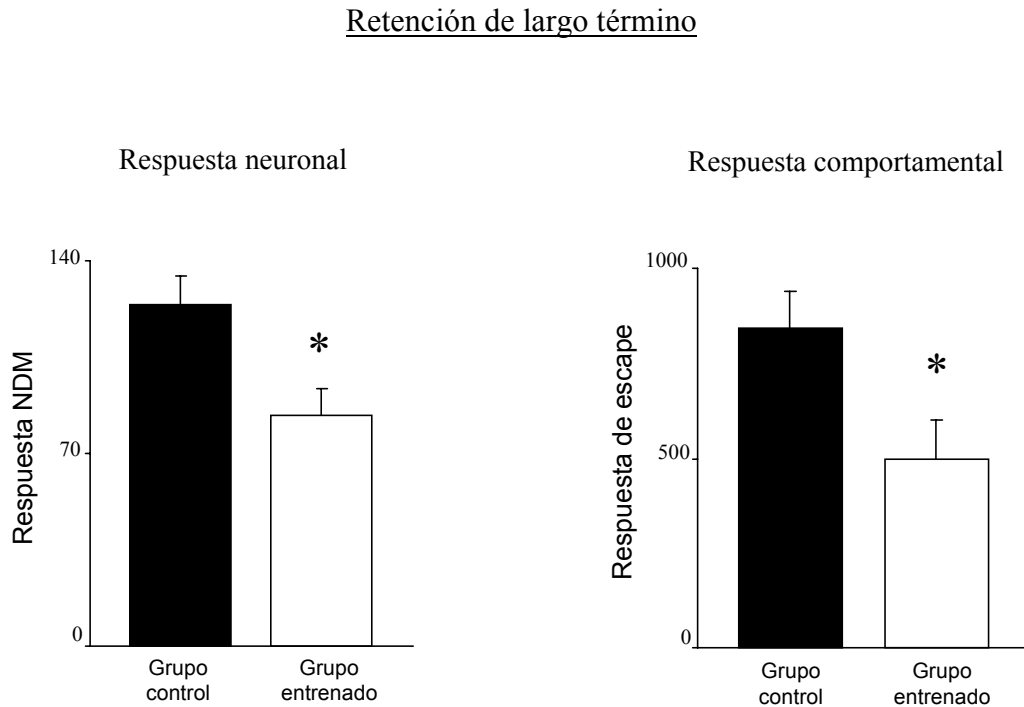


En el *panel superior* de la figura se ilustra la respuesta de una NDM durante un entrenamiento espaciado (15 ensayos de estimulación con el EVP, intervalo entre ensayos de 3 min) y durante el ensayo de retención a corto término de la MCS (15 min después de terminado el entrenamiento). En el *gráfico inferior* de la figura se muestra la respuesta comportamental y neuronal como promedio de las respuestas individuales (normalizadas a la respuesta en el primer ensayo del entrenamiento). La respuesta neuronal se evaluó como el número de PAs disparados exclusivamente durante el pasaje del EVP para cada ensayo. El grupo control solo recibió el primer ensayo del entrenamiento y el ensayo de retención. La respuesta comportamental se estudió en 20 cangrejos; la neuronal en 12 NDM de 12 cangrejos y en 8 NDM control de 8 cangrejos. Aquí, como en el resto de las figuras del capítulo, se grafica la media y el error estándar.

Figura 37: Respuesta neuronal y comportamental durante la adquisición y retención a corto término de la MS.

