

## Tesis Doctoral

# Participación de la dopamina en el aprendizaje y la formación de memorias apetitivas y aversivas

Klappenbach, Martín

2017-03-16

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Klappenbach, Martín. (2017-03-16). Participación de la dopamina en el aprendizaje y la formación de memorias apetitivas y aversivas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

#### Cita tipo Chicago:

Klappenbach, Martín. "Participación de la dopamina en el aprendizaje y la formación de memorias apetitivas y aversivas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-16.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# Participación de la dopamina en el aprendizaje y la formación de memorias apetitivas y aversivas

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

Lic. Martín Klappenbach

Director de Tesis: Dr. Fernando Locatelli  
Consejero de Estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Neurobiología de la Memoria, IFIByNE-  
CONICET. Departamento de Fisiología Biología Molecular y Celular,  
FCEyN, UBA

16 de marzo de 2017

## **Resumen**

Los mecanismos neurobiológicos asociados al aprendizaje y la memoria han sido principalmente estudiados basados en episodios puramente aversivos o apetitivos. Mediante esa estrategia se identificó en distintos modelos artrópodos, incluyendo insectos y crustáceos, que el neurotransmisor dopamina señala los estímulos aversivos mientras el neurotransmisor octopamina participa en la señalización de los apetitivos. En este trabajo he desafiado este enfoque teniendo en cuenta que en la vida real los estímulos que un animal aprende a reconocer y en base a los cuales toma decisiones, predicen en muchos casos consecuencias apetitivas y aversivas. En este contexto planteé que la interacción entre la información apetitiva y aversiva contenida en una experiencia debe ser un proceso intrínseco de los procesos de aprendizaje y memoria. Con el objetivo de explorar esa hipótesis me propuse estudiar si la dopamina, además de responsable de señalar los estímulos aversivos, afecta la formación de una memoria apetitiva, y en qué medida ese efecto representa la situación en la cual un estímulo aversivo interfiere un aprendizaje o memoria apetitiva. Para esto, utilicé 3 modelos animales distintos, bien descritos en la bibliografía, el cangrejo *Neohelice granulata*, la abeja *Apis mellifera* y la mosca *Drosophila melanogaster* que me permitieran estudiar cierta universalidad de los conceptos abordados. Para el diseño y realización de los experimentos aproveché las ventajas experimentales que brinda cada uno de estos modelos para contestar preguntas relacionadas con la representación neuroquímica de los estímulos que subyacen a la formación de la memoria. Realicé experimentos comportamentales combinados con manipulación farmacológica y genética para estudiar la interacción entre memorias apetitivas y aversivas. Además, realicé una descripción neuroanatómica del sistema dopaminérgico en abeja y en cangrejo. A partir de los resultados obtenidos puedo concluir que la dopamina, no solo instruye la formación de la memoria aversiva sino que también interfiere con la memoria apetitiva. También comprobé que luego de una experiencia mixta en la que dos estímulos incondicionados opuestos se asocian a un mismo contexto, se conforman dos memorias independientes que compiten en el momento de la expresión. La memoria que se expresa depende del balance entre la fuerza de los estímulos incondicionados y de factores motivacionales al momento de la evocación. Esto otorga al sistema un gran valor adaptativo, ya que, tras situaciones de aprendizajes con

estímulos incondicionados contradictorios los animales establecen memorias que pueden ser alternativamente expresadas dependiendo de necesidades específicas del momento.

Palabras claves: dopamina, memoria apetitiva, memoria aversiva, *Drosophila*, *Neohelice*, *Apis*

## **Abstract**

Neurobiological mechanisms associated with learning and memory have been primarily studied based on purely aversive or appetitive episodes. Through this strategy, it was identified in different arthropod models, including insects and crustaceans, that the neurotransmitter dopamine signals the aversive stimuli while the neurotransmitter octopamine participates in the signaling of the appetitive ones. In this work I have challenged this approach by taking into account that in real life the stimuli that an animal learns to recognize and on the basis of which it makes decisions predict in many cases appetitive and aversive consequences. In this context I think that the interaction between the appetitive and aversive information contained in an experience must be an intrinsic process of learning and memory processes. In order to explore this hypothesis I decided to study whether dopamine, in addition of being responsible for signaling aversive stimuli, affects the formation of an appetitive memory, and to what extent this effect represents the situation in which an aversive stimulus interferes with appetitive learning or memory. For this, I used three different animal models, well described in the literature, the crab *Neohelice granulata*, the bee *Apis mellifera* and the fly *Drosophila melanogaster* that allowed me to study some universality of the concepts that was addressed. For the design and realization of the experiments I took benefit of the experimental advantages of each of these models to answer questions related to the neurochemical representation of the stimuli that underlie the formation of memory. I conducted behavioral experiments combined with pharmacological and genetic manipulation to study the interaction between appetitive and aversive memories. In addition, I performed a neuroanatomical description of the dopaminergic system in bees and crabs. From the results obtained I can conclude that dopamine not only instructs the formation of aversive memory but also interferes with appetitive memory. I also found that after a mixed experience in which two opposing unconditioned stimuli are associated with the same context, two independent memories compete at the moment of expression. The memory that is expressed depends on the balance between the strength of unconditioned stimuli and on motivational factors at the time of

evocation. This gives the system a great adaptive value, since, after situations of learning with contradictory unconditioned stimuli, the animals establish independent memories that can be alternatively expressed depending on the specific needs of the moment.

Keywords: dopamine, appetitive memory, aversive memory, *Drosophila*, *Neohelice*, *Apis*

**Los resultados mostrados en esta tesis fueron parcial o totalmente publicados en los siguientes trabajos:**

- Martín Klappenbach, Ayelén Nally y Fernando Locatelli. **Parallel memory traces are built after an experience containing aversive and appetitive components in the crab *Neohelice***. Manuscrito en revision.
- Gaurav Das, Martín Klappenbach, Eleftheria Vrontou, Emmanuel Perisse, Christopher M. Clark, Christopher J. Burke y Scott Waddell (2014). **Drosophila Learn Opposing Components of a Compound Food Stimulus**. *Curr Biol.* 24(15): 1723-1730
- Martín Klappenbach, Laura Kaczer y Fernando Locatelli (2013). **Dopamine impairs appetitive long-term memory formation in honey bees**. *Neurobiol Learn Mem.* 106C:230-237.
- Martín Klappenbach, Héctor Maldonado, Fernando Locatelli y Laura Kaczer (2012). **Opposite actions of dopamine on aversive and appetitive memories in the crab**. *Learn Mem.* 19(2):73-83.

## **Agradecimientos**

- A Fer, por su confianza en mi trabajo, por no dudar jamás de este proyecto, por su honestidad. Por estar siempre para acompañarme, con lo que haga falta.
- A Laura, por las muchas conversaciones científicas estimulantes, por escuchar y acompañarme cuando lo necesité.
- A Héctor, por su ejemplo como científico y como persona, por darme la oportunidad de trabajar en lo que me gusta.
- A Ángel, por las decenas de dispositivos que me hizo, y las miles de veces que me explicó cómo usarlos sin perder la paciencia. Más importante, por su nobleza.
- A Arturo, por darme la oportunidad de tener la beca para hacer este trabajo.
- A Juli S, por ayudarme a entender las inmunos.
- A Nico P, por darme una mano con la parte de moscas
- A Ramiro, por estar siempre dispuesto a contarme la historia más rara que pueda imaginar y hacer mejor el día de trabajo.
- A Tincho, por tantas charlas de fútbol, por ofrecer siempre su ayuda.
- A Amaicha, por estar siempre dispuesta a darme un consejo. Por preocuparse por mí.
- A Nara, por su entusiasmo y confianza en mí, por la buena onda permanente.
- Al plantel docente de IFM, porque dar clases con tan buena gente te llena de energía.
- Al LNM, por la calidad humana de sus integrantes, que hace mucho más fácil el trabajo.
- A Emi y a Aye, por estar siempre dispuestos a ayudarme.
- A Scott, por darme la oportunidad de demostrarme lo que puedo hacer, por confiar en mí para el proyecto, por proponerme nuevos desafíos.
- A Gaurav, por su ayuda desinteresada, porque personas como él son difíciles de encontrar
- A Vincent, Manu, Wolf, Suewei y Johannes, por ayudarme en el trabajo y por tratar de que estuviera lo mejor posible fuera del laboratorio.
- A Caro, por sus consejos, porque sin ella no habría sido posible mi viaje, por hacer que la distancia no sea tan grande
- A la UBA y a la educación pública en general, por darme la posibilidad de formarme desde hace 27 años.



- Al CONICET, Boehringer, DFBMC, SAN e ISN, por las distintas becas que hicieron posible este doctorado
- A mis amigos de la facultad, por las cenas del cuartito, porque nos podemos ver poco pero eso no nos aleja.
- A Nadia, Gise, Lulú, Angie, María y Marcos, porque uno no siempre se puede hacer amigos en el lugar donde trabaja, y yo tuve la suerte de conocerlos
- A Chango, por hacer que el domingo a la tarde sea el mejor y más esperado momento de la semana
- A Lu, por todos los años de amor y felicidad que compartimos juntos. Por ayudarme a crecer y a ser una mejor persona.
- A Diego, porque no debe ser fácil ser mi cuñado y sin embargo nunca me lo hizo notar. Por acompañar a mi hermana y a mi sobrina.
- A mi papá, por fomentar mi curiosidad.
- A mi hermana, por su compañía incondicional, que sé que va a durar para siempre
- A mi mamá, porque a ella le debo todo lo que soy.
- A Cande, por sacar lo mejor de mí y ofrecer siempre lo mejor de ella. Por el camino que estamos empezando a recorrer juntos.
- A Cata, porque con una sonrisa hace que todo valga la pena.

# Índice

1.Introducción .....	1
1.A Aprendizaje y memoria.....	1
1.B Fases de la memoria .....	3
1.C La memoria en la abeja <i>Apis mellifera</i> .....	6
1.D La memoria en el cangrejo <i>Neohelice granulata</i> .....	7
1.D.1 Memoria Aversiva .....	7
1.D.2 Memoria apetitiva .....	9
1.D.3. Reconsolidación .....	10
1.E La memoria en la mosca <i>Drosophila melanogaster</i> .....	12
1.F Señalización de estímulos aversivos y apetitivos por parte de las aminas biogénicas .....	13
1.F.1 La dopamina .....	13
1.F.2 Distintos roles de la dopamina en invertebrados .....	14
1.F.3 La octopamina .....	15
1.F.5 Las aminas en la memoria de los invertebrados .....	17
1.F.6 Aminas biogénicas y aprendizaje en cangrejos .....	20
1.F.7 Interacción entre los sistemas de señalización .....	20
Hipótesis general de trabajo .....	23
2. Materiales y Métodos .....	24
2.A Cangrejo <i>Neohelice granulata</i> .....	24
2.A.1 Animales.....	24
2.A.2 Metodología general.....	24
2.A.3 Dispositivo experimental .....	25
2.A.4 Paradigma apetitivo .....	27
2.A.5 Paradigma aversivo.....	28
2.A.6 Entrenamiento mixto .....	28
2.A.7 Análisis estadístico .....	29
2.A.8 Farmacología.....	30
2.A.9 Inmunohistoquímica .....	30
2.B Abeja <i>Apis mellifera</i> .....	31
2.B.1 Animales.....	31
2.B.2 Protocolo experimental .....	32

2.B.3 Análisis estadístico .....	33
2.B.4 Farmacología .....	33
2.C Mosca <i>Drosophila melanogaster</i> .....	33
2.C.1 Animales .....	33
2.C.2 Dispositivo experimental .....	34
2.C.3 Entrenamiento .....	34
2.C.4 Evaluación .....	35
2.C.5 Análisis estadístico .....	36
3. Resultados .....	37
3.A Rol de la dopamina sobre el aprendizaje apetitivo .....	37
3.A.1 La dopamina interfiere con la memoria apetitiva cuando se administra antes del entrenamiento .....	37
3.A.2 La dopamina no interfiere con la evocación de la memoria apetitiva. ....	43
3.A.3 Antagonistas de receptores dopaminérgicos mejoran la memoria apetitiva en abejas pero no en cangrejos .....	44
Figuras de la sección 3.A .....	48
3.B Efecto de dos entrenamientos simultáneos de signo opuesto .....	60
3.B.1 Cangrejo <i>Neohelice granulata</i> .....	61
3.B.2 Mosca <i>Drosophila melanogaster</i> .....	71
Figuras de la sección 3.B .....	77
3.C Descripción inicial del sistema dopaminérgico en abeja y cangrejo a partir de ensayos de inmunohistoquímica .....	91
3.C.1 Cangrejo <i>Neohelice granulata</i> .....	91
3.C.2 Abeja <i>Apis mellifera</i> .....	94
Figuras de la sección 3.C .....	96
Conclusión .....	103
Discusión .....	105
<b>Bibliografía</b> .....	112

# 1.Introducción

## 1.A Aprendizaje y memoria

A lo largo de este trabajo utilizaré la definición de aprendizaje de William Thorpe, que postula al mismo como un cambio adaptativo en el comportamiento, que es generado partir de la experiencia (Thorpe, 1963). Clásicamente se ha definido a la memoria como la retención de este cambio en el tiempo. Yadin Dudai, desde una perspectiva neurobiológica define a la memoria como una representación interna del mundo, que es generada a través de la experiencia y que es codificada espaciotemporalmente en circuito neuronales (Dudai, 2002). El propósito general de este trabajo de tesis es estudiar algunos aspectos de esta codificación, utilizando tres modelos invertebrados. En este sentido, nos parece sumamente enriquecedor hacer un estudio comparativo entre distintas especies. Muchas veces nos centramos en un único modelo, obteniendo del mismo valiosa información. Sin embargo, esta vez preferimos comparar distintas especies, para así poder estudiar mecanismos básicos que subyacen a los mecanismos utilizados a través del árbol filogenético así que como también entender las diferencias entre especies en el contexto ecológico de cada una de ellas.

Se han descripto diversos de tipos de aprendizaje, y estos pueden ser clasificados según distintos criterios. Uno de ellos, muy utilizado, es el de la asociatividad. En base a ello, se distingue a los aprendizajes de tipo asociativo de los no asociativos, y se postula a estos últimos como la forma probablemente más simple de aprendizaje, por la cual, el animal cambia su comportamiento luego de la presentación de un único estímulo. Los tipos más estudiados son la sensibilización y la habituación. Veamos primero el caso de la sensibilización y luego el de habituación.

En primer lugar se observa que, ante la presentación de un estímulo saliente, que es nocivo o al menos molesto, el animal tiene un comportamiento determinado que involucra algún tipo de respuesta de escape o evitación. Por otro lado, ante estímulos positivos, los animales tienen comportamientos de aproximación. Ahora bien, si la presentación del estímulo incrementa la probabilidad o la intensidad de la respuesta evocada en un evento subsiguiente, entonces decimos que esto es producto de un mecanismo de sensibilización. En términos adaptativos, este fenómeno tiene un gran valor; comenta Konrad Lorenz que si un gusano evita ser comido por un pájaro, resulta conveniente disminuir el umbral de respuesta ante un estímulo similar, ya que probablemente el predador siga estando cerca en los siguientes segundos (Lorenz, 1981). Este fenómeno ha sido estudiado en distintas especies animales, pero quizás sea el de *Aplysia* el mejor modelo para entenderlo,

ya que en él se ha hecho una descripción exhaustiva desde una aproximación comportamental y de los circuitos (Kandel, 2001).

Por otro lado, la presentación de un estímulo de manera reiterada puede tener el efecto opuesto al antes mencionado, es decir, la disminución en la probabilidad o en la intensidad de la respuesta. Este fenómeno es lo que se ha descrito como habituación. En una revisión clásica sobre este tópico, Thompson y Spencer hacen una caracterización del fenómeno en base a las características que presenta la habituación y estas se mantienen prácticamente inalteradas hasta hoy en día (Thompson and Spencer, 1966). Si bien en un inicio se postuló que la habituación era un fenómeno no asociativo, luego se ha visto que existen situaciones particulares en las que la habituación es contexto específica (Rankin, 2000). En particular, si bien haré una descripción de esto más adelante, el paradigma de memoria del cangrejo *Neohelice* se postuló en un inicio como un fenómeno de habituación, pero luego se demostró que existe una asociación efectiva entre el estímulo visual de peligro y el contexto en donde éste es recibido (Hermitte et al., 1999). Los ejemplos de habituación contexto específica hacen pensar que la distinción entre tipos de aprendizaje no es siempre tan sencilla.

En el marco de los aprendizajes asociativos simples, los más estudiados son el condicionamiento clásico, también conocido como condicionamiento Pavloviano, y el condicionamiento instrumental, también llamado condicionamiento Skinneriano. Dada la relevancia de estos trabajos, sumado a la gran cantidad de investigaciones que se realizaron a partir de los trabajos seminales, existen numerosos artículos, comentarios y libros de textos sobre el tema. No es mi objetivo hacer un análisis exhaustivo de los mismos, sino solamente mencionar los conceptos esenciales que serán abordados en este trabajo.

El aprendizaje asociativo brinda una gran ventaja adaptativa, ya que le permiten a los individuos extraer las características relevantes del mundo que lo rodea, posibilitándole hacer predicciones acerca de los estímulos que se le presentan y sus potenciales consecuencias. En el condicionamiento clásico, se presentan de forma contingente dos estímulos. El *estímulo condicionado* (CS) es inicialmente neutro, aunque saliente; es decir, el animal percibe al estímulo, pero éste no es ni positivo ni negativo. El otro estímulo es el *estímulo incondicionado* (US), que es un estímulo que tiene un significado biológico para el animal y que desencadena una respuesta denominada *respuesta incondicionada* (UR). A partir de la presentación pareada de los dos estímulos se observa que el animal comienza a responder ante la sola presentación del CS. Esta respuesta, que

comportamentalmente suele observarse igual que la UR pasa a denominarse ahora *respuesta condicionada* (CR), ya que es el CS la que lo desencadena. Es importante destacar entonces el valor predictivo que adquiere el CS luego de la presentación conjunta de los dos estímulos, ya que le permite al animal anticipar la aparición del US. Ejemplo de este tipo de aprendizaje asociativo es el condicionamiento de extensión de la probóscide en la abeja, y el condicionamiento olfativo en moscas, ambos utilizados en este trabajo de tesis, sobre los cuales me explayaré más adelante.

En el condicionamiento instrumental el animal aprende la relación causal entre una acción propia con su consecuencia. En este caso, la contingencia se da entre la acción del animal, que llamaremos respuesta (R) y el estímulo incondicionado (US). A partir de esta asociación es que el animal tratará de repetir acciones con consecuencias favorables y evitará las que tengan consecuencias desfavorables.

## 1.B Fases de la memoria

Podemos dividir a los procesos de aprendizaje y memoria en distintas fases. Comentaré las involucradas en este trabajo, sin ahondar en el resto. La primera fase que podemos describir es la de *adquisición*. Este es el momento en el que se produce la codificación neuronal de la experiencia. Entonces, la experiencia queda representada internamente a partir de la modificación de uno o varios circuitos neuronales.