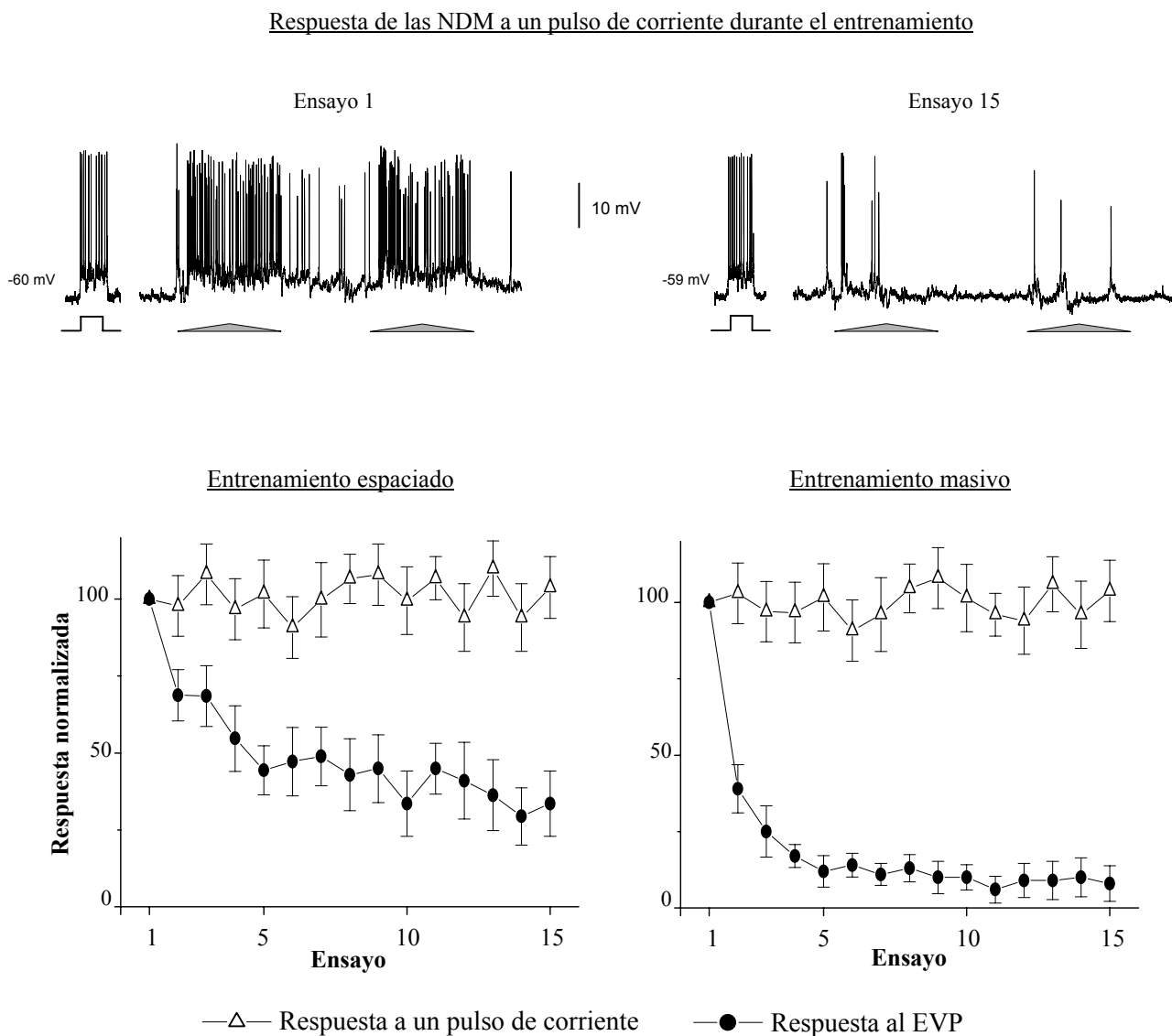


En el *panel superior* de la figura se ilustra la respuesta de una NDM durante un entrenamiento masivo (15 ensayos de estimulación con el EVP, intervalo entre ensayos de 2 seg) y durante el ensayo de retención a corto término (15 min después de terminado el entrenamiento). En el *gráfico inferior* de la figura se muestra la respuesta comportamental y neuronal como promedio de las respuestas individuales (normalizadas al primer ensayo del entrenamiento). Aunque el protocolo masivo produce una reducción más pronunciada de la RE que uno espaciado (figura 36), también aquí la reducción en la respuesta de las interneuronas visuales refleja la reducción en la RE durante el entrenamiento. Incluso cuando la reducción en la respuesta es casi total para el último ensayo del entrenamiento, la respuesta neuronal y comportamental se recuperan casi completamente para el ensayo de retención. La respuesta comportamental se estudió en 20 cangrejos y la neuronal en 10 NDM de 10 cangrejos.

Figura 38: Respuesta neuronal y comportamental durante la retención de largo término de la MCS.

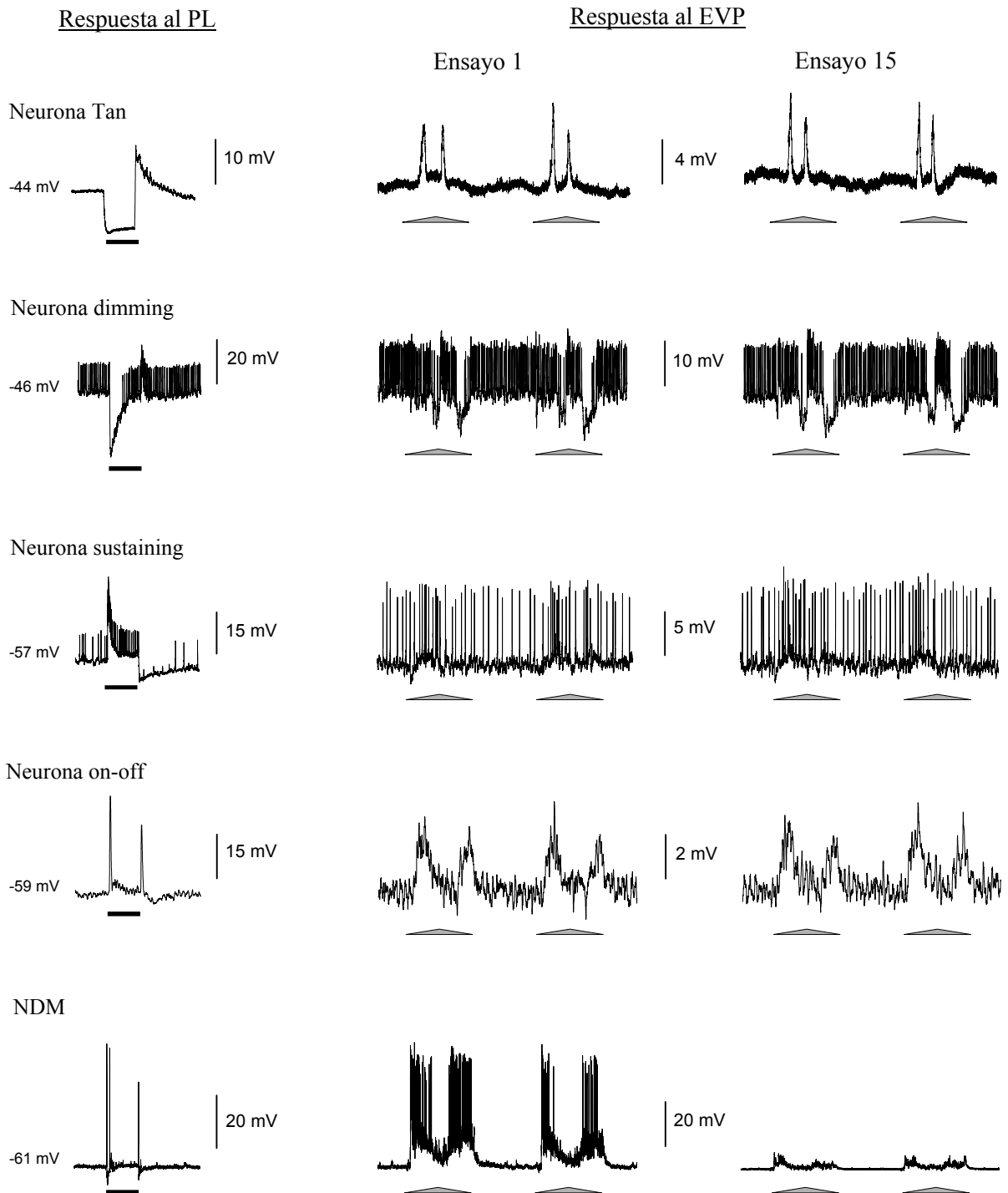
Veinticuatro (24) horas después de un entrenamiento espaciado la respuesta de las NDM al EVP refleja la MCS de largo término. La respuesta de NDM (medida en número de PAs) de animales que previamente fueron entrenados fue efectivamente menor que la de animales control (*gráfico de la izquierda*: grupo control $n=46$ NDM de 46 de cangrejos; grupo entrenado $n=50$ NDM de 50 cangrejos; $p<0,05$, t -test de dos colas). Este resultado está en sintonía con la reducción que se observa en la RE de animales entrenados en relación a animales control para la fase de evaluación de la memoria de largo término (*gráfico de la derecha*: grupo control $n=40$ cangrejos; grupo entrenado $n=40$ cangrejos; $p<0,05$, t -test de dos colas).

Figura 39: Excitabilidad general de las NDM durante el entrenamiento.