Ahora bien, éste es un cambio frágil, que no podría mantenerse de forma estable si no fuera por el proceso de *consolidación*. Se distinguen dos tipos de consolidación, una a nivel celular y otra a nivel sistémico. Históricamente, podríamos situar una de las primeras descripciones sobre el tema a fines del siglo XIX, cuando a partir de la observación de pacientes que sufrían de amnesia retrógrada luego de un trauma cerebral se propuso la “Ley de la regresión”. Lo que se veía es que las personas olvidaban los eventos cercanos al accidente, aunque no se veían afectados los más remotos (Ribot 1882). Estas observaciones hicieron pensar que un proceso permanecía activo luego de esos eventos, el cual era necesario para fijar el recuerdo. Unos años más tarde, realizando experimentos controlados en humanos en los que los sujetos experimentales debían aprender distintas listas de sílabas sin sentido semántico, Müller y Pilzecker observaron que el aprendizaje de una lista interfería con el recuerdo de una lista anterior. A partir de esta observación concluyeron “el proceso que sirve para la formación de asociaciones de una lista de sílabas continua por un tiempo después de leer la misma, pero puede ser debilitado por otro proceso mental intenso y lo llamaron

*inhibición retroactiva (Müller and Pilzecker 1900)*. En su trabajo, publicado en una monografía que recopila 40 experimentos llevados a cabo durante casi 10 años, los autores prueban también, entre otros fenómenos, que esta inhibición se producía si las dos listas estaban separadas por 34 segundos, pero que no era así si el tiempo entre las mismas era de 6 minutos, sembrando la idea de que este proceso tenía una duración definida. Durante los siguientes años se ha probado una gran cantidad de agentes farmacológicos que interfieren con la consolidación de la memoria, lo que permitió describir los requerimientos moleculares de la misma. Los más universales son la transcripción génica y la síntesis *de novo* de proteínas, que son necesarias para la estabilización de los cambios en conexiones sinápticas (Bekinschtein et al., 2007; Davis and Squire, 1984; Flood et al., 1973; Goebel et al., 1986). Se suele definir entonces a la “ventana de consolidación” como el período en el que estos tratamientos amnésicos tienen efecto (Izquierdo, 1989). Asimismo, durante este período también se puede inducir la formación de una memoria más fuerte, a través de la administración de distintos agentes facilitadores, como moduladores en los niveles de actividad de proteína kinasa A (PKA), noradrenalina y angiotensina II (Abel and Kandel, 1998; Delorenzi et al., 1995; Romano et al., 1996; Roozendaal et al., 1999).

La consolidación celular puede involucrar distintos procesos moleculares asociados a diferentes eventos más o menos independientes entre sí, que posibilitan el establecimiento a largo término de las conexiones sinápticas modificadas durante la adquisición. Por su parte, nos referimos con consolidación sistémica al proceso por el cual se produce una reorganización de los circuitos involucrados en la memoria, que usualmente comienza a requerir de estructuras distintas: clásicamente, en vertebrados se observa que memorias que inicialmente son dependientes del hipocampo pasan a depender de corteza. Cabe destacar la diferencia temporal entre los dos tipos de consolidación, ya que si bien la ventana de consolidación celular suele ser de minutos a horas, la consolidación sistémica suele requerir meses (Kim and Fanselow, 1992).

Ahora bien, para que la información almacenada pueda ser utilizada es necesario que se dé otro proceso, denominado *evocación*. Es a partir de la presentación de un estímulo que funciona como recordatorio que la memoria puede activarse, y así tomar el control del comportamiento (Sara, 2000). No obstante, en los últimos años se ha diferenciado también entre la evocación y la expresión de la memoria como instancias separadas. Es decir, existen circunstancias en las que la memoria podría ser evocada, siendo posible que se produzca alguna modificación en la misma, sin que la memoria sea expresada comportamentalmente (Delorenzi et al., 2014).

Si bien durante mucho tiempo se pensó que una vez consolidada la memoria era inalterable, sometida a lo sumo a un proceso de olvido con el tiempo, hace ya varios años que se demostró que esto no es así. Se observó que, luego de la evocación, la memoria pasa por un proceso de inestabilidad, en el que es nuevamente susceptible a la interferencia de distintos agentes amnésicos (Misanin et al., 1968; Nader et al., 2000). A ese estado se lo denominó *labilización*, y al proceso subsiguiente que permite la estabilización de la memoria se lo denomina *reconsolidación*. El nombre apunta a que, de la misma forma que ocurre durante la consolidación, durante la reconsolidación la memoria pasa por un proceso de estabilización; no obstante, la fase de reconsolidación no es una mera recapitulación de la consolidación (Cristina Alberini hace un interesante relevamiento sobre similitudes y diferencias entre las fases en (Alberini, 2005)). Sin embargo, comparten algunos de los requerimientos moleculares, como la transcripción génica y la necesidad de síntesis proteica. Es interesante el rol adaptativo que se postula para esta fase de la memoria: la ventaja consiste en poder actualizar la información, ya sea mediante el fortalecimiento de la memoria previamente consolidada o mediante el agregado de nueva información a esa memoria. De esta breve explicación se desprende también la razón por la cual se piensa que esta fase podría ser el blanco de terapias para contrarrestar el estrés postraumático o memorias no adaptativas. Sin embargo, son pocos aun los casos en los que se han diseñado protocolos efectivos para ello (Björkstrand et al., 2016).

Para que se produzca la evocación de la memoria es necesario que exista una clave, llamada recordatorio. Es importante tener en cuenta las condiciones paramétricas que debe tener el mismo para inducir la labilización, dando paso luego a la reconsolidación de la memoria. Obviamente estas varían entre especies e incluso entre las distintas tareas aprendidas, pero una condición clave es el de la duración del recordatorio. Si éste es corto se induce la labilización de la memoria, pero si el mismo es demasiado largo puede formarse una nueva memoria entre el CS original y la ausencia del US (Pedreira and Maldonado, 2003). Como esta memoria produce el decremento de la respuesta condicionada, se la llama memoria de *extinción*, ya que se extingue la CR. Sin embargo, no debe confundirse a la extinción con una interferencia de la memoria original, ni con un proceso de olvido, sino que son dos memorias cuya salida comportamental es opuesta y que compiten por el control del comportamiento. La formación de la memoria de extinción fue descrita por Pavlov y existen numerosos trabajos sobre el tema (Pavlov 1927). Ya que no trabajé en este tema no profundizaré más en este tópico



## 1.C La memoria en la abeja *Apis mellifera*

Haré aquí una corta reseña sobre el paradigma de condicionamiento del reflejo de extensión de la probóscide (PER, por sus siglas en inglés; proboscis extension reflex). Éste ha sido ampliamente utilizado y descrito numerosas veces. Pueden resultar de particular interés los siguientes trabajos (Eisenhardt, 2014; Giurfa and Sandoz, 2012; Matsumoto et al., 2012; Menzel, 2012; Mercer, 2008).

El paradigma de condicionamiento más comúnmente utilizado en la abeja *Apis mellifera* se basa en la asociación entre un olor y la presencia de solución azucarada. Si bien usualmente se considera que fue Kimihisa Takeda (Takeda, 1961) el que dio origen al paradigma utilizado hoy en día, en la década de 1940, Hubert Frings, estudiando cómo las abejas percibían olores, documentó que los animales extendían su probóscide cuando sus patas o antenas tocaban una solución azucarada, y que esta respuesta podía ser asociada con la presencia de un olor (Frings 1944). No obstante, no fue hasta 40 años después que el paradigma fue perfeccionado y estandarizado en el trabajo desarrollado por M.E Bitterman (Bitterman et al., 1983). A partir del mismo, las abejas son inmovilizadas individualmente en un cepo que impide el movimiento de todo el cuerpo con excepción de las antenas y las piezas bucales. Una vez colocadas en los cepos, se espera al menos unas horas antes de comenzar el entrenamiento. Esto se hace para asegurarse que los animales se hayan recuperado totalmente de la anestesia (necesaria para inmovilizarlas) y para que lleguen al inicio del entrenamiento con suficiente hambre. El condicionamiento utilizado es del tipo Pavloviano, cuyas bases han sido explicadas anteriormente (los detalles de la metodología serán explicados en la sección de Materiales y Métodos). En este caso, el CS es un olor, que es administrado con una jeringa o con un olfatómetro (esto último permite controlar mucho mejor la duración del estímulo y la composición del aire que el animal recibe, lo que es particularmente útil cuando se estudia el aprendizaje de mezclas de olores) y el US es una solución azucarada que se le da a los animales con un palillo de madera o, de manera más controlada, mediante una microjeringa (lo que permite controlar con mayor precisión la cantidad de solución que las abejas reciben). Se establece un protocolo de *forward conditioning*, en el que el CS antecede a la aparición del US, terminando juntos. Normalmente la duración del CS es de entre 3 y 5 segundos y la del US entre 2 y 3 segundos. Mientras los animales reciben el

CS, se toca las antenas de la abeja con la solución azucarada, lo que provoca el reflejo de extensión de la probóscide (PER) y se deja que las abejas se alimenten durante el tiempo pautado. Se ha demostrado que con tan sólo 3 ensayos de entrenamiento los animales generan una memoria que dura, al menos, 96 horas. En su trabajo seminal, Bitterman comprueba distintas propiedades diagnósticas del condicionamiento clásico que habían sido demostradas en otros paradigmas del mismo tipo. Entre ellas se encuentran: la necesidad de que haya una contingencia CS-US para que se forme la memoria, la ocurrencia de condicionamiento de segundo orden y de la extinción (con su respectiva recuperación espontánea). Años más tarde se ha comprobado que la memoria del condicionamiento de PER es dependiente de la transcripción génica y de la síntesis de *novο* deproteínas (Wustenberg et al., 1998). Se puede separar a la misma en distintas fases temporales (corto, medio, largo término) y se han identificado distintos requerimientos moleculares para cada una de ellas (Friedrich et al., 2004; Matsumoto et al., 2014).

## 1.D La memoria en el cangrejo *Neohelice granulata*

En esta tesis utilicé dos paradigmas de aprendizaje en el modelo de cangrejo, uno apetitivo y otro aversivo. El paradigma aversivo se ha usado por más de treinta años y puede ser consultado en distintos artículos (Maldonado et al., 1997; Romano et al., 2006; Tomsic et al., 2009). El paradigma apetitivo ha sido desarrollado hace menos tiempo, por lo que aún no existe ningún trabajo de revisión sobre el tema. De todos modos, los detalles de su puesta a punto pueden ser consultados en la tesis doctoral de la Dra. Laura Kaczer (Kaczer 2009) y en varias publicaciones (Kaczer and Maldonado, 2009; Kaczer et al., 2011; Klappenbach et al., 2012).

### 1.D.1 Memoria Aversiva

El paradigma de memoria aversiva, también conocido como Memoria Contexto-Señal (MCS) se basa en la asociación entre un contexto de entrenamiento y el movimiento de una figura rectangular negra por encima de los animales, que es detectado como una señal visual de peligro. En su ambiente natural, las rías de San Clemente del Tuyú, estos animales son predados mayormente por aves, entre las que se destaca la gaviota cangrejera (Berón, 2003). Es probable que, ante esta presión de selección, haya resultado adaptativo desencadenar un escape ante la presencia de estímulos que pasen por sobre el horizonte visual de los

animales. Sin embargo, no todos los estímulos de esas características resultan peligrosos ya que ésta también es una zona de pastos altos que son movidos por el viento. Teniendo en cuenta esto, es entendible que resulte adaptativo dejar de escapar ante la presentación repetida de estímulos que no conllevan a una consecuencia negativa. Fue a partir de conocer las características ecológicas de los animales, que el Dr. Héctor Maldonado junto a colaboradores desarrolló un paradigma para estudiar fenómenos de aprendizaje y memoria en el laboratorio. En el mismo, los animales son colocados en un recipiente tipo *bowl* de paredes cóncavas. Se sabe que las claves del contexto son la iluminación, el color y forma del recipiente. En este contexto los animales reciben una sesión de entrenamiento, que consiste en pasajes sucesivos de una figura rectangular de color negra por encima de ellos. Teniendo en cuenta la conspicua respuesta de escape que desencadena en los animales, esta figura es denominada Estímulo Visual de peligro (EVP). Si bien ante esta estimulación los cangrejos en primera medida escapan, con el correr de sucesivas presentaciones la respuesta de escape decrece, dando la idea en primera instancia de que se trata de un paradigma de habituación clásica. Luego de estudios, se observó que el fenómeno no puede explicarse como un fenómeno de habituación, debido a que se demostró que existía una asociación entre el EVP y el contexto, ya que si los animales eran evaluados en un contexto incongruente con el del entrenamiento no expresaban la memoria (Hermitte et al., 1999). Más aún, lo que en un momento se pensaba que era un decremento en la respuesta de escape, luego se verificó que no era solamente eso, sino que durante el entrenamiento los animales construían una respuesta de *freezing*, caracterizada por una serie de cambios posturales claramente identificables. Es decir, que los animales cambian la respuesta de escape por otra respuesta activa, que no es simplemente ignorar al EVP sino adoptar un estrategia distinta (Pereyra et al., 2000). En una sesión de evaluación, que puede realizarse hasta al menos 96 horas después de la sesión de entrenamiento, cuando se presenta el EVP los animales entrenados tienen una respuesta de escape significativamente menor que la de un grupo no entrenado que es interpretada como respuesta de *freezing*. A pesar de que nosotros, como observadores, necesitamos de la presentación del EVP para evidenciar la retención de la memoria, se ha demostrado que la sola exposición al contexto produce la evocación de la misma (Pedreira et al., 2002). Teniendo en cuenta el papel predictivo que toma el contexto y a pesar de que el paradigma no cumple con el requisito de evidenciar una respuesta condicionada ante la mera presentación del estímulo condicionado, utilizaré la terminología del paradigma pavloviano, definiendo al contexto experimental como CS y a la pantalla rectangular como US.

A lo largo de los años se han descrito muchos de los mecanismos bioquímicos y moleculares que subyacen a la formación de la memoria en el cangrejo. Se ha visto que ésta, al igual que lo que ocurre clásicamente con las memorias de largo término, es dependiente de la síntesis de *novο* de proteínas, así como también de la transcripción génica (Pedreira et al., 1995, 1996). Esta memoria es también dependiente de la activación de PKA y ERK, de la activación del factor de transcripción NF-κB, de la actividad del proteasoma y de la activación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA (Feld et al., 2005; Freudenthal et al., 1998; Hepp et al., 2013; Locatelli et al., 2002; Merlo and Romano, 2007). En los últimos años se ha comenzado a analizar mecanismos epigenéticos involucrados en la formación de la memoria, demostrándose que la misma está modulada por un sistema de acetilasas y desacetilasas de histonas. Las acetilasas promueven la transcripción génica, ya que dejan a la hebra de ADN más accesible para el acceso por parte la maquinaria transcripcional, mientras que las desacetilasas tienen un rol opuesto, compactando a la hebra de ADN. Se ha visto que un entrenamiento fuerte promueve la acetilación endógena de histonas y que modificando el equilibrio acetilación/desacetilación se puede modular positiva o negativamente la formación de la memoria (Federman et al., 2009).

También se ha visto que esta memoria puede ser facilitada por la administración de un antagonista de receptores GABA<sub>A</sub> durante la fase de consolidación (Carbó Tano et al., 2009). Asimismo se ha visto que una situación estresante como es la privación de agua resulta en un fortalecimiento de la memoria y que este efecto es mediado por la activación del sistema angiotensinérgico (Delorenzi et al., 1995, 2000).

### 1.D.2 Memoria apetitiva

En el paradigma apetitivo, los animales asocian el mismo contexto explicado anteriormente (CS) con la presencia de comida (US). En el día de entrenamiento los animales reciben una porción de alimento para conejos, la cual pueden ingerir mientras permanecen en el contexto. En este caso, a diferencia del paradigma aversivo, no existe un ensayo discreto, ni una medida de aprendizaje durante la sesión de entrenamiento. En el día de la evaluación los animales son colocados nuevamente en el contexto y se mide su actividad exploratoria. Se demostró que los animales que recibieron comida estando en el contexto tienen una mayor actividad que los animales control que no recibieron comida o que la recibieron en otro contexto. Este cambio en la actividad exploratoria dura por, al menos, 3 días (Kaczer and Maldonado, 2009). Así como se demostró para la memoria

aversiva, se vio que esta memoria también es dependiente de síntesis de proteínas, y que es contexto específica (Kaczer 2009)

### 1.D.3. Reconsolidación

El modelo de *Neohelice* ha sido utilizado extensamente para estudiar el proceso de reconsolidación de la memoria, siendo el Laboratorio de Neurobiología de la FCEyN/UBA uno de los pioneros en este campo. En esta tesis, si bien no tiene como objetivo el estudio de la reconsolidación de la memoria, este tipo de protocolo será una herramienta muy importante en los experimentos comportamentales para poner a prueba las hipótesis que se plantean.

En el primer trabajo que se hizo sobre el tema en este modelo, Pedreira y colaboradores observaron que luego de una re-exposición breve al contexto de entrenamiento, la memoria se vuelve sensible a la inyección de un inhibidor de la síntesis proteica y antagonistas de los receptores de NMDA y definieron la ventana de acción de ambas drogas (Pedreira et al., 2002). En este trabajo, los autores además comprobaron que la vulnerabilidad a los agentes amnésicos ocurre con la sola re-exposición al contexto y sin que medie la respuesta evocada por el estímulo de peligro. Estos resultados no solamente evidencian los procesos de labilización y reconsolidación, sino que además confirman que, por más que la MCS no se exprese al re-exponer a los animales al contexto de entrenamiento, la memoria necesariamente es evocada lo que indica el valor condicionado y predictivo del contexto. Más adelante, también se comprobó que la reconsolidación es dependiente de la activación de NF- $\kappa$ B y de la acetilación de histonas (Federman et al., 2012; Merlo et al., 2005). Por otro lado, también se observó que, durante esta fase, la memoria puede ser fortalecida mediante la inhibición del sistema GABAérgico, o mediante la privación de agua, nuevamente vía la acción de la angiotensina (Carbó Tano et al., 2009; Frenkel et al., 2005).

Es importante destacar alguna de las condiciones paramétricas del recordatorio que inducen el proceso de labilización y reconsolidación de la memoria en el cangrejo. En primer lugar, es importante tener en cuenta la duración del recordatorio. En su trabajo, Pedreira y colaboradores muestran que si la re-exposición al contexto es de 15 minutos se induce el proceso de reconsolidación, pero que si dura 2 horas esto no ocurre, y en cambio se forma una memoria de extinción (Pedreira and Maldonado, 2003). Más adelante se corroboró que a partir de un evento único, es decir, de una sola presentación del CS de duración variable, los procesos de

extinción y de reconsolidación son mutuamente excluyentes (Pérez-Cuesta and Maldonado, 2009). Otro punto muy importante a tener en cuenta es la necesidad de que no se cumpla la expectativa para que la labilización de la memoria ocurra. A este fenómeno se lo conoce como *mismatch*. En pocas palabras, se observó que si luego de 5 minutos de exposición al contexto de entrenamiento los animales reciben la presentación del US, tal como si fuese una sesión de re-entrenamiento, entonces la memoria se vuelve insensible al tratamiento con cicloheximida (Pedreira 2004). Los autores interpretan que los animales, luego del aprendizaje, generan una predicción acerca de las consecuencias de un determinado contexto. Si esta predicción se cumple, entonces la memoria no se labiliza. En cambio, si la predicción no es cumplida la memoria se vuelve lábil, desencadenándose el proceso de reconsolidación de la misma. Es importante entonces tener en cuenta que, solamente si el recordatorio es breve y no se cumple con la predicción generada se gatilla el proceso de labilización y reconsolidación. A través de tratamientos amnésicos o facilitadores podemos poner de manifiesto la ocurrencia de esta fase.

Cuando analizamos la reconsolidación de la memoria apetitiva vemos que se plantea un escenario similar al de la memoria aversiva. El trabajo en el que se analiza este tema también fue realizado por Laura Kaczer (Kaczer et al., 2011). Se ha visto que una breve re-exposición al contexto desencadena el proceso de labilización-reconsolidación de la memoria apetitiva, pero luego de una exposición más prolongada esto no sucede, sino que se forma una memoria de extinción. Se ha comprobado también en este paradigma que la re-exposición tiene que ser en el contexto de entrenamiento y no en otro. Es interesante que aquí también deba darse la condición de *mismatch* para que el proceso de labilización-reconsolidación tenga lugar, ya que si los animales reciben una presentación del US (un *pellet* pequeño de alimento, insuficiente para un entrenamiento) la memoria se vuelve invulnerable al tratamiento con un agente amnésico. Asimismo, al igual que en la memoria aversiva, si luego de un entrenamiento apetitivo débil, que no genera una memoria que se exprese a largo término, ésta se labiliza y durante la reconsolidación se somete a los animales a una situación de estrés hídrico, se produce un fortalecimiento de la memoria de la memoria apetitiva, lo cual hace que esta si se exprese la próxima vez que sea evaluada (Kaczer et al., 2011). Es decir, que los dos paradigmas de memoria en cangrejo nos brindan la oportunidad de estudiar la reconsolidación de la memoria, compartiendo incluso algunas de las características paramétricas del recordatorio.