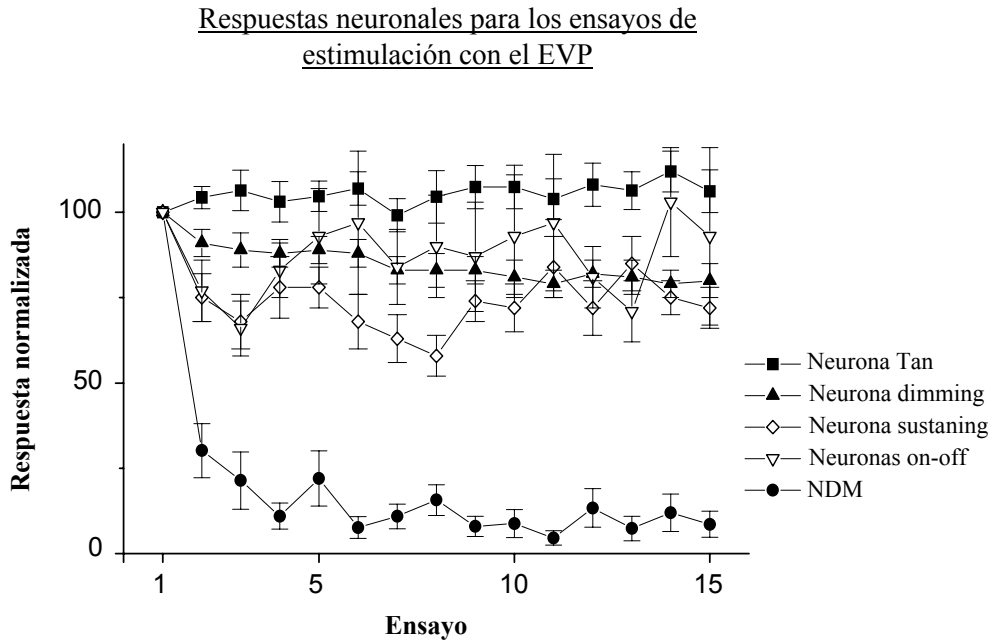
En el *panel superior* de la figura se ilustra la respuesta de una NDM a la que se le aplica intracelularmente un pulso de corriente depolarizante antes de cada ensayo de un entrenamiento espaciado. En los *gráficos inferiores* se muestra la respuesta neuronal promedio frente a un pulso de corriente y frente al ensayo de estimulación con el EVP para un entrenamiento espaciado (*izquierda*) y para uno masivo (*derecha*). Aquí también las respuestas (medidas en número de PAs) fueron normalizadas de forma individual a la respuesta frente a la primera de las estimulaciones correspondientes. Mientras que la respuesta neuronal al EVP disminuye a medida que se suceden los ensayos, su respuesta frente al pulso de corriente depolarizante se mantiene constante. Antes de cada experimento se determinó la cantidad de corriente necesaria para disparar de 6 a 12 PAs por un pulso cuadrado de 500 ms de duración. Para cada experimento el pulso de corriente se aplicó 1,25 seg antes de cada ensayo estimulación con el EVP y su intensidad se mantuvo constante a lo largo del entrenamiento. Para cada protocolo de entrenamiento se utilizaron 8 neuronas de 8 cangrejos.

Figura 40: Respuesta de distintas interneuronas visuales identificadas en el cangrejo ante la estimulación repetida con el EVP



En cada *fila* se ilustra un tipo distinto de interneurona visual caracterizada fisiológica y morfológicamente en el cangrejo. En la *columna de la izquierda* se muestra la respuesta neuronal frente a un PL y en la *columna central y de la derecha* la respuesta frente a la estimulación repetida con el EVP (entrenamiento masivo). A excepción de las NDM, las distintas interneuronas estudiadas no parecen modificar su respuesta frente a los sucesivos ensayos de estimulación con el EVP (ver figura 41). Notar que si bien los trazos de cada fila corresponden a una misma célula, la escala de voltaje no es la misma para el PL que para los ensayos con el EVP (salvo para NDM). La escala temporal es la misma en todos los casos, la *barra horizontal* representa 1 seg de estimulación con el PL.

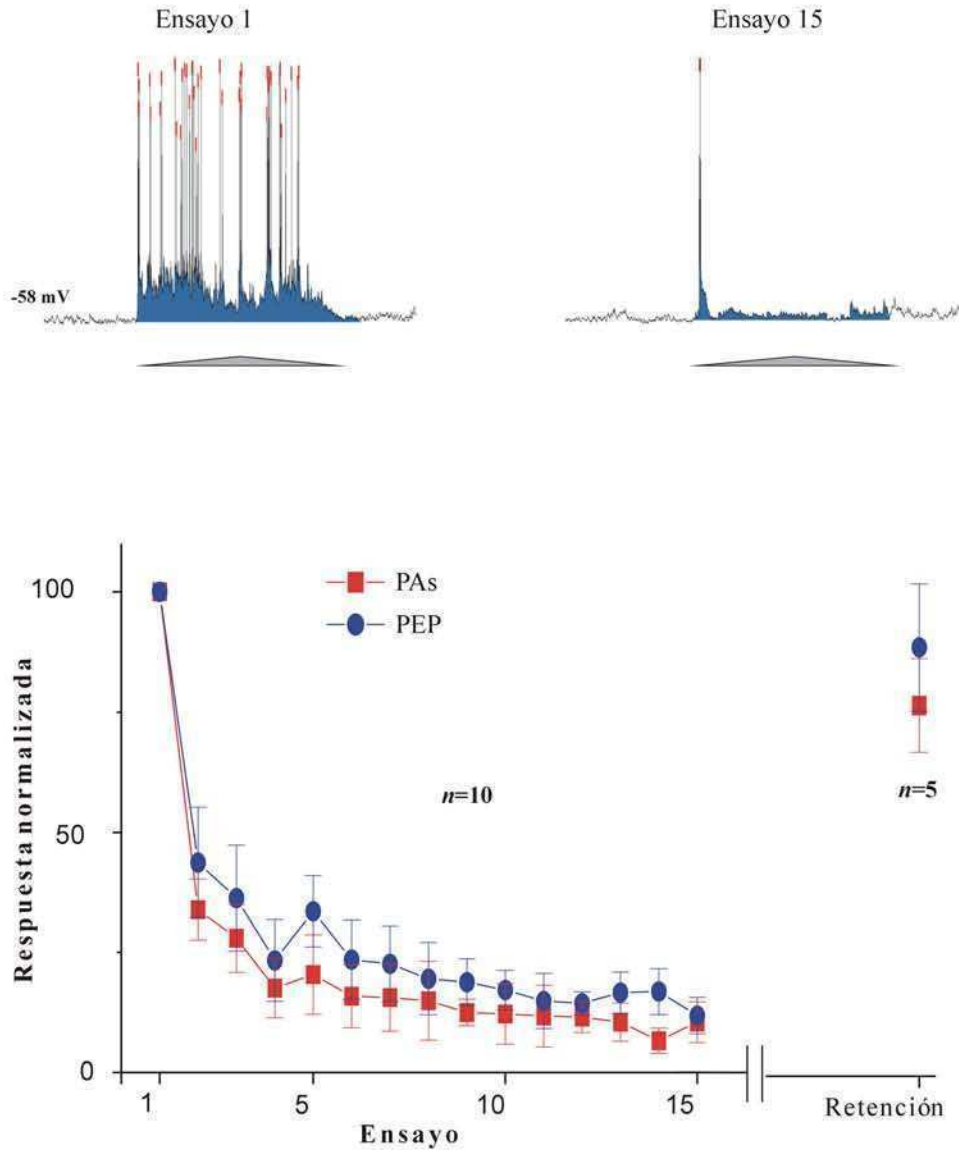
Figura 41: Respuesta promedio de distintas interneuronas visuales identificadas en el cangrejo ante la estimulación repetida con el EVP.



Resultados promedio de experimentos como los de la figura 40. Este gráfico muestra la respuesta de neuronas Tan ($n=10$), neuronas dimming ($n=11$), neuronas sustaining ($n=6$), neuronas on-off ($n=7$) y NDM ($n=8$) para un entrenamiento masivo. La respuesta de las NDM disminuye casi totalmente para el segundo ensayo de estimulación. En comparación, la respuesta del resto de las interneuronas estudiadas no se modifica. En las interneuronas que no disparan PAs (Tan y on-off), la respuesta se midió como el área del potencial postsináptico evocado durante el pasaje del EVP. En todos los casos las respuestas fueron normalizadas a la respuesta que presentó cada célula al primer ensayo de estimulación.

Figura 42: Relación entrada-salida en las NDM durante el entrenamiento masivo.