## 1.E La memoria en la mosca *Drosophila melanogaster*

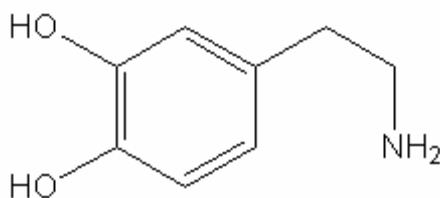
Comentaré aquí acerca del paradigma de aprendizaje olfativo utilizando la mosca *Drosophila melanogaster*, sin pretender hacer un análisis exhaustivo del tema. Básicamente, existe un protocolo de aprendizaje aversivo, en el que el US utilizado es un *shock* eléctrico y un protocolo de aprendizaje apetitivo, en el que el US es azúcar. Si bien se ha demostrado que se puede entrenar a las moscas utilizando distintos olores como estímulos condicionados, en la literatura se observa que los más utilizados son el Meticiclohexanol (MCH) y la Octanona (OCT) y estos fueron los utilizados en este trabajo de tesis (Krashes and Waddell, 2011a, 2011b).

Los estudios sobre aprendizaje y memoria en *Drosophila* comenzaron en la década de 1970, en el laboratorio de Seymour Benzer, con la idea de aprovechar las posibilidades de generar mutantes e identificar genes clave en el aprendizaje y la memoria. El primer trabajo en el que se analiza el aprendizaje apetitivo aparece en 1983 y, si bien el primer trabajo sobre aprendizaje aversivo en moscas data de 1974, es en 1985 cuando se estandariza el protocolo de entrenamiento que sigue utilizándose hoy en día (Quinn et al., 1974; Tempel et al., 1983; Tully and Quinn, 1985). En el mismo, los animales reciben un *shock* eléctrico o solución azucarada en presencia de un determinado olor, mientras que otro olor control no es recompensado ni positiva ni negativamente. Luego se evalúa la retención de la memoria formada, para lo que se coloca a los animales en un laberinto en T, en donde cada brazo contiene un de los dos olores. Las moscas entrenadas de manera aversiva rechazan el olor con que fueron entrenadas, mientras que las entrenadas de manera apetitiva prefieren el olor condicionado. Gracias a estos paradigmas de aprendizaje se identificaron en primera instancia distintos mutantes que tenían impedimentos en los procesos mnésicos, como por ejemplo *Dunce*, *Rutabaga* y *Amnesiac*. Más adelante, se describieron distintas fases de la memoria, con sus respectivos requerimientos moleculares y su localización neuroanatómica. Como el objetivo de este trabajo fue estudiar la interacción entre aprendizajes devalencias opuestas y dado que metodológicamente resulta difícil combinar los US tradicionales en un mismo protocolo, se realizó una modificación experimental del protocolo aversivo por la cual en lugar de *shock* eléctrico se utilizó un compuesto no palatable en el alimento ofrecido como recompensa, por el cual los animales evitan la recompensa. Los detalles de este protocolo serán explicados más adelante.

## 1.F Señalización de estímulos aversivos y apetitivos por parte de las aminas biogénicas

### 1.F.1 La dopamina

Hasta mediados del siglo pasado se pensaba que la dopamina (DA) era una molécula que funcionaba solamente como intermediaria en el proceso de síntesis de adrenalina y noradrenalina. Sin embargo, Arvid Carlsson descubrió que la DA tiene una función *per se*, relacionada al control motor, lo que proporcionó una base para el estudio de la enfermedad de Parkinson (Benes, 2001). Junto con otros estudios este hallazgo lo llevo a recibir el premio nobel en Fisiología y Medicina en el año 2000 “por sus descubrimientos acerca de la transducción de señales en el sistema nervioso”. La fórmula química de la DA es  $C_8H_{11}NO_2$  y pertenece al grupo de las catecolaminas, ya que estructuralmente está compuesta por un grupo catecol (orto-dihidroxibenceno) y una cadena lateral alifática de dos carbonos más un grupo amino.



Estructura de la dopamina

Como mencioné antes, la DA comparte la vía de síntesis con la adrenalina y la noradrenalina. Se sintetizan a partir del aminoácido tirosina, que es hidroxilado por la enzima tirosina-hidroxilasa (TH) formando el compuesto L-DOPA. Luego, éste sufre una decarboxilación (por medio de la DOPA-decarboxilasa), generando DA. Ya que este paso es extremadamente rápido se considera al primero como el paso limitante de la reacción. Luego de sintetizada, la DA es almacenada en vesículas en las terminales sinápticas. La DA es recaptada dentro de las células a través de transportadores DAT, y luego puede ser reciclada, ingresando nuevamente a vesículas o bien degradada por las enzimas COMT y MAO, que degradan monoaminas en general. La DA es también sustrato de la DA  $\beta$ -hidroxilasa, formándose noradrenalina. La existencia de la adrenalina y noradrenalina en invertebrados es discutida. En general, se considera que no están presentes y que sus análogos son la octopamina y la tiramina respectivamente. Hay estudios que indican que la adrenalina y noradrenalina no



existen en crustáceos (Barker et al., 1979; Wood and Derby, 1996) y otros que sí las han hallado aunque en trazas mínimas (Elofsson et al., 1982; Fingerman and Kulkarni, 1993).

Los receptores dopaminérgicos se ubican en la membrana celular, y tienen 7 pasos transmembrana. Han sido clásicamente divididos en receptores de tipo  $d_1$  y receptores tipo  $d_2$ . Luego se descubrieron otros subtipos ( $d_3$ ,  $d_4$ ,  $d_5$ ), pero se los agrupa a estos dentro de las familias  $d_1$ -like y  $d_2$ -like, por actuar de un modo similar a los mismos (Vallone et al., 2000). Esta división se basa en el efecto que tiene la activación de los mismos sobre el nivel de AMPc intracelular. La activación de los  $d_1$  aumenta al mismo, mientras que la de los  $d_2$  los disminuye, ya que están acoplados a proteínas G excitatorias e inhibitorias respectivamente. Sin embargo, el escenario es algo más complejo. En un sistema heterólogo se demostró que receptores  $d_1$ -like activan distintos tipos de proteínas G, lo que modula la presencia de canales de  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{++}$  (Ivanina et al., 2004; Sidhu, 1998). Además, se demostró que la actividad de los receptores  $d_2$ -like disminuye la cantidad de receptores de glutamato tipo AMPA por un mecanismo independiente al AMPc (Zou et al., 2005). En cuanto a los modelos utilizados en este trabajo, en la abeja *Apis mellifera* se han descrito 3 tipos de receptores, la activación del  $AmDop_1$  y el  $AmDop_2$  aumentan el nivel de AMPc, por lo que se los clasifica dentro de la familia  $d_1$ , mientras que la activación del receptor  $AmDop_3$  disminuye el nivel de AMPc, quedando catalogado dentro de la familia  $d_2$  (Beggs et al., 2005; Blenau et al., 1998; Humphries et al., 2003; Mustard et al., 2003a). En *Drosophila* se conocen dos receptores del tipo  $d_1$ , el receptor  $dDA1/DmDOP1$  y el receptor  $DAMB$ . Este último es específico de los *mushroom bodies* (Han et al., 1996; Kim et al., 2003) lo cual es relevante ya que este neuropilo, resulta homólogo al hipocampo de vertebrados y es un área del cerebro clave en el aprendizaje asociativo de insectos (Wolff and Strausfeld, 2015). Por su parte, en crustáceos, en la langosta *Panulirus interruptus* se han clonado 3 receptores de dopamina: los receptores  $D1\alpha_{pan}$  y  $D1\beta_{pan}$  son del tipo  $d_1$ , mientras que los receptores  $D2\alpha_{pan}$  son del tipo clase  $d_2$  (Clark and Baro, 2006, 2007).

### 1.F.2 Distintos roles de la dopamina en invertebrados

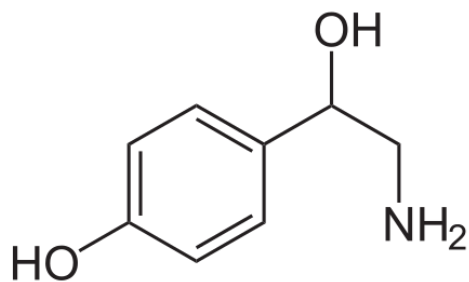
La dopamina, funcionando como neurohormona y como neurotransmisor ha sido ampliamente estudiada y se conocen muchas funciones asociadas a esta molécula. Para mencionar solamente algunas, se ha caracterizado su rol fundamental en el control motor en distintas especies de invertebrados, como moscas, sanguijuelas, abejas y gusanos. Si bien en estos trabajos el estudio se hace desde aproximaciones distintas y

evaluando comportamientos diversos, es interesante su comparación con el rol de la DA en el control motor de los vertebrados, asociado a la enfermedad de Parkinson debido a una deficiencia de la transmisión dopaminérgica desde los ganglios de la base (Marsden, 1992). En particular, se ha visto que moscas deficientes en DA tienen una menor actividad locomotora. Más aun, la activación de neuronas dopaminérgicas por métodos optogenéticos altera el patrón motor de los animales (Lima and Miesenböck, 2005; Pendleton et al., 2002; Riemensperger et al., 2011). Esto mismo ocurre en *C. elegans* (Sawin et al., 2000). En abejas, se ha visto también que la dopamina modula la actividad locomotora, y también comportamientos como el vuelo, el acicalamiento y el aleteo (Mustard et al., 2010). Por su parte, en sanguijuelas se demostró que hay neuronas dopaminérgicas responsables de controlar el patrón de movimiento correspondiente a *crawling* (Puhl and Mesce, 2008).

Otro campo en el que se ha estudiado el rol de la DA, sobre todo utilizando el modelo de *Drosophila*, es el del sueño y *arousal*, procesos que están íntimamente relacionados entre sí. El primer mutante que se describió tenía un fenotipo de dormir menos; estos animales tenían impedida la recaptación de DA, por lo que esta se mantenía durante más tiempo en el espacio sináptico (Kume et al., 2005). Inhibir la producción de DA genera un aumento en el sueño y en el umbral de *arousal* (Riemensperger et al., 2011). Además, se ha visto que drogas que aumentan el nivel de DA incrementan el tiempo dedicado a dormir, mientras que las drogas que disminuyen los niveles de DA tienen el efecto opuesto (Nall and Sehgal, 2014).

### 1.F.3 La octopamina

La octopamina (OA) fue descubierta a mediados del siglo pasado en un trabajo en pulpos, en el que se estudiaban las glándulas salivares posteriores de estos animales (Erspamer, 1948). Su nombre se debe al género de la especie estudiada (Octopoda) sumado a su parecido con la adrenalina y noradrenalina. La fórmula química de la OA es la misma que la de la DA,  $C_8H_{11}NO_2$ . Se considera que la OA es la molécula análoga de la noradrenalina de vertebrados (Roeder, 2005)



Estructura de la octopamina

Al igual que la DA, la OA tiene como precursor a la tirosina, que es convertida por la tirosina decarboxilasa en tiramina, para ser luego convertida en OA por la tiramina  $\beta$ -hidroxilasa (T $\beta$ H). Cabe mencionar que en este trabajo utilicé mutantes para esta enzima con el fin de bloquear la transmisión octopaminérgica. Luego de sintetizada, la OA es almacenada en vesículas en las terminales sinápticas. Nuevamente, al igual que la DA, la OA es recaptada dentro de las células por medio de transportadores OAT (Scavone et al., 1994). La especificidad de estos transportadores suele no ser muy alta en estudios *in vitro*, aunque en el sistema biológico la misma está dada por el tipo neuronal que produce las aminas (Donly et al., 2007). La inactivación de esta amina es llevada a cabo por enzimas N-acetil-transferasas o bien por N-metil-transferasas (Wierenga and Hollingworth, 1990). Aparentemente, la enzima MAO tendría un rol menor en este caso (Roeder, 2005).

La OA se une a receptores específicos, que forman parte de la familia de receptores asociados a proteína G, de 7 pasos transmembrana (Osborne, 1996). Desde hace ya unos años la clasificación de los mismos es en base a las similitudes estructurales que se encontraron con los receptores adrenérgicos de vertebrados, por lo que hoy en día se clasifica a los mismos como Oct $\alpha$ Rs, Oct $\beta$ Rs según su homología con los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente (Evans and Maqueira, 2005). Se ha visto que los OAR $\alpha$  inducen un aumento en los niveles de calcio y de AMPc, a través de la activación de las vías de la fosfolipasa C/inositol trifosfato y de la adenilato ciclasa. Por otro lado, los OAR $\beta$  generan sólo aumento de AMPc, a través de la activación de la adenilato ciclasa (Farooqui, 2007).

#### 1.F.4 Distintos roles de la octopamina en invertebrados

La OA tiene una multiplicidad de roles, cumpliendo funciones como neurohormona, neuromodulador y neurotransmisor (Orchard et al., 1982). Tiene una gran cantidad de tejidos blanco que incluyen músculos

esqueléticos y viscerales, tejidos de reserva energética, órganos sensoriales y células del sistema inmune (Roeder, 2005). Probablemente, su rol más importante sea el de coordinar procesos asociados a la respuesta de lucha o huida. Coordina y regula el metabolismo de los músculos de vuelo en insectos (Candy et al., 1997). Además, permite la aceleración de la actividad cardíaca (Prier et al., 1994) y el aumento de la tasa ventilatoria (Sombati and Hoyle, 1984), lo que hace que los músculos tengan una mayor oxigenación. Además, la OA posibilita la obtención extra de energía a partir de su acción sobre el cuerpo graso de insectos, ya que produce la liberación de ácidos grasos a la hemolinfa (Zhiwei Wang et al., 1990).

Otro campo en el que se ha estudiado mucho el rol de la OA es el de la agresión. Se han hecho estudios en grillos (Stevenson et al., 2000), *Drosophila* (Hoyer et al., 2008) y diversos crustáceos, entre los que se encuentra el cangrejo *Neohelice* (Pedetta et al., 2010). En el cangrejo *Carcinus maeans* se asocia la OA con los animales subordinados, ya que los animales perdedores en las contiendas tienen un nivel elevado de esta amina (Sneddon et al., 2000), sumado a que su inyección induce posturas relacionadas con la sumisión (Antonsen and Paul, 1997).

Por otra parte, se ha estudiado cómo la OA influye en la división de tareas de las abejas dentro de la colmena. Se sabe que las abejas más viejas (recolectoras) tienen niveles de OA más altos que las más jóvenes (cuidadoras de cría) (Wagener-Hulme et al., 1999). Incluso se ha visto que esta diferenciación puede ser inducida mediante la administración de OA (Schulz and Robinson, 2001).

### 1.F.5 Las aminas en la memoria de los invertebrados

En la bibliografía de insectos, se ha vinculado clásicamente a la neurotransmisión octopaminérgica con la señalización de los estímulos apetitivos y a la dopaminérgica como señalizadora de los estímulos aversivos. Esto se basa en trabajos realizados mayoritariamente en abejas, grillos y moscas. Revisaré a continuación la bibliografía al respecto.

En abejas se ha identificado una neurona denominada VUMx1 como la neurona responsable de señalar internamente la estimulación con solución azucarada (Hammer, 1993). Ésta es una neurona octopaminérgica que arboriza en distintas partes del cerebro incluidos los *mushroom bodie* y el lóbulo antenal, sitio en el ocurren fenómenos de plasticidad relacionados con aprendizaje y memoria olfativa (Fernandez et al., 2009; Locatelli et al., 2013). Se observó que ante la estimulación con solución azucarada esta neurona presenta

una actividad conspicua y a su vez que su activación puede reemplazar al estímulo incondicionado en el aprendizaje apetitivo (Hammer, 1997). Además, se comprobó que la administración de antagonistas de receptores octopaminérgicos durante el entrenamiento impide la formación de la memoria apetitiva, y que la inyección de RNAi contra el mensajero que codifica para el receptor de OA también tiene efecto detrimental sobre la memoria apetitiva (Farooqui et al., 2003; Hammer and Menzel, 1998).

Utilizando un paradigma de aprendizaje aversivo denominado SER (Sting Extension Reflex) en el que se asocia un olor con un *shock* eléctrico que provoca la extensión del aguijón, se observó que la memoria generada es dependiente de DA, ya que la administración de antagonistas de sus receptores impide la formación de la misma (Vergoz et al., 2007). En otro estudio en abejas, también se utilizó un *shock* eléctrico asociado a un paradigma de *place preference* en el que los animales aprenden a evitar el lugar particular asociado con el castigo. En este caso se observó que la administración de antagonistas de receptores de DA interfiere con la formación de esta memoria, mientras que la administración de DA produce la facilitación de misma (Agarwal et al., 2011).

En resumen, en abejas se comprobó en términos generales, que más allá de las modalidades sensoriales involucradas y de la tarea aprendida, la activación de vías dopaminérgica instruye la formación de memorias aversivas y la de vías octopaminérgicas instruye para memorias apetitivas.

En cuanto al modelo de aprendizaje y memoria en grillos, existen dos paradigmas de aprendizaje, uno olfatorio y otro visual. Ambos son utilizados para condicionamientos de tipo apetitivo o aversivo. Se observó que la inyección de antagonistas de receptores de DA interfieren con la memoria aversiva y la inyección de antagonistas de receptores de OA interfiere con la memoria apetitiva, por lo que al igual que en abejas se estableció que cada una de las memorias depende de una amina distinta. Nuevamente, se observó que los antagonistas de receptores de DA no impiden el aprendizaje apetitivo y que los antagonistas de receptores de OA no impiden el aprendizaje aversivo, por lo que se concluyó que las vías aminérgicas de señalización actuarían de manera separada (Unoki et al., 2005, 2006).

Por otra parte, en un experimento pionero en el tema, utilizando el modelo de *Drosophila* y aprovechando la posibilidad de manipulación genética, se vio que las moscas deficientes en la síntesis de OA no muestran retención de una memoria apetitiva mientras que las deficientes en DA no muestran retención de una memoria aversiva (Schwaerzel et al., 2003). Cabe destacar que, al igual que en los otros modelos, los

animales deficientes en una amina no muestran impedimento alguno con la memoria de signo opuesto. Unos años después, utilizando técnicas de optogenética se demostró incluso que la activación de un subgrupo de neuronas dopaminérgicas no solamente es necesaria, sino que es suficiente para la formación de la memoria aversiva (Claridge-Chang et al., 2009). Parte de este circuito es compartido por otros dos tipos de memoria aversiva en moscas, que utilizan una sustancia amarga o una temperatura alta como US, por lo que se considera que las neuronas dopaminérgicas de este subgrupo señalizan a los estímulos aversivos por su valencia más allá de su modalidad sensorial (Das et al., 2014; Galili et al., 2014)

Hasta aquí existió un acuerdo de los tres modelos en que la vía de OA es la responsable de codificar el refuerzo apetitivo y la de DA el refuerzo negativo, por lo que se postulaba una “función instructiva” de cada amina, señalizando a cada uno de los tipos de estímulos según su valencia (Giurfa, 2006). En este sentido, los insectos parecían ser una excepción entre el resto de los animales en donde la DA tiene un valor positivo en diversas especies evolutivamente lejanas (Barron et al., 2010). Por ejemplo, esto se ha estudiado con gran detalle en distintos modelos mamíferos. La literatura sobre el tema es extensa y no corresponde entrar en detalle aquí, pero el consenso indica que las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA) que proyectan hacia el *nucleus accumbens* actúan codificando al US positivo. Más aún, una vez que se realiza la asociación entre el US y el CS, estas neuronas disparan ante la sola presentación del CS (Schultz, 2010).

Dentro de los invertebrados, se comprobó algo similar en nematodos y moluscos. Por ejemplo, en el modelo de *Lymnea* extensamente estudiado, se vio la señalización opuesta a la observada en insectos y coincidente con la de vertebrados: la memoria aversiva depende de OA, mientras que la memoria apetitiva depende de DA (Kemenes et al., 2011). En *Aplysia* también se ha demostrado que el aprendizaje apetitivo depende de DA (Baxter and Byrne, 2006).

A pesar del establecimiento de este “dogma” en insectos, años más tarde, y utilizando técnicas de manipulación genética que permiten modular la actividad de grupos de neuronas más pequeños y con mayor precisión, se demostró en *Drosophila* que la señalización del refuerzo positivo es más compleja de lo que se pensaba: la señalización de los estímulos dulces, como azúcares sin valor nutritivo depende de neuronas OA que se sitúan río arriba de un grupo de neuronas DA (pertenecientes al clúster PAM y distintas a las neuronas que señalizan el estímulo aversivo). En cambio, otros estímulos apetitivos, como el agua para moscas sedientas, la cópula y los azúcares con valor nutritivo son independientes de OA, y dependen de DA (Burke et

al., 2012; Huetteroth et al., 2015; Lin et al., 2014; Liu et al., 2012; Montague and Baker, 2016). Cabe destacar que no todos los estímulos activan exactamente las mismas neuronas, aunque todas ellas están en el clúster denominado PAM. Los autores de estos trabajos plantean entonces que los insectos no serían una excepción en cuanto al valor hedónico de la dopamina (Waddell, 2013). Una posible explicación para comprender las diferencias con los resultados obtenidos en abejas y grillos, podría ser que las intervenciones utilizadas en éstos últimos no tienen la precisión suficiente para demostrar el rol de la DA en el aprendizaje apetitivo. No obstante, el grupo de M. Mizunami, referente en el trabajo con grillos, ha demostrado recientemente utilizando animales *knockout* para receptores de DA que esta amina no está involucrada en el aprendizaje apetitivo, y plantean que distintos insectos podrían tener mecanismos de señalización diferentes (Awata et al., 2016).

#### 1.F.6 Aminas biogénicas y aprendizaje en cangrejos

En el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria se abordó hace años el estudio de las aminas involucradas en el aprendizaje y memoria en cangrejo. Se observó, que, al igual que en grillos y abejas, la DA es necesaria para la formación de la memoria aversiva, ya que la inyección de antagonistas de receptores dopaminérgicos interfiere con la formación de la memoria aversiva de largo término, e incluso la administración de DA facilita la formación de la memoria aversiva tras un entrenamiento aversivo débil (Klappenbach et al., 2012). A su vez se comprobó que antagonistas de receptores de OA no impiden la formación de la memoria aversiva.

Por otra parte, trabajando con el paradigma de memoria apetitiva se comprobó que la OA si es necesaria para la formación de esta memoria, ya que la administración durante el entrenamiento de los antagonistas de receptores de octopamina, mianserina y epinestina, bloquean la memoria apetitiva y la inyección de OA facilita la memoria de largo término luego de un entrenamiento apetitivo débil (Kaczer and Maldonado, 2009).

#### 1.F.7 Interacción entre los sistemas de señalización

Los trabajos antes mencionados realizados en cangrejos ofrecieron en parte resultados similares a los obtenidos en insectos, sin embargo dichos experimentos fueron concebidos a partir de un enfoque diferente

al utilizado en insectos. Más allá de estudiar el rol de la OA en el aprendizaje apetitivo y el de la DA en el aprendizaje aversivo, se consideró que si un tipo de amina señala a un determinado tipo de US, entonces era posible que cada una de estas aminas modulara negativamente la formación de la memoria de signo opuesto. Esto podría resultar adaptativo, ya que ante una situación en la cual existen componentes positivos y negativos asociados al mismo estímulo condicionado, la categorización final de este último podría surgir del balance entre las señales en conflicto. Bajo esta mirada, se comprobó en cangrejos que las inyecciones de OA interferían con la memoria de largo término aversiva, y que este efecto era contrarrestado con la administración de un antagonista de receptores de OA (Kaczer and Maldonado, 2009).

Un tiempo después este mismo efecto se comprobó en abejas: la OA tiene un efecto detrimental en el paradigma aversivo de *place preference* (Agarwal et al., 2011). Los resultados referidos al rol de la DA en el aprendizaje apetitivo de cangrejo son parte de esta tesis, por lo que serán explicados con mejor detalle más adelante.

En otro estudio llevado a cabo en abejas se estudió el rol de la DA y de la serotonina (5HT) en un paradigma en el que los animales asocian un olor con una solución azucarada que además contiene una sustancia desagradable para las abejas. De este modo la recompensa combina consecuencias apetitivas y aversivas. Se utilizaron dos sustancias aversivas; quinina que resulta aversiva por su sabor amargo, y amigdalina que no tiene sabor pero resulta aversiva por provocar cierto grado de malestar en las abejas. Se observó que existe una vía mediada por DA, que es responsable del valor negativo inmediato de la quinina y otra vía, mediada por 5HT, que señala la información aversiva generada por el efecto post-ingestivo de la amigdalina (Wright et al., 2010). En ambos casos, los autores toman como evidencia de un aprendizaje aversivo al hecho de que los animales no extienden la probóscide ante la estimulación con el olor condicionado a pesar de que este predice también azúcar. Sin embargo, de estos experimentos no quedó resuelto si es que los animales no han aprendido nada, por efecto de una interacción supresiva entre estímulos opuestos durante el entrenamiento, o si han aprendido ambas cosas y estas compiten en el momento de la evocación.

Al comenzar esta tesis existían dos buenos ejemplos en invertebrados sobre circuitos de OA y DA que actuasen de manera coordinada y relacionados con el comportamiento de alimentación. Uno de ellos es *C. elegans*. Ante la presencia de comida se activan neuronas dopaminérgicas y ante la ausencia de la misma se activan neuronas octopaminérgicas. Se observó que la administración de DA, o la activación de las neuronas



dopaminérgicos, inhibe la actividad de las neuronas de OA permitiendo así una acción coordinada de ambas vías y comportamientos bien definidos (Suo et al., 2009).

En *Drosophila*, se observó que para la evocación de la memoria apetitiva es necesario que los animales tengan hambre. Esto es señalizado internamente mediante el péptido dNPF, un ortólogo del NPY de mamíferos. Resulta interesante que río debajo de estas neuronas se encuentre un grupo de neuronas dopaminérgicas, que inervan los *mushroom bodies* y cuando están activas impiden la evocación de la memoria apetitiva. Cuando el animal tiene hambre, las neuronas dNPF silencian a las neuronas dopaminérgicas, removiendo su inhibición de los MB y permitiendo así que la memoria apetitiva sea evocada. Incluso se comprobó que cuando las moscas se encuentran saciadas la activación artificial de las neuronas dNPF es suficiente para generar la expresión de la memoria apetitiva (Krashes et al., 2009). Un tiempo después se demostró también en *Drosophila* que la activación de un grupo de neuronas de DA interfiere con la memoria apetitiva. Los autores del trabajo concluyen que la actividad de estas neuronas dopaminérgicas induce el olvido de la memoria apetitiva (Berry et al., 2012).

En resumen, existen evidencias basadas en la posible interacción entre las distintas vías de señalización que sugieren estudiar a las memorias apetitivas y aversivas, no como elementos independientes, sino como procesos con cierto grado de interacción entre sí. Este enfoque resulta muy relevante cuando se piensa en eventos de aprendizaje y memoria en contextos de la vida real de un animal, en los cuales un mismo estímulo condicionado suele predecir tanto consecuencias apetitivas como aversivas.

Por lo tanto, la existencia de una instancia de interacción entre la información contradictoria contenida en una experiencia, y su influencia sobre el aprendizaje y sobre la persistencia y contenido de la memoria en distintos animales, han sido el objeto de estudio de esta tesis, tratando de aprovechar las ventajas experimentales de cada modelo y paradigma, y poniendo a prueba el grado de universalidad de dichos conceptos.

## Hipótesis general de trabajo

En episodios de aprendizaje de la vida real, los animales están expuestos a situaciones contradictorias en las que determinados estímulos condicionados predicen la ocurrencia de consecuencias apetitivas y aversivas. En este contexto postulamos que los mecanismos involucrados en aprendizaje y memorias apetitivas y aversivas, deben interactuar de manera coordinada para asegurar decisiones comportamentales coherentes y adaptativas.

Para cada uno de los objetivos que planteo existen hipótesis de trabajo concretas, con predicciones específicas que serán expuestas en cada capítulo.

### Objetivos particulares

1. Como fue explicado anteriormente, se ha comprobado en abejas y en cangrejos que antagonistas de receptores dopaminérgicos no bloquean la formación de memorias apetitivas. Sin embargo, no se ha estudiado hasta ahora si la DA tiene un efecto negativo sobre la memoria apetitiva. Por ello nos propusimos:
  - Analizar el efecto de la dopamina sobre la memoria apetitiva en el cangrejo *Neohelice* y la abeja *Apis mellifera*.
  - Analizar el efecto de antagonistas de receptores dopaminérgicos sobre la memoria apetitiva del cangrejo *Neohelice* y la abeja *Apis mellifera*.
2. Hipotetizamos que el efecto de la dopamina sobre la memoria apetitiva, representa la situación en la cual un aprendizaje aversivo compite con un aprendizaje apetitivo. Por ello me propuse:
  - Estudiar la persistencia y contenido de la memoria luego de entrenamientos mixtos que incluyen refuerzos apetitivos y aversivos asociados al mismo estímulo condicionado; el contexto en cangrejos y un olor en moscas.
3. No existe aún una descripción neuroanatómica de neuronas y tractos dopaminérgicos en cerebro central de abejas y cangrejos. Por ello nos propusimos:
  - Realizar una descripción neuroanatómica del sistema dopaminérgico en el cangrejo y la abeja mediante ensayos inmunohistoquímicas contra tirosina-hidroxilasa.

Cada uno de estos objetivos corresponde con una sección, dentro del capítulo de resultados.

## 2. Materiales y Métodos

A lo largo de esta tesis se utilizaron 3 modelos animales distintos. Describiré la metodología asociada a cada uno de ellos en secciones diferentes.

### 2.A Cangrejo *Neohelice granulata*

#### 2.A.1 Animales

Los animales utilizados son cangrejos machos de la especie *Neohelice granulata* (Dana, 1852) (anteriormente denominada *Chasmagnathus granulatus*) de tamaño entre 2.7-3.0 cm de ancho de caparazón, que son capturados en las rías de agua salobre de San Clemente del Tuyú, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Durante la permanencia en el laboratorio, los animales son mantenidos en tanques plásticos (35 cm x 48 cm x 27 cm), en una densidad de 20 animales por recipiente, con agua de salinidad 12‰ preparada con sal marina para acuarios (Winex); pH 7,4-7,6. El cuarto donde permanecen los cangrejos tiene una temperatura de 19 a 22 °C, y un ciclo luz-oscuridad de 12L: 12O (08:00-20:00 horas). Los experimentos se realizaron durante todo el año, exceptuando los meses de septiembre y octubre, que coinciden con la temporada reproductiva de los animales. Cada animal es utilizado en un único experimento y estos se llevan a cabo entre las 9 hs y las 20 hs. Se utilizaron entre 30 y 40 animales por grupo. Antes de incluir a un animal en un grupo experimental se realiza una *prueba de selección*, en la cual se da vuelta a cada animal apoyándolo sobre su zona dorsal: si el cangrejo no re-establece inmediatamente la posición original entonces no es utilizado ya que este letargo está correlacionado con un deterioro en el estado general del animal. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para disminuir el número de animales utilizado y para minimizar el sufrimiento que se pueda causar a los mismos.

#### 2.A.2 Metodología general

Cada experimento incluye al menos dos fases: la sesión de entrenamiento y la de evaluación, que se llevan a cabo con un intervalo de al menos 24 h. En algunos experimentos se agregó también una sesión de reexposición entre las otras dos. En estos casos la reexposición se realizó 24 hs después del entrenamiento y la evaluación 48 hs luego del primero. Siempre se utilizó al menos un par de grupos, y cada par incluye un grupo entrenado, que recibe el estímulo incondicionado durante la sesión de entrenamiento, y un grupo no

entrenado que permanece en el contexto durante la sesión sin recibir estímulo alguno. Es decir, se compara el comportamiento de un animal que ha estado expuesto a una experiencia determinada (el grupo entrenado) con otro que no (no entrenado).

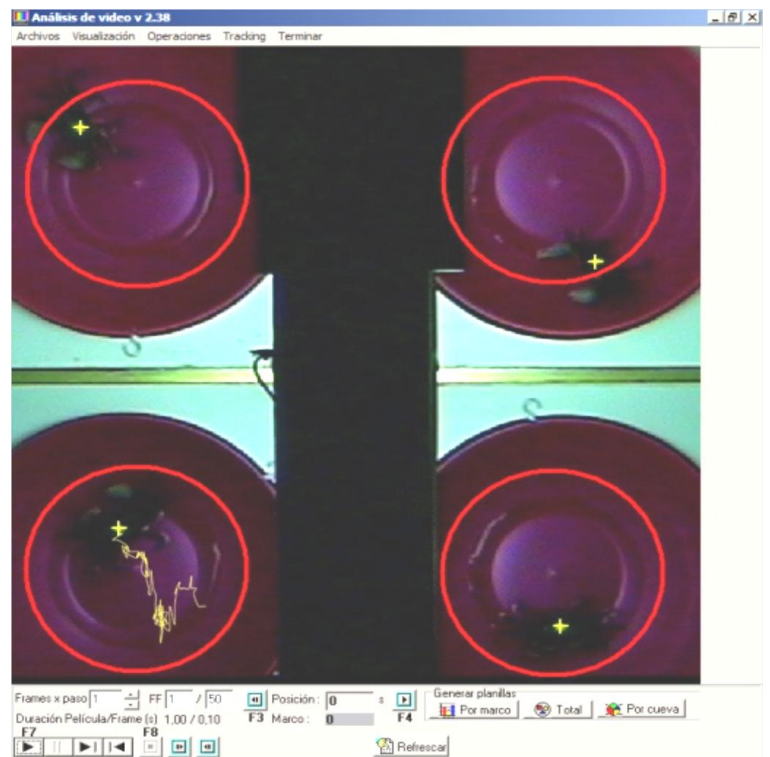
### 2.A.3 Dispositivo experimental

Tanto para el protocolo de entrenamiento aversivo como para el de entrenamiento apetitivo se dispone de un dispositivo que permite evaluar el comportamiento de los cangrejos, al que denominamos actómetro. Éste es un recipiente tipo *bowl* con una pared cóncava de 12 cm de altura, con un diámetro de 9 cm en la parte inferior y 23 cm en la superior, de color rojo, en el que se coloca a los animales individualmente para realizar los experimentos. A lo largo del trabajo, me referiré al actómetro como el contexto experimental, o bien como el estímulo condicionado (EC). En el cuarto experimental hay 20 actómetros, agrupados en 5 módulos de 4 dispositivos cada uno, todos aislados entre sí. Cada uno de estos módulos es iluminado por tres lámparas de led de 10W y filmado mediante una cámara de video, situada a 2 metros sobre los mismos. La señal de las 5 cámaras que registran los 20 actómetros es capturada por una interfaz donde es digitalizada y recortada (480x480 píxeles, 24 bits). Al finalizar cada registro se genera un archivo digital (formato AVI) correspondiente a cada cámara. El software desarrollado permite, en cada experimento, estipular independientemente para cada cámara el momento de inicio de cada registro y la tasa de captura en cada registro (hasta un máximo de 10 cuadros/seg). El comportamiento de cada cangrejo es analizado en soporte digital utilizando otro software desarrollado a tal fin, basado en el rastreo de cada animal en el actómetro espacio, a lo largo del tiempo. Para la optimización de este método, se pega sobre el caparazón de cada cangrejo una pequeña etiqueta que contrasta sobre el caparazón oscuro (goma E.V.A amarilla, 4x4 mm), que es el objeto a rastrear. El software de rastreo permite individualizar múltiples arenas experimentales, localizando en cada cuadro del video la posición de cada animal (en los ejes x,y, en píxeles). Los datos son procesados en una planilla de cálculo, que permite analizar distintas variables dependientes de la posición y del tiempo, como la distancia total recorrida, velocidad promedio, patrones de velocidad instantánea, patrones de distribución espacial del recorrido, etc.



Dispositivo experimental. Se observa el recipiente tipo *bowl*, y la pantalla horizontal en la posición inicial, desde la cual se mueve describiendo un ángulo de 90°, en un plano paralelo al piso del recipiente.

Metodología utilizada para medir la distancia recorrida por cada animal. Imagen del programa de rastreo donde se muestran las cuatro arenas experimentales registradas por una cámara de video, la delimitación del área donde se rastrea al animal (marcada por un círculo), y la posición del animal (marcada con una cruz).



## 2.A.4 Paradigma apetitivo

### 2.A.4.i Entrenamiento

El protocolo de entrenamiento es, salvo pequeñas modificaciones relacionadas con la cantidad de comida y con la duración de la sesión de entrenamiento, el mismo que se ha puesto a punto en el laboratorio y se viene utilizando desde la tesis doctoral de Laura Kaczer (Kaczer and Maldonado, 2009). El primer día los animales se colocan individualmente en la arena experimental y después de 5 minutos, el grupo entrenado recibe una cantidad fija de alimento (comida para conejos, Nutrientes Argentina SA). Inicialmente, los animales exploran el contexto, y cuando encuentran la porción de alimento comienzan a comerla inmediatamente. Después de 45 minutos los animales son removidos del actómetro y colocados individualmente en recipientes individuales hasta la siguiente sesión. El grupo no entrenado permanece en el contexto durante los cincuenta minutos que dura el entrenamiento sin recibir ningún tipo de estimulación. La cantidad de alimento fue de 80mg en el protocolo intermedio, 40mg en el bajo y 160mg en el protocolo de entrenamiento alto. Se ha comprobado anteriormente que el protocolo intermedio permite la formación de una memoria que se expresa, hasta al menos, 72 hs después de la sesión de entrenamiento (Kaczer and Maldonado, 2009).

### 2.A.4.ii Recordatorio

Los animales son colocados en el contexto de entrenamiento durante 10 minutos y luego son sacados para ser colocados nuevamente en sus cajas individuales. Se demostró que este protocolo desencadena el proceso de labilización-reconsolidación. Si después de 5 minutos de estar en el contexto los cangrejos reciben una porción de comida, de manera tal que no existe un *mismatch* entre lo que los animales esperan y lo que realmente ocurre, por lo tanto, el proceso de labilización-reconsolidación no se desencadena (Kaczer et al., 2011).

### 2.A.4.iii Evaluación

Los animales son colocados en el contexto de entrenamiento, en donde permanecen durante 5 minutos. En ese tiempo se mide la actividad exploratoria mediante filmaciones como fue explicado en párrafos anteriores.

## 2.A.5 Paradigma aversivo

### 2.A.5.i Entrenamiento

Este protocolo se viene usando, con pequeñas modificaciones, desde hace más de 25 años en el laboratorio (Lozada et al., 1990). Denominamos ensayo de entrenamiento a la presentación de un estímulo visual de peligro (EVP) que se mueve horizontalmente por encima del animal (dos ciclos de 2,2 segundos cada uno, con 2,3 segundos en el medio). Este estímulo evoca inicialmente una respuesta de escape, que tras la presentación reiterada del estímulo cambia por una respuesta de congelamiento o *freezing* (Pereyra et al., 2000). El EVP es una figura rectangular de color negro, de 25 cm X 7,5 cm que se mueve a 12,5 cm del animal. Se utilizaron 3 tipos de entrenamiento que difieren entre ellos en la cantidad de ensayos. El entrenamiento alto consistió en la presentación de 30 ensayos, el intermedio de 15 y el bajo de 10. El intervalo entre estímulos se modificó teniendo en cuenta mantener fijo el tiempo total de la sesión de entrenamiento el cual es 5 minutos de adaptación al contexto más 45 minutos desde que pasa el primer EVP.