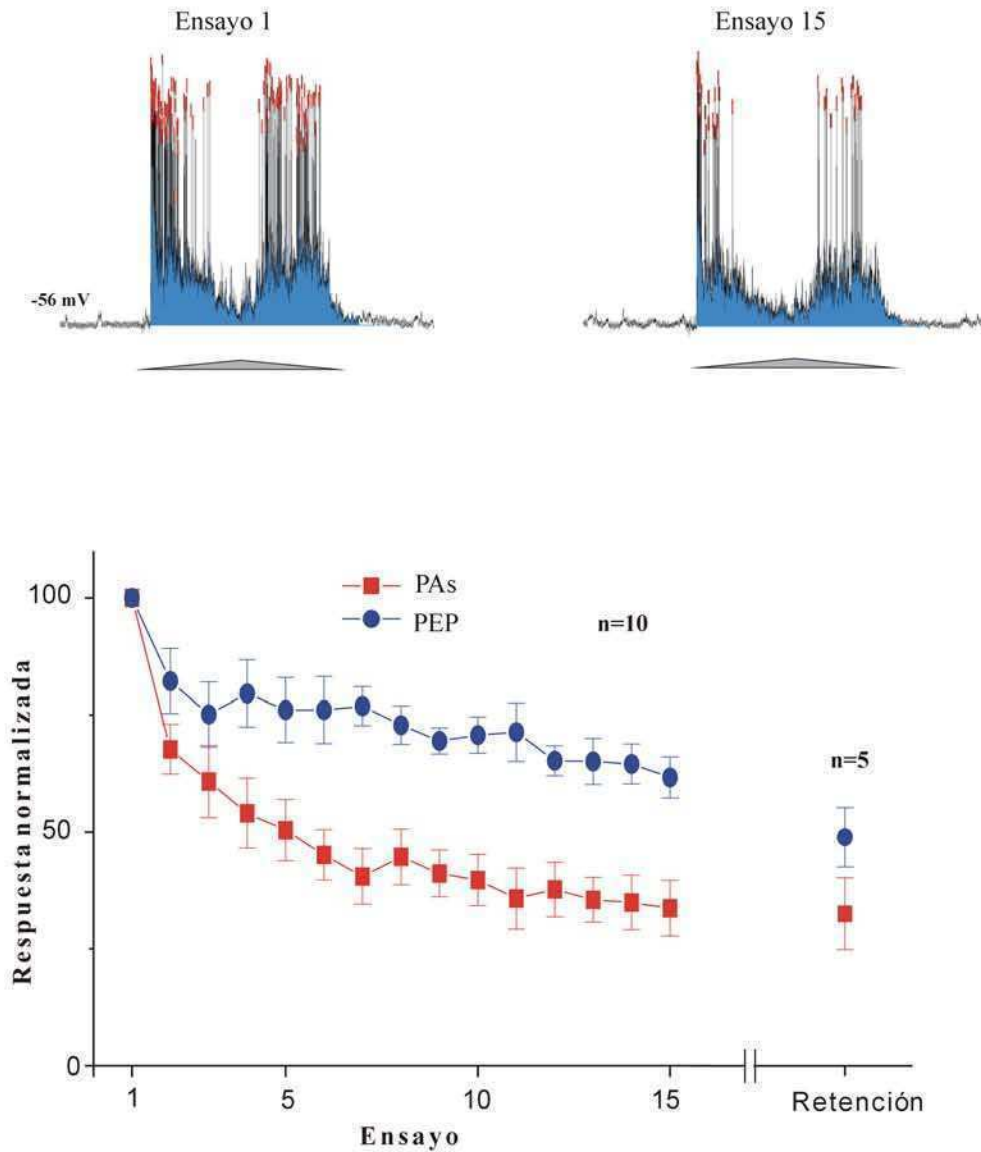
Relación entre PEP y PAs para un entrenamiento masivo



En el *panel superior* se ilustran el PEP y los PAs evocados por el EVP para los ensayos 1 y 15 de un entrenamiento masivo. Por claridad sólo mostramos el primero de los dos pasajes de los que consiste cada ensayo de estimulación. Como se observa en el gráfico de *abajo*, durante un entrenamiento masivo se produce una disminución de la entrada neuronal (la magnitud de los PEP, en *azul*) suficiente como para explicar la reducción en su salida (el número de PA, en *rojo*). La magnitud de los PEP se cuantificó, una vez sustraídos los PAs, como el área bajo la curva durante el desplazamiento del EVP. En este mismo período se contó el número de potenciales de acción (PAs). Los valores del gráfico corresponden a los promedios de las respuestas individuales normalizadas. Así, la entrada y la salida neuronal quedan expresadas como porcentaje de cambio y resultan cotejables. Este procedimiento, además, facilita el análisis ya que de este modo disminuye la variabilidad entre células. Los datos analizados ($n=10$) corresponden a una submuestra del experimento de la figura 36.