### 2.A.5ii Recordatorio

Los animales son colocados en el contexto de entrenamiento durante 5 minutos y luego son retirados y colocados nuevamente en sus recipientes. Se demostró que este protocolo de re-exposición desencadena el proceso labilización-reconsolidación. Si después de 5 minutos de estar en el contexto, los cangrejos reciben un ensayo del EVP de manera tal que no hay un *mismatch* entre lo que los animales esperaban y lo que realmente ocurre, el proceso de labilización-reconsolidación no se desencadena (Pedreira et al., 2004).

### 2.A.5iii Evaluación

Los animales son colocados en el contexto, y luego de 5 minutos reciben un ensayo del EVP. La respuesta de escape desencadenada por el mismo es evaluada mediante filmaciones como fue explicado anteriormente.

## 2.A.6 Entrenamiento mixto

Con el fin de analizar la interacción entre dos entrenamientos simultáneos y de signo opuesto, se utilizó un grupo entrenado de forma mixta. Los animales de este grupo son colocados en el contexto de

entrenamiento, y luego de 5 minutos reciben el primer ensayo con EVP. Inmediatamente después los animales reciben una determinada cantidad de alimento, que puede ser ingerida durante los 45 minutos restantes, durante los cuales reciben sucesivos ensayos con el EVP. Tanto la cantidad de comida como la de ensayos aversivos varían, en función de la fuerza de entrenamiento deseada. Luego de los 50 minutos de entrenamiento los animales son retirados del actómetro y colocados en el recipiente en donde permanecerán hasta la sesión de evaluación. La sesión de re-exposición y la de evaluación son exactamente iguales a la de los grupos con entrenamiento solo apetitivo o solo aversivo.

### 2.A.7 Análisis estadístico

Se evaluó la retención de la memoria centrando el análisis de datos en los resultados de los ensayos de evaluación. Para ello se contrasta la respuesta del grupo entrenado con la de su respectivo grupo control. Preferimos hacer esta comparación en lugar de comparar el desempeño de un mismo grupo antes y después del entrenamiento porque permite separar el momento de la adquisición con el de la evaluación, teniendo en cuenta que el comportamiento de los animales puede diferir con el paso del tiempo, por motivos ajenos a los que se quieren evaluar con el experimento (Rescorla, 1988). La respuesta de los grupos apetitivo y aversivo se compara con la del grupo sin entrenamiento a fin de revelar la memoria apetitiva y la memoria aversiva respectivamente. El grupo entrenado aversivo es el grupo control para el grupo entrenado mixto cuando se analiza la memoria apetitiva. En el mismo sentido, el grupo entrenado apetitivo es el grupo control contra el cual se compara el grupo entrenado mixto cuando se analiza la memoria aversiva.

Nuestra definición operativa de memoria se basa en hallar diferencias significativas entre el grupo entrenado y su respectivo control, mientras que la falta de esta diferencia es una definición operativa de la falta o la no expresión de la memoria como resultado de un tratamiento o factor experimental. Nuestra predicción es que hay una diferencia entre cada par entrenado-no entrenado, por lo tanto, se analizaron con comparaciones planeadas utilizando un ANOVA ponderado de significancia  $\alpha = 0,05$  (tasa de error por comparación), de acuerdo con el método estándar (Howell, 2012; Rosenthal and Rosnow, 1985). Una correlación de Pearson se llevó a cabo con el fin de evaluar si las dos memorias se adquieren de forma independiente.



### 2.A.8 Farmacología

Se utilizó solución salina de crustáceo como vehículo (en concentraciones molares: NaCl: 0,45; CaCl<sub>2</sub>: 0,015; MgCl<sub>2</sub>: 0,021; KCl: 0,01; (Hoeger and Florey, 1989)). Se inyectaron 50 microlitros de solución salina o droga a través del lado derecho de la membrana cefalotorácica-abdominal dorsal por medio de una jeringa provista de un “tope” para controlar la profundidad de penetración de 4 mm, asegurando así que la solución inyectada fuese descargada en el saco pericárdico. Ya que los cangrejos carecen de barrera hematoencefálica (Abbott, 1970) y que la hemolinfa se distribuye mediante sistemas capilares del seno pericárdico a los ganglios nerviosos (Sandeman, 1967) es posible realizar inyecciones sistémicas que llegan a las áreas de neuropilos del cerebro. Las drogas utilizadas fueron Cicloheximida (C7698) en una dosis de 45 µg por animal, Dopamina (H8502), Flufenazina (F0280000) y Clorpromazina (C1900000) en las dosis indicadas en cada experimento. Todas las drogas fueron adquiridas de Sigma-Aldrich Argentina.

### 2.A.9 Inmunohistoquímica

El protocolo de fijación y tinción realizado fue el mismo para cangrejos y para abejas, con la salvedad de que en el caso del cangrejo se realizó la disección del ganglio supraesofágico y de los lóbulos ópticos por separado, mientras que en la abeja se trabajó con el cerebro entero. Para la realización de los experimentos se sacrificó a los animales colocándolos en hielo por 10 minutos antes de la disección. Se realizó la disección en paraformaldehído 4% y, posteriormente, se fijaron los tejidos durante 2 horas. Seguido a esto, y siempre bajo agitación a 4°C, se realizaron dos lavados en PBS, de 30 minutos cada uno. Luego se deshidrataron los mismos en una secuencia de pasos de 10 minutos cada uno en etanol 50%, 70%, 90%, 96%, 100%. Luego se siguió el camino inverso para rehidratar las muestras, sumándole un último paso de agua destilada. El pasaje por alcohol aumenta la permeabilidad del tejido a la tinción. Posteriormente, los ganglios se enjuagaron 2 veces en PBS (30 minutos cada enjuague) y se bloquearon toda la noche en PBS 0,01M, BSA 2%, tritonX100 0,1% y NGS 5%. Al día siguiente, los ganglios fueron lavados en PBS (2 x 30 minutos) e incubados por 72 horas con un anticuerpo anti tirosina-hidroxilasa (ab152 Chemicon) diluido 1/50 en PBS 0,01M, Tween 0,3% y NGS 1%, preservado con acida sódica. Este anticuerpo ha sido utilizado con éxito en otras especies para marcar neuronas dopaminérgicas. El anticuerpo primario fue removido con tres lavados de dos horas cada uno de PBS 0,01M. Luego, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra Alexa Fluor 488 anti conejo

(Invitrogen A11008) diluido 1/500 en PBS 0,01M por 48 horas. Para remover el anticuerpo secundario se lavaron los ganglios tres veces durante 30 minutos cada una con PBS + Tween 0,03%. Luego se realizó un lavado más toda una noche. Para terminar, las muestras fueron deshidratadas utilizando la siguiente serie de pasos de 10 minutos cada uno, con etanol 50%, 70%, 90%, 96%, 100%, y fueron montadas en metilsalicilato. Para visualizar las muestras se utilizó un microscopio confocal Olympus FV300 utilizando un láser de Argón de longitud de onda 488nm.

## 2.B Abeja *Apis mellifera*

### 2.B.1 Animales

Se utilizaron abejas *Apis mellifera* recolectoras de polen, que fueron capturadas en la entrada de colmenas situadas en el predio de Ciudad Universitaria de Buenos Aires. Inmediatamente luego de ser llevadas al laboratorio, las abejas son anestesiadas mediante un breve enfriamiento en hielo e inmovilizadas en cepos individuales, que les permiten mover solamente las antenas y la probóscide. Después de la recuperación de la anestesia, las abejas fueron alimentadas *ad libitum* con una solución 1M de sacarosa y se mantuvieron hasta la noche, cuando fueron alimentados nuevamente *ad libitum*.

En el laboratorio, las abejas se guardan en una caja húmeda a temperatura ambiente. Todos los experimentos duraron 5 días, incluyendo desde el día de la captura hasta la sesión de evaluación de la memoria, realizada 72 hs después del entrenamiento. Todas las noches, las abejas fueron alimentadas *ad libitum* con solución de sacarosa 1 M. Todas las sesiones de entrenamiento y evaluación fueron llevadas a cabo entre las 10 hs y las 14 hs. Treinta minutos antes del entrenamiento todos los animales pasaron por una prueba de selección que consiste en tocar las antenas con una solución de sacarosa 2M. Sólo los animales que mostraron una extensión rápida de la probóscide fueron utilizados en los experimentos.

En el experimento realizado para medir la ingesta total, la alimentación se realizó utilizando una jeringa micrométrica (Gilmont GS-1200) que suministra pequeñas gotas de volumen cuantificable de solución 2 M de sacarosa en la punta de la extendida probóscide. Los animales recibieron gotas de la solución hasta que no extendieran más la probóscide.

Nuevamente, se realizaron todos los esfuerzos posibles para disminuir el número de animales utilizado y para minimizar el sufrimiento que se le pueda causar a los mismos.

## 2.B.2 Protocolo experimental

El olor utilizado para el entrenamiento fue 2-octanona diluido 1/100 en aceite mineral (ambos de Sigma-Aldrich). Se insertó una pequeña tira de papel de filtro embebido con 10  $\mu$ l de la dilución del olor en una jeringa de 10 ml. Un extremo de la jeringa se conecta a una válvula que controla el flujo de aire dentro de la misma. La salida de la jeringa se coloca 3 cm por delante de la cabeza de la abeja llegando la corriente de aire cargada de olor directamente al animal. 10 cm por detrás de la abeja se colocó un extractor de aire, que permite eliminar de forma continua los olores de la arena experimental.



Vista lateral del dispositivo experimental para entrenar abejas. Se puede observar la jeringa, apuntando hacia la posición de entrenamiento, conectada a una manguera por donde ingresa aire. Detrás, se ve el extractor de aire que remueve los olores.

El paradigma de aprendizaje utilizado en este trabajo ha sido descrito hace más de treinta años, y se viene utilizando desde ese momento. El mismo es el condicionamiento olfativo del reflejo de extensión de la probóscide (Bitterman et al., 1983). Durante cada ensayo se coloca al animal en el dispositivo experimental. Veinte segundos después, se administra el olor, que se mantiene durante 4 segundos. Tres segundos después de iniciado el olor se tocan las antenas con una solución de sacarosa 2M, lo que provoca la extensión de la probóscide. En ese momento se le suministra a la abeja una gota de 0.2  $\mu$ l de la solución. Veinte segundos después del final del ensayo se devolvió la abeja a la posición de reposo hasta el siguiente ensayo. Se utilizaron dos protocolos de entrenamiento: el entrenamiento fuerte consiste en 4 ensayos separados por 5 minutos de intervalo entre ensayos. El protocolo de entrenamiento débil consiste en un único ensayo. Las sesiones de evaluación consistieron en la presentación del olor durante 4 segundos sin recompensa. Durante los ensayos de entrenamiento y de evaluación se registró la respuesta de cada sujeto como positiva si el sujeto extendió de su probóscide más allá de una línea virtual entre las mandíbulas abiertas durante la estimulación con el olor y

antes de la estimulación con sacarosa. Se le asignó un valor de 1 a las respuestas positivas y un valor de 0 a las negativas. Luego, se realizó un promedio por ensayo entre las respuestas de todos los animales.

### 2.B.3 Análisis estadístico

La comparación estadística del desempeño de los animales durante el entrenamiento con 4 ensayos se basa en un ANOVA de medidas repetidas (Friedrich et al., 2004), con la droga/vehículo como un factor y los ensayos como factor repetido. Para el análisis de la sesión de evaluación, se compararon los ensayos individualmente a partir de comparaciones planeadas (Mustard et al., 2012; Wright et al., 2010). La comparación entre la cantidad de comida ingerida también se hizo mediante una prueba de t.

### 2.B.4 Farmacología

Todos los animales fueron inyectados con solución vehículo (en concentraciones molares: KCl: 0,005; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,01; pH 7,8, (Mustard et al., 2010)) o con alguna droga disuelta en la misma. Las inyecciones se realizaron 15 min antes o 15 minutos después de la sesiones de entrenamiento o evaluación, dependiendo del experimento. Las inyecciones consistieron en 1 µl de dilución del fármaco o solución vehículo administradas en el tórax utilizando un microcapilar tabulado (Felsenberg et al., 2011). Las drogas utilizadas fueron flupentixol y clorhidrato de dopamina, ambos de Sigma-Aldrich, y bromhidrato de 6,7 ADTN de Santa Cruz Biotechnology. Todos los fármacos se diluyeron en solución vehículo fresca antes de cada experimento y permanecieron en hielo hasta su uso.

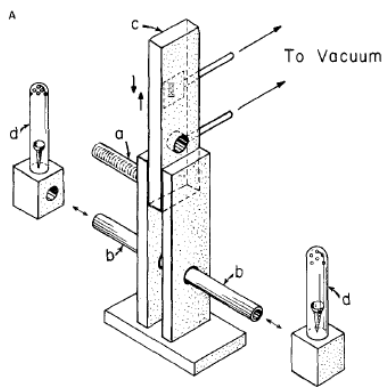
## 2.C Mosca *Drosophila melanogaster*

### 2.C.1 Animales

Los animales fueron alimentados con un medio de harina de maíz, mantenidos a 25°C de temperatura, en un ambiente de humedad relativa de 40-50%, con un ciclo de luz-oscuridad de 12L: 12O (07:00-19:00 horas). Como mosca *wild type* se usó la línea Canton-S (Krashes et al., 2009). Además, se usaron las siguientes líneas, que habían sido descritas con anterioridad: UAS-shi<sup>ts1</sup> (Kitamoto, 2001), Tbh<sup>M18</sup> (Monastirioti et al., 1996), c061-GAL4 (Krashes et al., 2009) y 0104-GAL4 (Huetteroth et al., 2015). Se utilizaron animales de entre 6 y 9 días de edad, que fueron privados de comida entre 22 y 26 horas antes del experimento.

Como en las secciones anteriores, se realizaron todos los esfuerzos posibles para disminuir el número de animales utilizado y para minimizar el sufrimiento que se le pueda causar a los mismos. 2.C.2 Dispositivo experimental

Se utilizó un laberinto en T para llevar a cabo el condicionamiento y la evaluación de los animales. El mismo es básicamente el descrito hace más de treinta años, con algunas modificaciones, que están relacionadas con que originalmente el dispositivo se diseñó para el condicionamiento con un *shock* eléctrico, y en cambio para este trabajo se utilizó un estímulo incondicionado de tipo gustativo (Tully and Quinn, 1985).



El dispositivo consta de un tubo de entrenamiento (a), dos tubos de evaluación (b), un ascensor (c), que permite trasladar las moscas de (a) hacia (b) y dos frascos en donde se colocan las soluciones odorantes (d). En particular, los olores utilizados fueron 3-octanol (OCT) y 4-metilciclohexanol (MCH). La concentración de cada uno de los olores utilizada fue calibrada para cada experimento en particular, de manera que genere una respuesta balanceada de parte de los animales. Los frascos con olor pueden ser conectados a los tubos de evaluación o al tubo de entrenamiento. El ascensor tiene dos mangueras que son conectados a una bomba de aire. Tanto en la posición de entrenamiento como de evaluación, se cierra el circuito que va desde la bomba hacia los tubos (que a su vez tienen una abertura hacia el exterior), por lo que se genera un flujo de aire.

Para entrenar a los animales se utilizó como US una solución de 1M de sacarosa + N,N-Dietil-meta-toluamida (DEET) a concentraciones variables. Para esto, se mezcla la solución con agar 1% tibio y se embebe un papel de filtro Whatman 3MM de aproximadamente 14cm x 9cm con la misma. Antes de que se seque, se enrolla por dentro del tubo de entrenamiento. Éste será el tubo que denominaremos “sacarosa”. Un tubo solamente con agar 1% es utilizado como tubo “blanco”.

### 2.C.3 Entrenamiento

Se colocan aproximadamente 100 animales en el tubo de entrenamiento “blanco” y se conecta el mismo a un frasco con olor (CS-) durante dos minutos. Luego se desconecta el olor, y los animales reciben 30

segundos de aire del cuarto experimental. Pasado este tiempo, se transfiere a las moscas al tubo “sacarosa” donde permanecen durante otros dos minutos expuestas al otro olor (CS+). Si las moscas son evaluadas inmediatamente, las mismas reciben 30 segundos de aire de la habitación y luego son transferidas al ascensor. En el caso de que sean evaluadas a otros tiempos, las moscas son colocadas en un tubo de espera, que contiene agar 1%.

Es importante tener en cuenta que cada entrenamiento tiene su entrenamiento recíproco, en el que se recompensa al otro olor. Es decir, si primero se usó MCH como CS+ y a OCT como CS-, en el entrenamiento recíproco MCH será CS- y OCT será CS+.

Para los experimentos en los que se usaron líneas de moscas termosensibles los animales fueron colocados 30 minutos antes del entrenamiento en una habitación con una temperatura de 33°C, en donde se llevó a cabo la sesión de entrenamiento y la de evaluación, realizada inmediatamente luego de la anterior.

#### 2.C.4 Evaluación

En el caso de que la evaluación no sea inmediatamente luego del entrenamiento, las moscas son transferidas del tubo de espera a un tubo “seco”, que no contiene agar, y que es conectado al dispositivo experimental en la misma posición que ocupaba el tubo de entrenamiento. A partir de ese momento, la evaluación se desarrolla de la misma forma que cuando se hace inmediatamente luego del entrenamiento: mediante un suave golpe las moscas son transferidas al ascensor y éste se baja hasta la posición de bifurcación entre los dos tubos de evaluación, que están conectados a dos frascos de olores diferentes (MCH y OCT). Al cerrarse el circuito que conecta la bomba de aire con los frascos, los olores comienzan a fluir por los tubos de evaluación durante dos minutos y son extraídos a la altura de la unión de los dos brazos, lo que asegura que no se mezclen. Durante este tiempo, las moscas pueden pasar de un tubo al otro las veces que quieran. Luego, se sube el ascensor, dejando a las moscas en el tubo que hubieran elegido. Estas son transferidas a tubos de conteo, teniendo en cuenta el tubo que hubieran elegido, en donde son anestesiadas con frío o con CO<sub>2</sub>, y luego son contabilizadas.

### 2.C.5 Análisis estadístico

Se calcula un índice de discriminación (ID) para cada ensayo:

$$ID = (\# \text{moscas CS+} - \# \text{moscas CS-}) / \# \text{moscas totales}$$

Luego se promedia este índice con el ID obtenido para el experimento recíproco. La media de estos dos índices da la unidad experimental (n=1).

Para comparar el desempeño de los distintos grupos se realizó un ANOVA de una vía seguido por contrastes de Tukey (Krashes and Waddell, 2011c).

### 3. Resultados

#### 3.A Rol de la dopamina sobre el aprendizaje apetitivo

Como he mencionado en la introducción, durante muchos años se ha estudiado a los aprendizajes apetitivos y aversivos por separado, lo que ha posibilitado un conocimiento profundo sobre los mecanismos celulares y moleculares que subyacen la formación de cada una de estas memorias. No obstante, teniendo en cuenta que en la naturaleza los animales se enfrentan usualmente a estímulos complejos, que no son puramente positivos o negativos y que a partir de ello los animales deben tener la posibilidad de actuar de forma coherente con su experiencia y las necesidades del momento, es que planteamos que cada circuito no trabajaría sólo, sino que es a partir del balance entre la actividad de ambos y dependiendo del estado motivacional, que surgiría la decisión de aproximación o rechazo.

Teniendo en cuenta esta consideración, surge la hipótesis que propone un rol dual de cada amina en el aprendizaje. Me propuse evaluar en primer lugar si la dopamina, que ya se sabe es necesaria para la formación de la memoria aversiva en la abeja *Apis mellifera* y en el cangrejo *Neohelice granulata*, interfiere a su vez con la memoria apetitiva en estos dos modelos.

##### 3.A.1 La dopamina interfiere con la memoria apetitiva cuando se administra antes del entrenamiento

###### 3.A.1.i En la abeja *Apis mellifera*

Nuestro primer objetivo fue evaluar el efecto de una inyección de DA sobre el condicionamiento olfativo del reflejo de extensión de la probóscide (PER) en la abeja (Bitterman et al., 1983). Los animales realizan una asociación entre un olor, en principio neutro para los mismos, (estímulo condicionado; EC) y una solución azucarada (estímulo incondicionado; EI). Realizamos un experimento con cuatro grupos de animales, inyectados con solución vehículo, o soluciones de distintas concentraciones de dopamina (0,1mM, 1mM o 10mM). Quince minutos después de la inyección los animales fueron sometidos a un entrenamiento de cuatro ensayos, en los cuales se pareó la presentación del olor 2-octanona con una solución de sacarosa 2M. Éste es un protocolo de entrenamiento considerado fuerte, dado que es efectivo para inducir la formación de una memoria de largo término (Menzel, 2001). La adquisición de la respuesta condicionada durante la sesión de



entrenamiento se puede observar en la figura 1b (página 49). A partir de un análisis de ANOVA de medidas repetidas no se detectaron diferencias significativas en la respuesta al olor entre los distintos grupos de animales, por lo que concluimos que la inyección de dopamina no afecta la adquisición de la respuesta condicionada apetitiva (Interacción:  $F_{6,282} = 0.12$ ,  $p = 0.945$ ; Factor grupo:  $F_{3,141} = 0.43$ ,  $p = 0.856$ ; Factor Ensayo:  $F_{2,282} = 59.20$ ,  $p < 0.001$ ). Evaluamos entonces la respuesta de los animales a distintos tiempos luego de terminada la sesión de entrenamiento. Los resultados se pueden observar en la figura 1c (página 49). Utilizando una comparación de cuadrados mínimos, se observa que no hay diferencias significativas en el desempeño de los animales 3 y 24 horas después del entrenamiento, pero sí cuando la evaluación se realizó 48 y 72 horas después del entrenamiento (3h:  $F_{1,141} = 0.10$ ,  $p = 0.757$ ; 24hs:  $F_{1,141} = 0.44$ ,  $p = 0.507$ ; 48hs:  $F_{1,141} = 5.81$ ,  $p < 0.05$ ; 72hs:  $F_{1,141} = 6.14$ ,  $p < 0.05$ ). La concentración que indujo una disminución en la proporción de animales que evoca la respuesta condicionada fue la más alta de 10mM de DA. Este resultado sugiere que la dopamina podría estar interfiriendo con la formación o la expresión de la memoria de largo término tardía (Friedrich et al., 2004).

Este resultado podría explicarse también por una disminución en la motivación de los animales por ingerir la recompensa. Es importante tener en cuenta dicha posibilidad, ya que en un trabajo anterior se ha reportado que la DA podría afectar la responsividad de los animales al azúcar (Scheiner et al., 2002). No obstante, en este trabajo comprobamos a lo largo del experimento que la respuesta incondicionada al azúcar no fue afectada, ya que el 100% de los animales respondió positivamente a la presentación de la solución azucarada a lo largo de todos los ensayos del entrenamiento. Esta diferencia con el trabajo de Scheiner y col. podría deberse a que en este trabajo utilizamos una solución de azúcar muy concentrada, de 2M, la cual está muy por encima del umbral de respuesta. Otra diferencia, es que nosotros usamos abejas recolectoras de polen, que tienen mayor responsividad al azúcar que abejas recolectoras de néctar (Pankiw and Page, 1999).

A pesar de que los animales respondieron normalmente al estímulo incondicionado y que la DA no afectó la probabilidad de ingesta durante el entrenamiento, la inyección podría estar afectando la valoración de la recompensa. Ante esta posibilidad, decidimos analizar si la inyección de dopamina afectaba el apetito de los animales. Para ello administramos una inyección de DA 10mM o solución vehículo y 15 minutos después de la misma alimentamos *ad libitum* a los animales, con una solución de sacarosa 2M. Registramos en cada animal la cantidad de alimento ingerido hasta que la solución ofrecida era rechazada lo cual ocurre cuando los

animales están saciados. Los resultados pueden verse en la figura 2 (página 50). No hay diferencias en la cantidad de alimento ingerida por ambos grupo, lo que sugiere que el efecto observado en la memoria apetitiva no está relacionado con una disminución del apetito de los animales durante el entrenamiento ( $t_{38}=0,021$ ,  $p=0,98$ ).

Si bien la DA es el agonista endógeno, podría existir la posibilidad de que esta estuviese actuando de manera inespecífica sobre otro tipo de receptores y que estos últimos fuesen responsables del efecto amnésico aquí reportado. Por ello realicé un experimento similar utilizando un agonista sintético, que se sabe que tiene mayor afinidad por los receptores de DA que la misma amina endógena, el 6,7 ADTN (Mustard et al., 2003b). Al igual que en el primer experimento, utilizamos 4 grupos de animales, uno inyectado con solución vehículo y los otros tres con distintas concentraciones de la droga (10mM, 1mM o 0,1mM). Nuevamente, las inyecciones se realizaron 15 minutos antes del inicio de la sesión de entrenamiento. En la figura 3 (página 51) se muestran los resultados. Al igual que en el experimento en el que se utilizó una inyección de dopamina, la administración de ninguna de las dosis de 6,7 ADTN mostró tener efecto alguno sobre el desempeño de los animales durante la sesión de entrenamiento (Interacción:  $F_{6,286}=0,88$ ,  $p=0,508$ ; Factor grupo:  $F_{3,143}=0,24$ ,  $p=0,870$ ; Factor ensayo:  $F_{2,282}=45,96$ ,  $p<0,001$ ). Al analizar la respuesta durante la sesión de evaluación, podemos ver que la dosis menor del agonista no tiene efecto sobre la memoria a ninguno de los tiempos medidos, ya que la respuesta de los animales de este grupo no difiere de la de los animales del grupo inyectado con vehículo. Al analizar la dosis media, observamos una disminución significativa en la respuesta condicionada de los animales a 72 horas, pero no antes ( $F_{1,143}=7,47$ ,  $p<0,01$ ). La dosis mayor de la droga genera una disminución en la respuesta evidente desde las 24 horas después del entrenamiento (24hs:  $F_{1,143}=4,21$ ,  $p<0,05$ ; 48hs:  $F_{1,143}=4,50$ ,  $p<0,05$ ; 72hs:  $F_{1,143}=12,74$ ,  $p<0,001$ ). Para todas las demás comparaciones el p valor asociado fue mayor a 0,05. Si bien este experimento arroja algunas diferencias respecto del anterior, en cuanto a los tiempos en los que el tratamiento genera efecto, ambos apoyan la idea de que la dopamina, presente durante el entrenamiento apetitivo, tiene un efecto detrimental sobre la memoria apetitiva que se hace evidente en la evocación de la memoria de largo término. Las diferencias entre DA y el agonista sintético podrían deberse a las diferencias de afinidad antes mencionada o a diferencias en la concentración efectiva final de ambas drogas luego de la inyección. Ante estas posibilidades debemos asumir que cuanto mayor sea la activación de receptores

dopaminérgicos durante el entrenamiento apetitivo, entonces mayor será el efecto detrimental sobre la memoria apetitiva.

Para saber si el efecto de la DA se origina durante la sesión de entrenamiento o en algún momento posterior al mismo como ser durante la consolidación, realizamos un experimento similar, pero administrando las inyecciones inmediatamente luego de finalizado el entrenamiento. En este caso solamente utilizamos la concentración de DA 10mM que había resultado efectiva y el correspondiente grupo control que recibió inyección del vehículo. Los resultados del entrenamiento se observan en la figura 4b (página 52). Como era de esperar, ya que hasta este momento los grupos no diferían en el tratamiento recibido, no se observan diferencias significativas en el desempeño de los dos grupos (Interacción:  $F_{2,136} = 0,12$ ,  $p = 0,338$ ; Factor grupo:  $F_{1,68} = 0,01$ ,  $p = 0,915$ ; Factor ensayo:  $F_{2,136} = 13,94$ ,  $p < 0,001$ ). Al igual que en el experimento anterior, se evaluó la memoria 3, 24, 48 y 72 horas después de terminada la sesión de entrenamiento. En este caso, como se ilustra en la figura 4c (página 52), no se observan diferencias significativas en la respuesta de los animales a ninguno de los tiempos evaluados (3hs:  $t_{68} = 0,188$ ,  $p = 0,67$ ; 24hs:  $t_{68} = 0,222$ ,  $p = 0,64$ ; 48hs:  $t_{68} = 0,200$ ,  $p = 0,66$ ; 72hs:  $t_{68} = 0,192$ ,  $p = 0,66$ ). Estos resultados indican que la DA, si bien no afecta la adquisición de la respuesta, es durante el entrenamiento mismo, que afecta un mecanismo relacionado con la memoria que se expresa recién a partir de 48 horas luego del mismo.

Una explicación alternativa a la interpretación del efecto amnésicos de la DA podría ser que la inyección de la misma genera algún déficit o daño motor de los animales que se hace evidente recién dos días después de la administración de la droga y que esto se evidencie como menor respuesta de extensión de la probóscide. Para descartar esta alternativa realizamos el siguiente experimento. Inyectamos a los animales con solución vehículo o solución de DA 10mM. Cuarenta y ocho horas después entrenamos a los mismos. Evaluamos la respuesta condicionada 3 y 24 horas después del entrenamiento. De esta forma, el tiempo total desde la inyección de DA hasta la evaluación del comportamiento fue el mismo que en los casos anteriores. Los resultados se grafican en la figura 5 (página 53). No se observan diferencias significativas entre los grupos de animales durante la sesión de entrenamiento (Interacción:  $F_{3,159} = 1,39$ ,  $p = 0,25$ ; Factor grupo:  $F_{1,53} = 0,22$ ,  $p = 0,64$ ; Factor ensayo:  $F_{3,159} = 119$ ,  $p < 0,001$ ) ni en ninguna de las dos sesiones de evaluación (3hs:  $t_{53} = 0,84$ ,  $p = 0,41$ ; 24hs:  $t_{53} = 0,78$ ,  $p = 0,44$ ). Esto nos permite descartar que los animales hubieran sufrido algún tipo

deterioro general 48 horas después de la inyección de dopamina y apoya la idea de que la administración de dopamina coincidente con el entrenamiento apetitivo afecta la memoria apetitiva de largo término.

### 3.A.1.ii En el cangrejo *Neohelice granulata*

Con el objetivo de probar cuan conservado es el efecto de dopamina antes descrito, nos propusimos probar la hipótesis que la dopamina afecta la memoria apetitiva, en este caso en el modelo de memoria apetitiva del cangrejo *Neohelice granulata*, en el cual los animales asocian un determinado contexto (CS) con la presencia de comida (US). La CR observada al colocar a los animales en el contexto de entrenamiento es una mayor actividad exploratoria, comparada con la observada en un grupo control que no ha recibido comida en dicho contexto (Kaczer and Maldonado, 2009). Un esquema del protocolo experimental se puede ver en la figura 6a. Contamos con dos pares de grupos, cada uno compuesto por un grupo entrenado y otro control. Al primer par de grupos se le inyectó solución vehículo media hora antes del entrenamiento, mientras que al otro se le inyectó DA 0,1mM. Como se indicó anteriormente, en este paradigma no poseemos una medida de aprendizaje durante el entrenamiento mismo, dado que es en ese momento cuando los animales ingieren el alimento estando en el contexto y por ende no se observa exploración. Es por eso que nos enfocamos directamente en la sesión de evaluación. Los resultados de la sesión de evaluación, llevada a cabo 24 horas después del entrenamiento se pueden ver en la figura 6b (página 54). Se observa una mayor actividad exploratoria por parte de los animales del grupo entrenado inyectado con vehículo respecto de su control, por lo que podemos decir que estos animales muestran retención de la memoria apetitiva ( $F_{3,116} = 5.43$ ,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se observan diferencias en la actividad exploratoria entre los dos grupos de animales inyectados con dopamina, lo que sugiere que esta amina afecta la memoria apetitiva de largo término también en cangrejos ( $F_{3,116} = 0.08$ ,  $p = 0.78$ ).

Para corroborar la especificidad del efecto observado repetimos el experimento agregando un tercer par de animales el cual fue inyectado con un cóctel de DA 0,1mM y el antagonista de receptores dopaminérgicos Flufenazina (Flu) 0,1mM. Elegí esta droga y dosis ya que la misma resulta efectiva para inhibir la memoria aversiva en cangrejos (Klappenbach et al., 2012). Los resultados de este experimento pueden observarse en la figura 7 (página 55). Nuevamente, se observa retención de la memoria para el grupo entrenado inyectado con vehículo ( $F_{1,174} = 15.20$ ,  $p < 0.001$ ), y no para el grupo entrenado inyectado con DA

0,1mM ( $F_{1,174}=0.09$ ,  $p= 0.77$ ). En el par inyectado con el cóctel se observa retención de la memoria para el grupo entrenado ( $F_{1,174}= 6.30$ ,  $p< 0.05$ ), lo cual nos brinda certeza acerca de la especificidad de los tratamientos farmacológicos elegidos.

Hasta aquí, podemos interpretar que la inyección de dopamina previa al entrenamiento afecta la memoria apetitiva de largo término en dos modelos distintos. Es importante destacar que si bien el efecto se aprecia en la memoria de largo término, la DA estaría interfiriendo con algún mecanismo temprano que toma lugar durante la adquisición. La aparición de un efecto a largo, pero no a corto término no debiera sorprender, ya que hay muchos trabajos que describen en distintas especies y en distintos paradigmas que los diferentes estadios de la memoria se corresponden con la formación de trazas paralelas, que tienen requerimientos bioquímicos muchas veces distintos e independientes entre sí (Friedrich et al., 2004; Locatelli and Romano, 2005; Mustard et al., 2012; Schwärzel and Müller, 2006; Trannoy et al., 2011; Yu et al., 2006). En este caso, es claro que la DA interfiere con un mecanismo que se gatilla durante el entrenamiento, y que determina la expresión a largo término.

Una pregunta que surge a partir de estos resultados es si la interferencia de DA sobre la memoria apetitiva es producto de un déficit en la formación de la propia memoria apetitiva o producto de una competencia con una memoria aversiva que se genera por la inyección de DA. Como veremos más adelante, memorias apetitivas y aversivas son capaces de co-expresarse (al menos en el cangrejo) bajo ciertas condiciones, pero si una de ambas es más fuerte que la otra, la expresión de esta última queda ocluida, lo que podría estar sucediendo en el caso de inyección de DA. En el modelo de *Neohelice*, la administración de DA podrían estar asociándose al contexto, por lo que éste último podría tomar una connotación aversiva en la cual el animal suprime la memoria apetitiva. Sin embargo, no hay forma de medir un comportamiento asociado a esta presunta memoria. Entonces, puede ser que los animales tengan una memoria apetitiva pero que no sea posible evidenciarla. En el modelo de *Apis*, por el contrario, pienso que es más difícil que se de esto, debido a la falta de una sincronización precisa entre la administración de DA y la estimulación con el olor (*timing*), ya que el CS (olor) se presenta de forma muy discreta. Para poder condicionar artificialmente a los animales, tal como se ha hecho en abejas, o como está muy caracterizado en *Drosophila*, habría que administrar DA en el preciso momento en que se da el CS, para que de ese modo funcione como un *forward conditioning* (Claridge-Chang et al., 2009; Hammer, 1993). Una alternativa es que podría estar generándose una asociación aversiva con el

contexto de aprendizaje, ya que se sabe que las abejas generan también aprendizajes visuales en circunstancias muy similares a la que se utiliza aquí (Avarguès-Weber and Mota, 2016).

Finalmente, otra opción, que no excluye las anteriores, es que la DA esté disminuyendo el valor hedónico de la recompensa, por lo cual esta resulta suficiente para formar una memoria más débil, que solo se expresa a corto o mediano término, pero no es suficiente para desencadenar la consolidación de una memoria que se exprese a largo término.

### 3.A.2 La dopamina no interfiere con la evocación de la memoria apetitiva.

En la sección anterior vimos que la DA durante el entrenamiento afecta negativamente la memoria apetitiva de largo término en abejas y cangrejos. Teniendo en cuenta esto, decidimos analizar si la dopamina tiene también efecto durante la evocación de la memoria apetitiva. El razonamiento, similar al de la sección anterior, fue que una señal negativa podría interferir con la evocación de una memoria apetitiva. Para responder esta pregunta, utilizamos primero el modelo de abeja y luego el de cangrejo.

#### 3.A.2.i En la abeja *Apis mellifera*

En el primer experimento dimos una inyección de DA antes de la sesión de evaluación para saber qué efecto tenía la misma sobre la evocación de la memoria apetitiva. Contamos con dos grupos de animales que fueron sometidos a un protocolo de entrenamiento de cuatro ensayos. Dos días después uno de los grupos recibió una inyección de vehículo y el otro una inyección de DA 10mM. Quince minutos luego de la inyección, la respuesta de los animales fue evaluada. Se eligió este tiempo ya que fue el que demostró ser efectivo cuando la inyección era previa al entrenamiento. Los resultados pueden verse en la figura 8 (página 56). No se observan diferencias significativas en las respuestas de los dos grupos experimentales ( $t_{28} = 0$ ,  $p > 0,99$ ). Esto indica, que, al menos a la dosis utilizada y en el tiempo en la que fue aplicada, la dopamina no interfiere con la evocación de la memoria apetitiva.

#### 3.A.2.ii En el cangrejo *Neohelice granulata*

Realicé un experimento similar utilizando el modelo de cangrejo. Para esto dispusimos de dos pares experimentales. Dos grupos fueron entrenados bajo un protocolo apetitivo, y otros dos grupos permanecieron

en el contexto sin ser entrenados. Al día siguiente, treinta minutos antes de la evaluación un par de grupos entrenado-no entrenado recibió inyección de vehículo y al otro par una inyección de DA 0,1mM. Los resultados se muestran en la figura 9 (página 57). Como se observa, ninguno de los dos grupos entrenados muestra diferencias con sus respectivos controles, por lo que no evidenciamos retención de la memoria apetitiva. El efecto disruptor de la inyección per-se nos impidió entonces saber si la dopamina tiene un efecto de interferencia sobre la evocación de la memoria apetitiva en cangrejo. Si bien este resultado se repitió varias veces en el paradigma apetitivo, no ocurre lo mismo con el paradigma aversivo, lo que hace sospechar que la situación negativa generada por la manipulación y la inyección resultan una señal suficientemente aversiva que interfiere con la evocación de la memoria apetitiva.

### 3.A.3 Antagonistas de receptores dopaminérgicos mejoran la memoria apetitiva en abejas pero no en cangrejos

Luego de demostrar que la administración de DA interfiere con la memoria apetitiva nos propusimos evaluar el rol de la dopamina endógena en este tipo de memorias. Bajo la hipótesis de que componentes aversivos y apetitivos interactúan en los procesos mnésicos, nuestro razonamiento se basó en que podría existir un tono basal dopaminérgico que estuviese modulando el aprendizaje apetitivo. Bajo esta hipótesis esperamos que la inyección de antagonistas de receptores dopaminérgicos facilite la formación de la memoria apetitiva.

#### 3.A.3.ii En la abeja *Apis mellifera*

Comenzando por el modelo de abejas, y teniendo en cuenta los niveles altos de aprendizaje que obtuvimos con el protocolo de cuatro ensayos y que un posible “efecto techo” impida revelar un mejoramiento de la memoria, decidimos utilizar un protocolo de entrenamiento débil, que consiste en un solo ensayo. Se sabe que este protocolo es normalmente insuficiente para la generación de una memoria de largo término y resulta entonces ideal para poner a prueba tratamientos hipermnésicos (Locatelli et al., 2005; Müller, 2000). Realizamos un experimento con tres grupos de animales. A uno de ellos se le administró solución vehículo y los otros dos recibieron una inyección del antagonista de receptores dopaminérgicos Flupentixol (FX) de 0,1mM o de 1mM. Quince minutos después de la inyección, los animales recibieron un ensayo de entrenamiento. Se

evaluó la respuesta de los animales al olor entrenado a distintos tiempos luego del entrenamiento. Los resultados se muestran en la figura 10 (página 58). Mientras que la inyección de FX 0,1mM no mostró ningún efecto sobre la respuesta de los animales ( $p > 0,05$  en todos los tiempos medidos), aquellos que recibieron la inyección de FX 1mM tuvieron una respuesta significativamente más alta a todos los tiempos medidos (1h:  $F_{1,123} = 6,14$ ,  $p < 0,05$ ; 24hs:  $F_{1,123} = 8,57$ ,  $p < 0,01$ ; 48hs:  $F_{1,123} = 4,35$ ,  $p < 0,05$ ; 72hs:  $F_{1,123} = 8,91$ ,  $p < 0,01$ ).