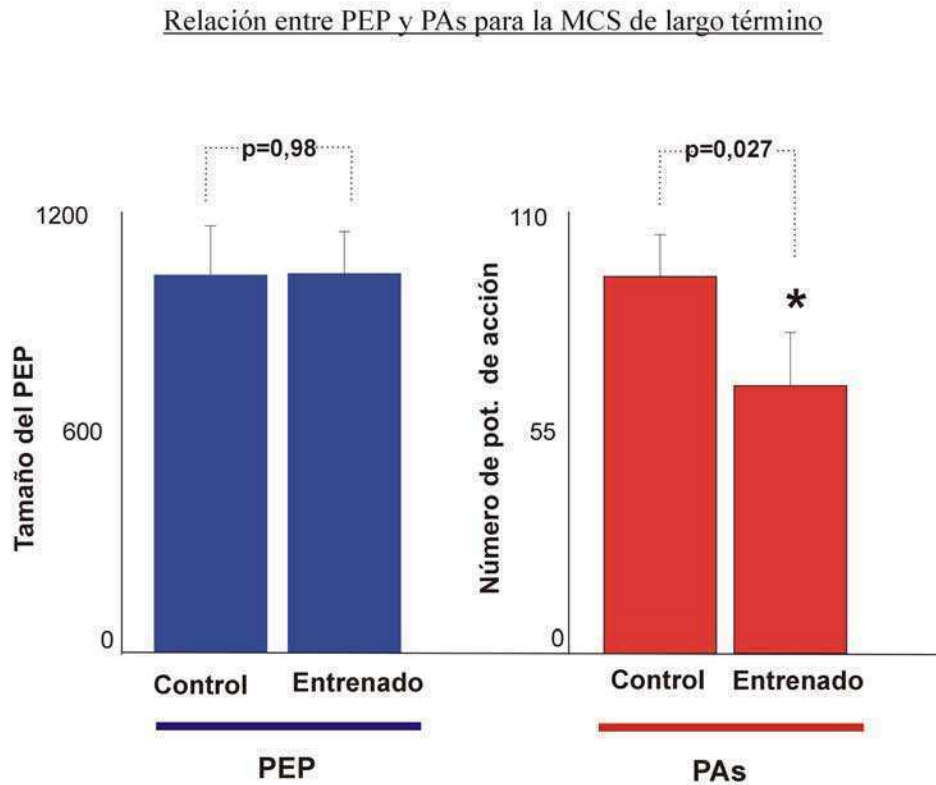
Figura 43: Relación entrada-salida en las NDM durante el entrenamiento espaciado.