El efecto facilitador del FX sobre la memoria apetitiva sugiere la presencia de un control inhibitorio tónico mediado por DA sobre el aprendizaje apetitivo. Existen al menos dos explicaciones, que no son mutuamente excluyentes que podrían explicar este fenómeno. Una primera opción es que existan receptores dopaminérgicos que estén activados, producto de una liberación basal de DA. Otra opción es que, si bien no existe un estímulo aversivo aparente, la condición experimental podría tener componentes negativos que una vez antagonizados los mismos, el refuerzo apetitivo tome un valor aún más positivo, generándose una memoria apetitiva más fuerte. Entre las posibles causas que podrían otorgar características aversivas a la situación experimental podemos mencionar el aislamiento de la colmena, la manipulación de los animales y la restricción de sus movimientos en los cepos. Todos estos elementos podrían constituir estímulos que vía DA interfieren con el aprendizaje y la memoria apetitiva. Si la situación es tal, en el caso de un entrenamiento apetitivo fuerte de más de un ensayo, los estímulos positivos sobrepasan a los negativos y se expresa una memoria apetitiva de largo término, mientras en el caso de un entrenamiento débil de un solo ensayo, éste no es suficiente para generar una memoria que se exprese a largo término. No obstante, observamos en esta última situación que mediante la remoción de la señal interna de dichos estímulos aversivos por acción del FX sería posible generar una memoria apetitiva más fuerte tras un único ensayo.

### 3.A.3.ii En el cangrejo *Neohelice granulata*

Realizamos un experimento similar, pero utilizando el modelo de cangrejos. Para este experimento utilizamos dos antagonistas de receptores dopaminérgicos que habían demostrado ser efectivos para impedir la formación de una memoria aversiva, clorpromazina (CPZ) y el utilizado también en este trabajo Flufenazina (Flu). Utilizamos tres pares de grupos entrenados-no entrenados. Los animales entrenados recibieron un protocolo de entrenamiento débil, que consiste en darles a los animales una porción de comida de 10mg. Este entrenamiento resulta insuficiente para generar una memoria que se exprese a las 24 horas (Kaczer and



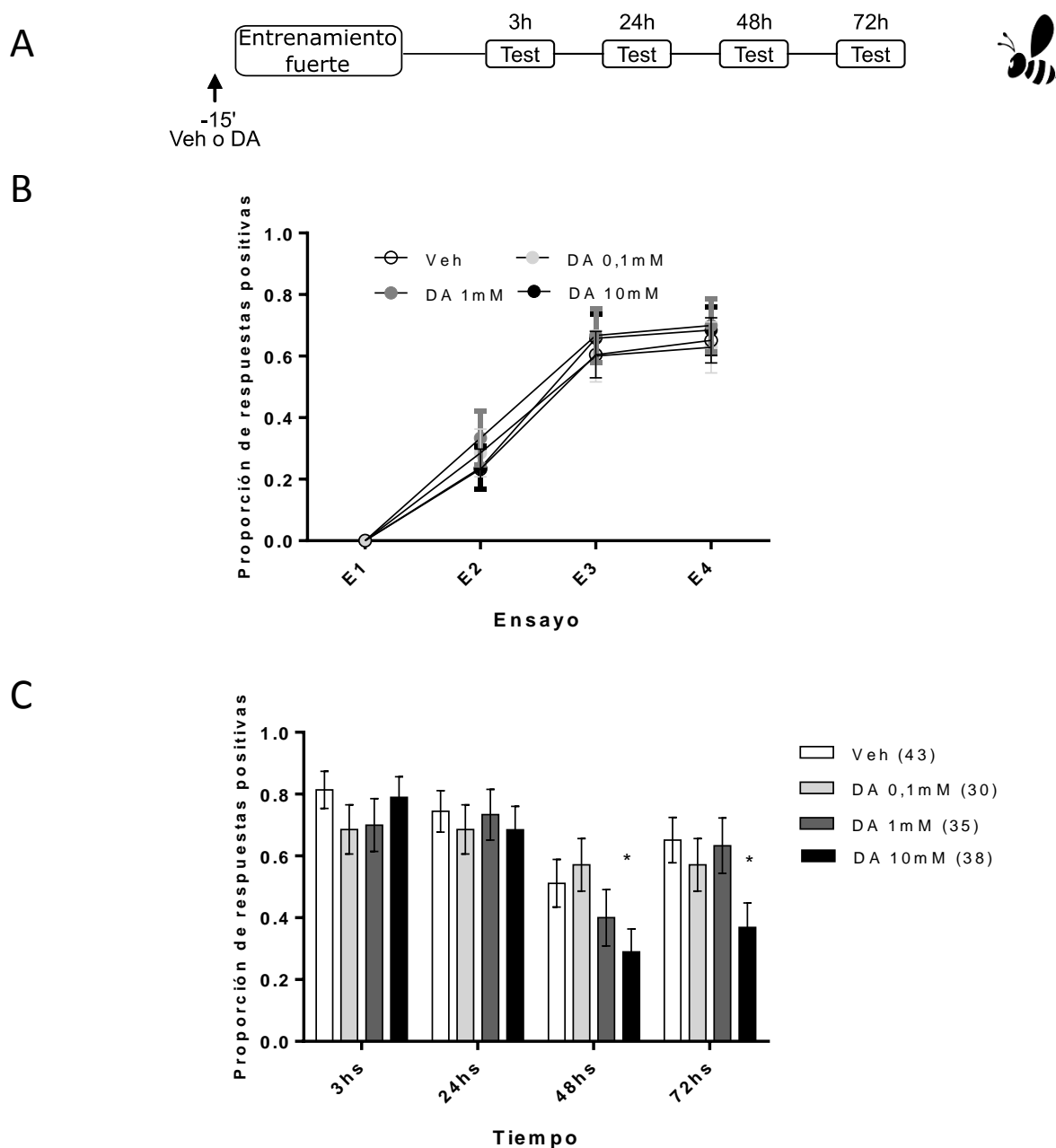
Maldonado, 2009). Media hora antes del entrenamiento, los tres pares de grupo habían recibido una inyección de vehículo, Cpz 0,1mM o Flu 0,1mM. Los resultados pueden verse en la figura 11 (página 59). Como puede observarse, ninguno de los grupos entrenados muestra diferencias significativas con su respectivo control (SAL:  $F_{5,232} = 0,31$ ,  $p = 0,76$ ; Cpz:  $F_{5,232} = 0,02$ ,  $p = 0,98$ ; Flu:  $F_{5,232} = 0,18$ ,  $p = 0,85$ ). Esto nos indica, que, al menos bajo estas condiciones experimentales (dosis y tiempos de inyección), no es posible observar una mejora en la memoria apetitiva de largo término a partir de la administración de antagonistas de receptores dopaminérgicos.

Si bien se ha reportado en otras especies que estas drogas tienen su máximo efecto luego de 30 minutos de ser inyectadas y que nosotros también hemos utilizado estas drogas a ese tiempo, y con esas mismas dosis, podrían probarse otros tiempos y dosis para realizar las inyecciones (Klappenbach et al., 2012, 2013, Unoki et al., 2005, 2006; Vergoz et al., 2007).

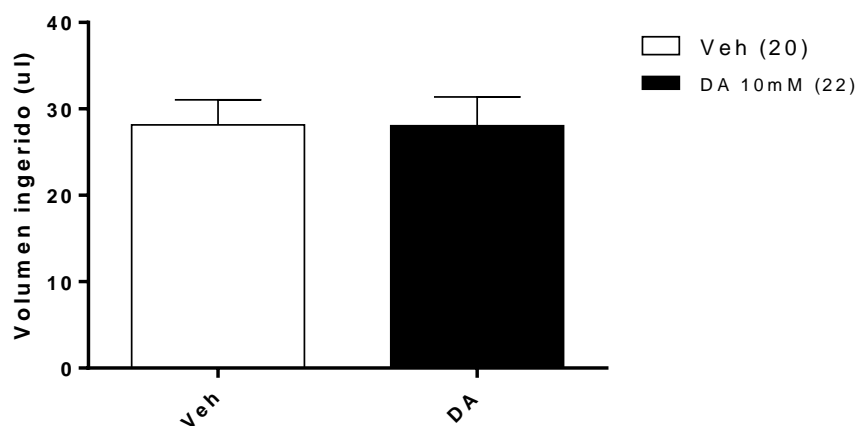
Este último experimento sugiere que no existe un tono basal de dopamina en el cangrejo que interfiera con la memoria apetitiva, que las condiciones experimentales no generan una liberación de dopamina o bien que el experimento diseñado no permite revelar este efecto. Para analizar diferencias en el tono basal de DA se podría medir la liberación de la misma en distintas condiciones que generen un mayor o menor grado de aversión. No obstante, esto sería difícil por más de un motivo. Por un lado, es metodológicamente complejo: se puede hacer una medición de DA en hemolinfa por HPLC, aunque por la rápida oxidación de las aminas esto resultaría complicado. Otra opción es hacerlo con una técnica de voltametría cíclica, como se realiza por ejemplo en ratones (Adrover et al., 2014). El segundo inconveniente que es en qué área del cerebro de cangrejos hacerlo. Un lugar candidato sería el cuerpo hemielipsoideo. Esta estructura ha sido recientemente vinculada a la memoria contextual en cangrejos y es homóloga a los *mushroom bodies* de insectos, que desde hace muchos años se sabe que son fundamentales para la formación y evocación de la memoria (Maza et al., 2016; Menzel, 2001). Este interrogante motivó entonces a hacer una primera exploración para saber si las áreas relacionadas con procesos mnésicos reciben inervación dopaminérgica. Si bien en *Drosophila melanogaster* está muy bien descripta la neuroanatomía del sistema dopaminérgico, hemos encontrado un faltante notable en cuanto a esta descripción en los otros dos modelos utilizados en este trabajo (Kaun and Rothenfluh, 2017; Mao and Davis, 2009). Es por eso que como parte de esta tesis realicé una descripción inicial

del sistema dopaminérgico en el cangrejo *Neohelice granulata* y la abeja *Apis mellifera*, haciendo hincapié en las áreas que sabemos que están relacionadas con los procesos de memoria. Esta descripción será objeto de la sección C de este capítulo.

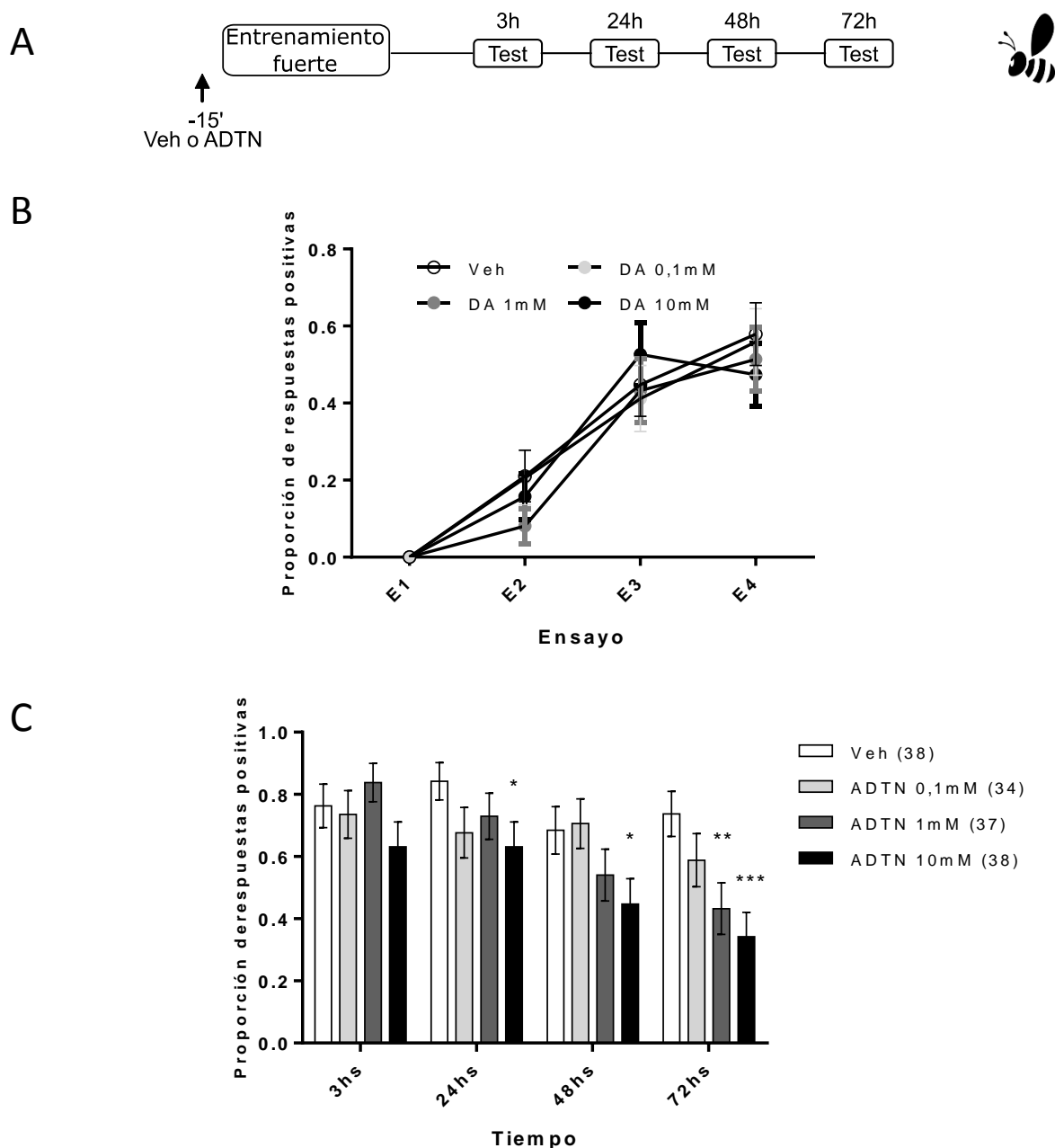
## Figuras de la sección 3.A



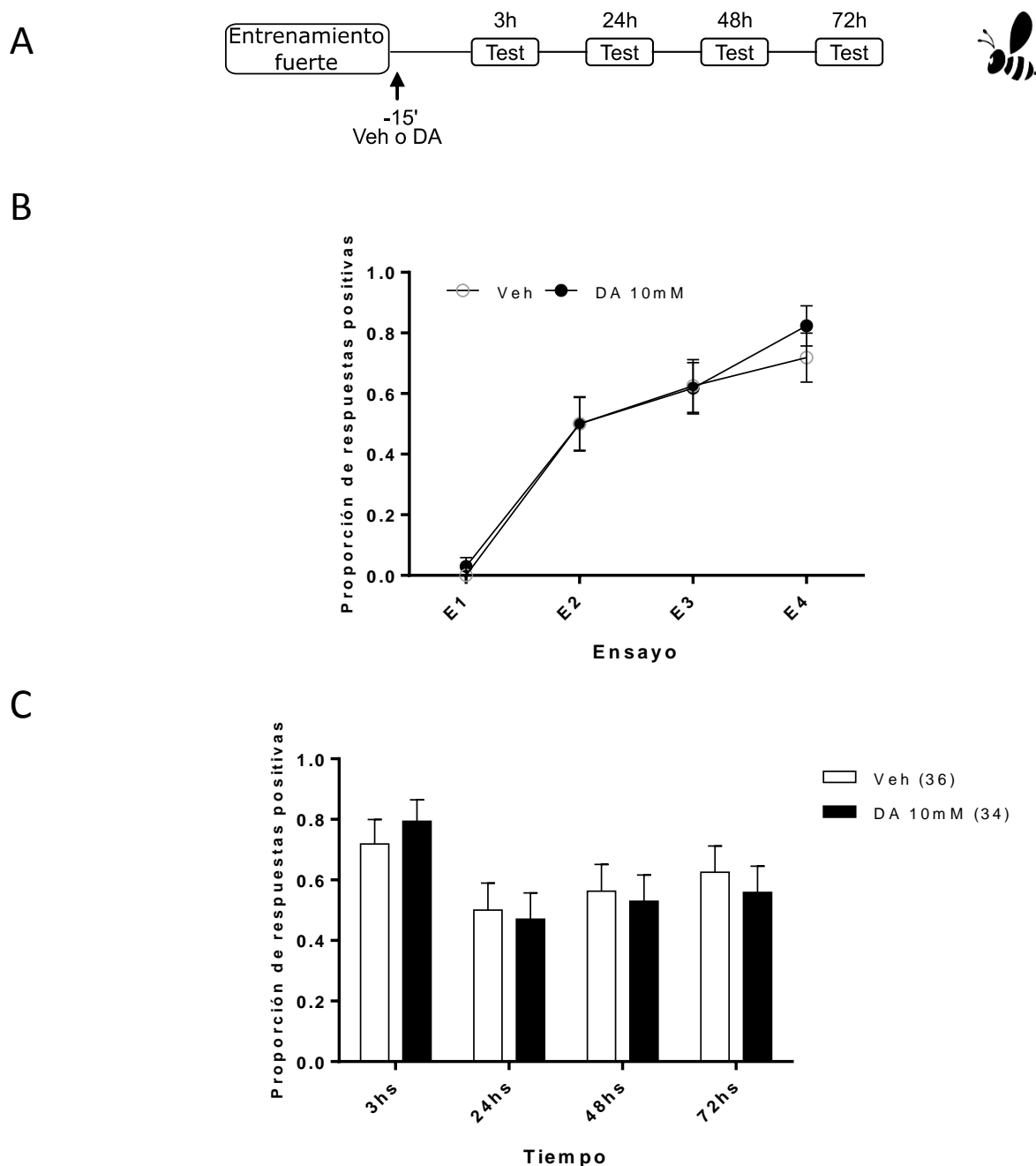
**Figura 1. La inyección de DA antes del entrenamiento interfiere con la memoria apetitiva.** A) Procedimiento experimental. Todos los animales reciben un entrenamiento fuerte de 4 ensayos separados por un intervalo entre ensayo de 5 minutos y son evaluados a distintos tiempos después del entrenamiento. Los mismos son inyectados con vehículo o distintas concentraciones de DA 15 minutos antes del entrenamiento. B) Respuesta condicionada durante la sesión de entrenamiento. C) Respuesta condicionada durante la sesión de evaluación. Los símbolos blancos corresponden al grupo control, gris claro a DA 0,1mM, gris oscuro a DA 1mM y negro DA 10mM. El número de animales utilizados en cada grupo se muestra entre paréntesis. Los valores corresponden a la proporción de animales que respondieron positivamente en cada grupo  $\pm$  error estándar de la media, que fue calculada a partir de asignarle un valor de 0 a cada respuesta negativa y un valor de 1 a las respuestas positivas. \*  $p < 0,05$ ; en contrastes LSD entre el grupo señalado y el control. Cuando no hay indicación quiere decir que no hay diferencias significativas. El número de animales utilizados en cada grupo se muestra entre paréntesis.