Relación entre PEP y PAs para un entrenamiento espaciado



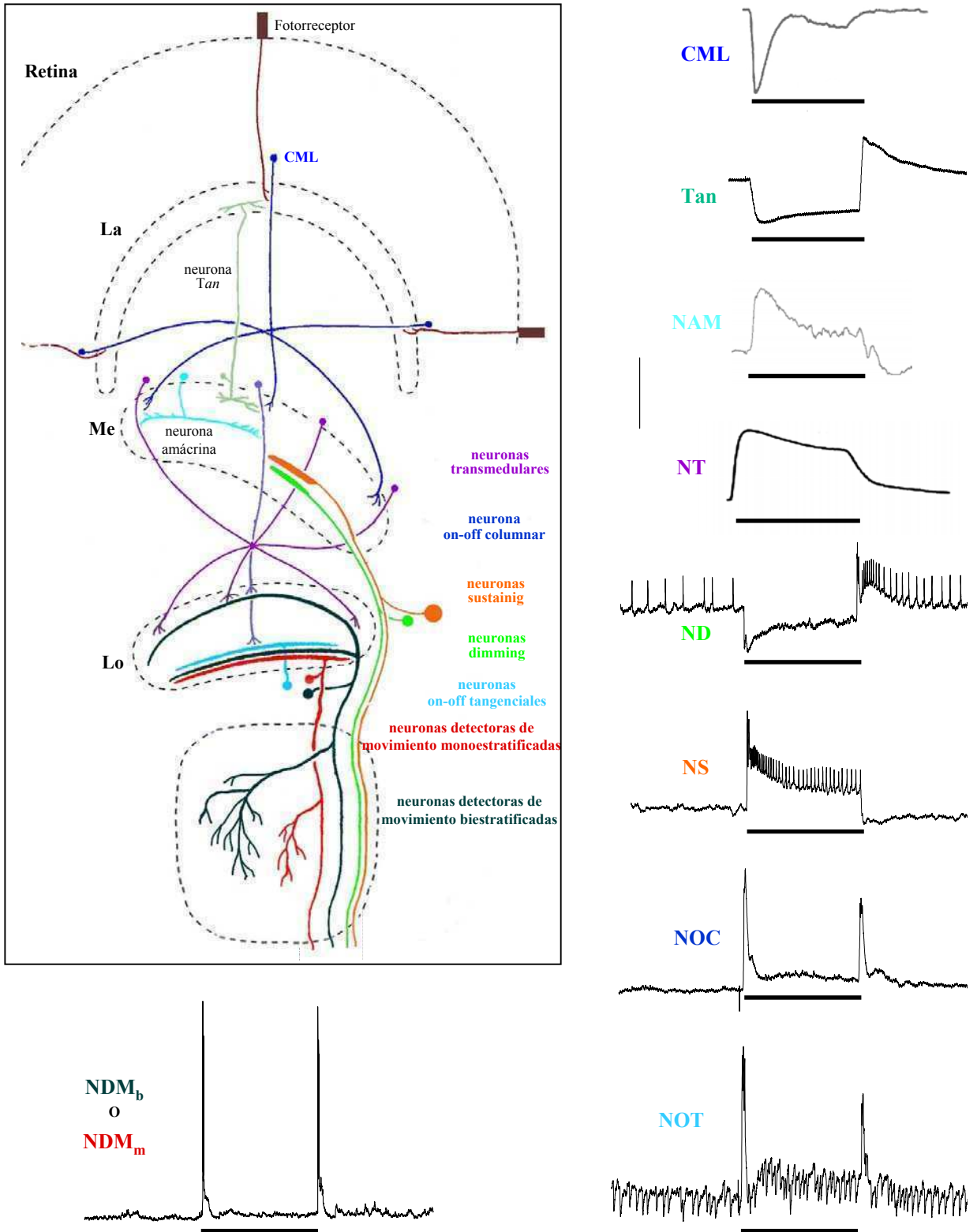
En el *panel superior* se ilustran el PEP y los PAs evocados por el EVP para los ensayos 1 y 15 de un entrenamiento espaciado. Como se observa en el gráfico de *abajo*, durante un entrenamiento espaciado se produce una disminución de la entrada neuronal (PEP, en azul) que parece tener dos fases: la primera (del ensayo 1 al 3) de caída rápida y la segunda (del ensayo 4 al 15) de tipo asintótica. Sin embargo, la salida neuronal (PAs, en rojo) muestra una disminución monótonica continua a lo largo del entrenamiento. Los datos analizados ($n=10$) corresponden a una submuestra del experimento de la figura 35.

Figura 44: Relación entrada-salida en las NDM para la MCS de largo término.



Veinticuatro (24) horas después de un entrenamiento espaciado la función de transferencia (relación entrada-salida) de las NDM de cangrejos previamente entrenados difiere de la de cangrejos controles. El análisis estadístico revela que la entrada neuronal (PEP) es idéntica entre neuronas del grupo control y neuronas del grupo entrenado (*t*-test de dos colas, $p=0,98$, $n=30$). En cambio, para las mismas neuronas, la salida neuronal (PAs) es significativamente diferente (*t*-test de dos colas, $p<0,05$, $n=30$). El que ocurra una disminución de la salida neuronal sin cambios en la entrada indicaría una modificación en la transmisión de información a nivel de las NDM como resultado del entrenamiento ocurrido 24 hs antes. Los datos analizados corresponden a una submuestra del experimento de la figura 38. Más detalles sobre la cuantificación del PEP y de los PAs en la figura 42.

Figura 45: Elementos del sistema visual de crustáceos.



Sobre la izquierda se muestra un esquema de la ubicación y morfología general de las interneneuronas visuales estudiadas en el lóbulo óptico de crustáceos. Las abreviaturas corresponden a: células monopolares de la lámina (CML), neuronas amácrinas de la médula (NAM), neuronas sustainig (NS), neuronas dimming (ND), neurona on-off columnar (NOC), neuronas on-off tangenciales de la lóbula (NOT), neuronas detectoras de movimiento biestratificadas (NDM_b) y neuronas detectoras de movimiento monoestratificadas (NDM_m). En la columna derecha y abajo a la izquierda se muestran registros intracelulares de la respuesta a un PL de las neuronas estudiadas. En el caso de las NDM, la respuesta al PL varía considerablemente entre distintas neuronas. El registro de la neurona on-off columnar corresponde a la neurona oportunamente teñida. La barra horizontal respresenta un PL (1 seg) y la escala de voltaje representa aproximadamente 10 mV.