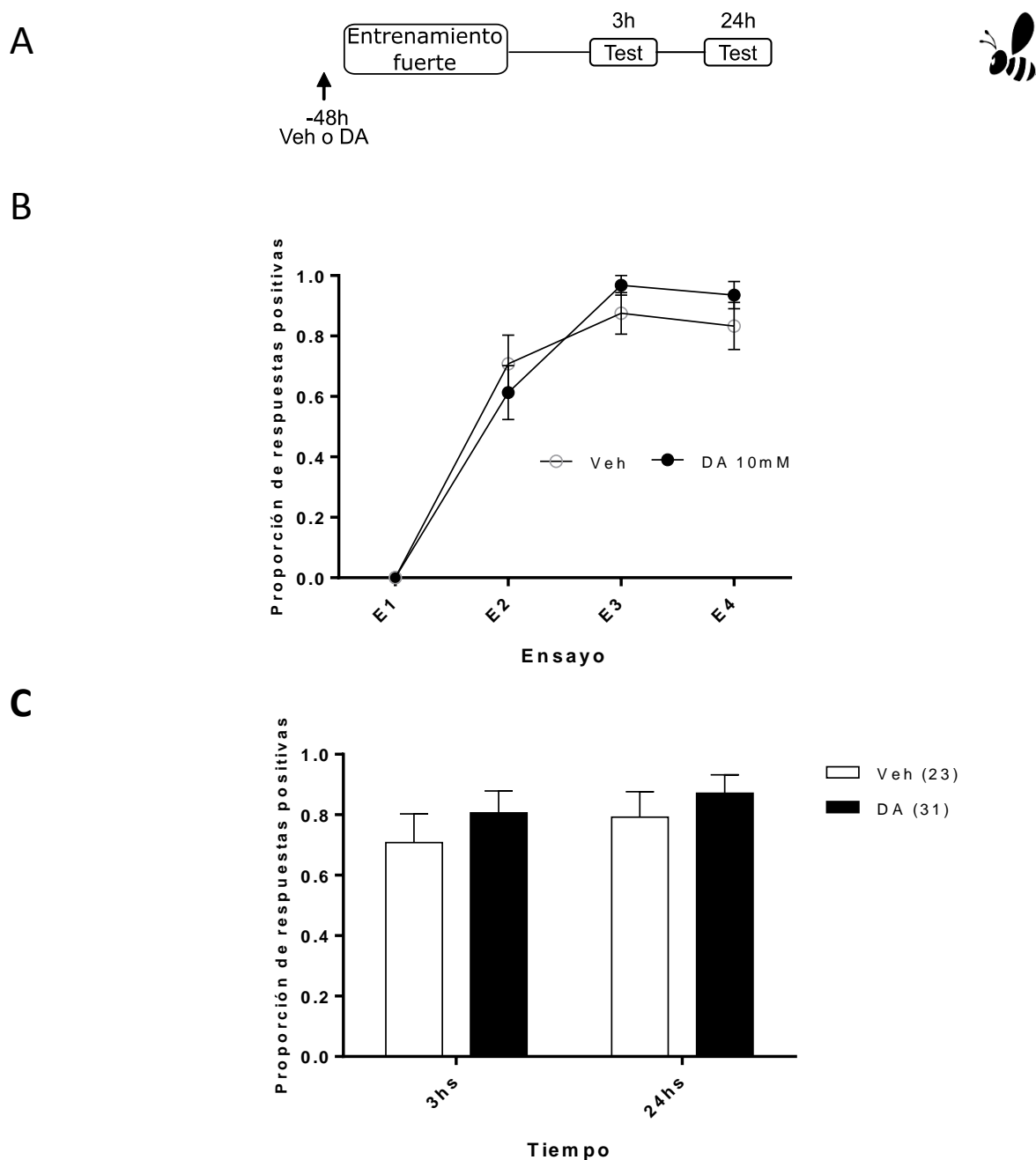
**Figura 2. La inyección de DA no afecta el apetito.** Volumen medio de sacarosa ingerido por cada grupo +/- error estándar. La barra blanca pertenece a los animales del grupo control, mientras que la barra negra corresponde a los animales inyectados con DA 10mM. El número de animales utilizados en cada grupo se muestra entre paréntesis.



**Figura 3. La inyección de un agonista de receptores DA antes del entrenamiento interfiere con la memoria apetitiva.** A) Procedimiento experimental. Todos los animales reciben un entrenamiento fuerte de 4 ensayos separados por un intervalo entre ensayos de 5 minutos y son evaluados a distintos tiempos después del entrenamiento. Los mismos son inyectados con ADTN o vehículo 15 minutos antes del entrenamiento. B) Respuesta de los animales durante la sesión de entrenamiento. C) Respuesta de los animales durante la sesión de evaluación. Los símbolos blancos corresponden al grupo control, los gris claro a ADTN 0,1mM, gris oscuro a ADTN 1mM y negro ADTN 10mM. El número de animales utilizados en cada grupo se muestra entre paréntesis. Los valores corresponden a la proporción de animales que respondieron positivamente en cada grupo +/- error estándar de la media. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  en contrastes LSD entre el grupo señalado y el control. Cuando no hay indicación quiere decir que no hay diferencias significativas.

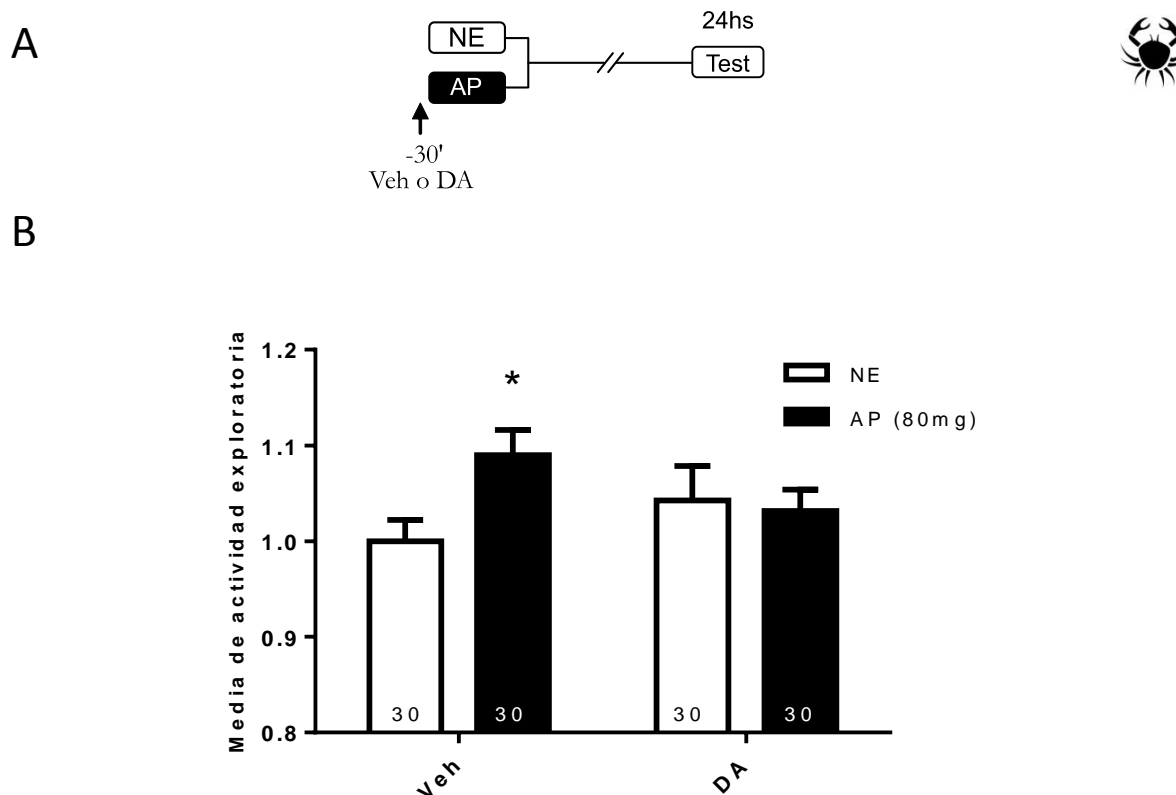


**Figura 4 La inyección de DA después del entrenamiento no interfiere con la memoria apetitiva.** A) Procedimiento experimental. Todos los animales reciben un entrenamiento fuerte de 4 ensayos separados por intervalo entre ensayos de 5 minutos y son evaluados a distintos tiempos después del entrenamiento. Los mismos son inyectados inmediatamente después del entrenamiento con DA o vehículo. B) Respuesta condicionada durante la sesión de entrenamiento. C) Respuesta condicionada durante la sesión de evaluación. Los símbolos blancos corresponden al grupo control y los negros a DA 10mM. El número de animales utilizados en cada grupo se muestra entre paréntesis. Los valores corresponden a la proporción de animales que respondieron positivamente en cada grupo +/- error estándar de la media.

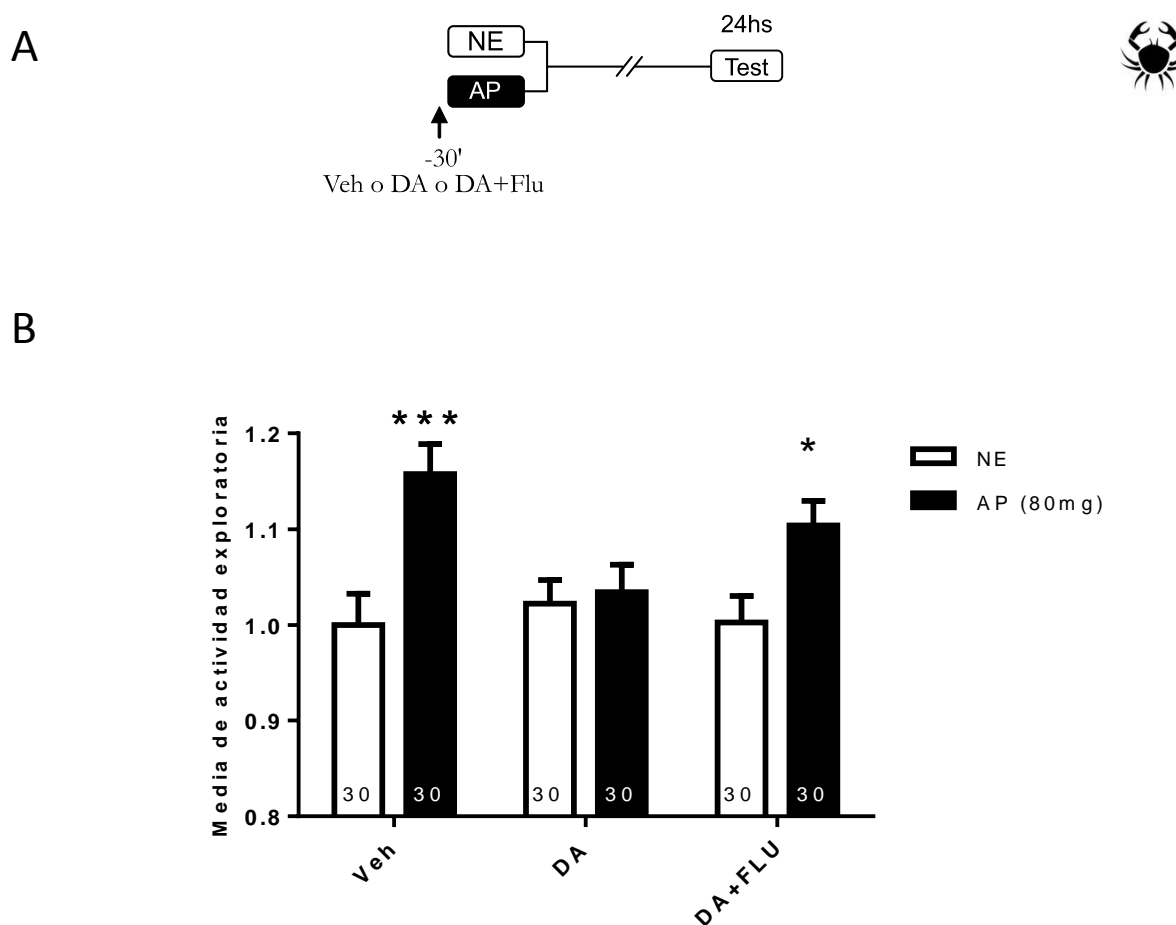


**Figura 5 La DA no reduce la respuesta ni el aprendizaje de los animales 48hs después de la inyección.** A) Procedimiento experimental. Todos los animales reciben un entrenamiento fuerte de 4 ensayos separados por un intervalo entre ensayos de 5 minutos y son evaluados a distintos tiempos después del entrenamiento. Los animales son inyectados 48 hs antes del entrenamiento con DA 10 mM o vehículo. B) Proporción de animales que muestra respuesta condicionada durante la sesión de entrenamiento. C) Proporción de animales que muestra la respuesta condicionada durante la sesión de evaluación. Los símbolos blancos corresponden al grupo control y los negros a DA 10mM. El número de animales utilizados en cada grupo se muestra entre paréntesis. Los valores corresponden a la proporción de animales que respondieron positivamente en cada grupo +/- error estándar de la media.



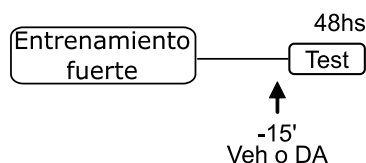


**Figura 6. La inyección de DA antes del entrenamiento interfiere con la memoria apetitiva.** A) Esquema del procedimiento experimental. El grupo entrenado recibe un pellet de 80mg mientras que los animales del grupo no entrenado permanecen en el contexto sin recibir ninguna estimulación. Los mismos son inyectados 30 minutos antes del entrenamiento con DA 0,1mM o vehículo. B) Actividad exploratoria durante la sesión de evaluación. Las barras blancas pertenecen a los animales del grupo no entrenado, mientras que las barras negras corresponden a los animales entrenados. La inyección recibida se indica debajo de cada barra. El número de animales utilizados en cada grupo se muestra en cada barra. Los valores corresponden a la media de la actividad exploratoria de cada grupo, normalizada a la media del grupo control inyectado con solución vehículo +/- error estándar. \*  $p < 0,05$ ; en contrastes LSD entre el grupo señalado y el control. Cuando no hay indicación quiere decir que no hay diferencias significativas.

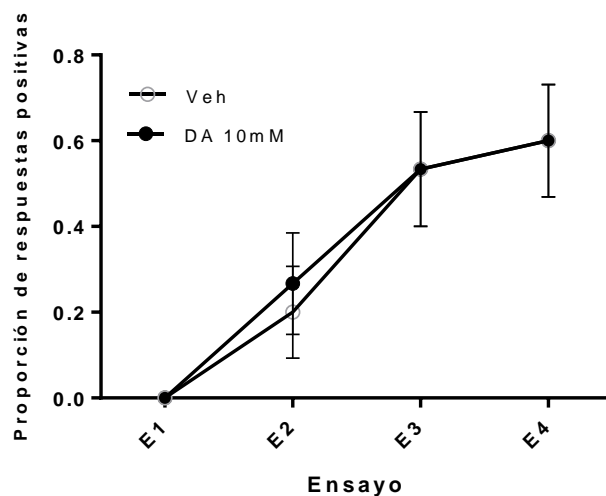


**Figura 7. La inyección de DA antes del entrenamiento interfiere con la memoria apetitiva y este efecto es revertido por la inyección de un antagonista de receptores de DA.** A) Esquema del procedimiento experimental. El grupo entrenado recibe un pellet de 80mg mientras que los animales del grupo no entrenado permanecen en el contexto de entrenamiento sin recibir estimulación. Todos los animales son inyectados 30 minutos antes del entrenamiento con DA 0,1mM, vehículo o con un cóctel de DA 0,1mM y Flufenazina 0,1mM. B) Actividad exploratoria durante la sesión de evaluación. Las barras blancas pertenecen a grupos no entrenados, mientras que las barras negras corresponden a grupos entrenados. La inyección recibida se indica debajo de cada barra. El número de animales utilizados en cada grupo se muestra en cada barra. Los valores corresponden a la media de la actividad exploratoria de cada grupo, normalizada a la media del grupo control inyectado con solución vehículo +/- error estándar. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  en contrastes LSD entre el grupo señalado y el control. Cuando no hay indicación quiere decir que no hay diferencias significativas.

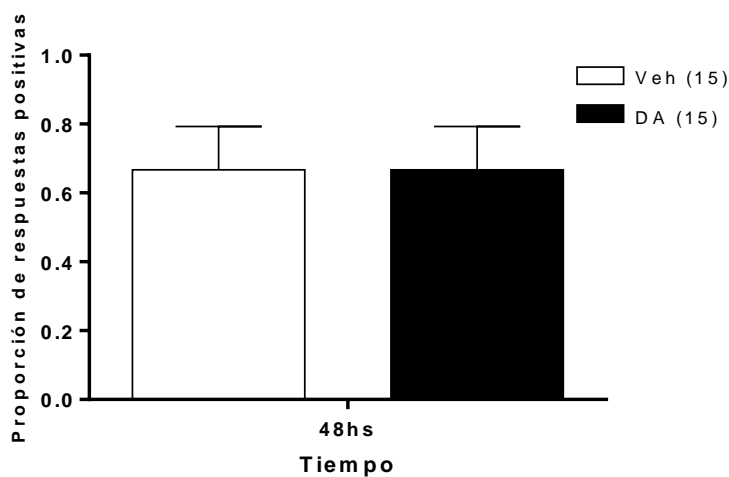
A



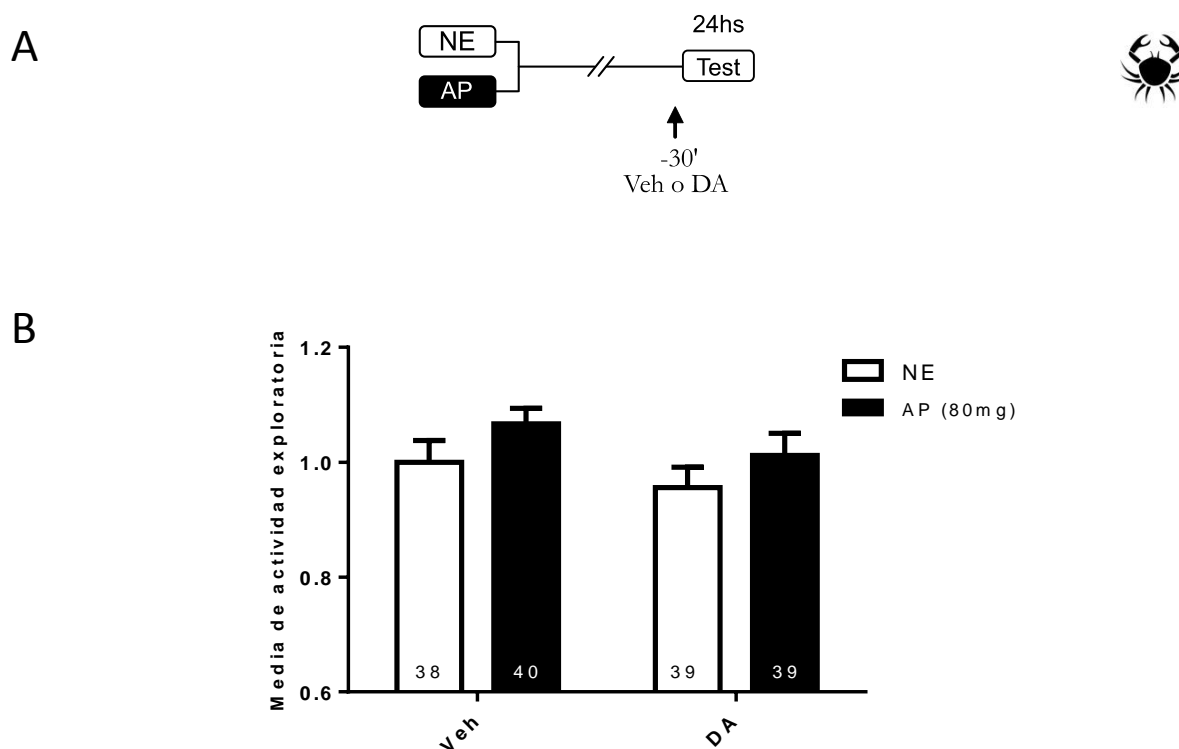
B



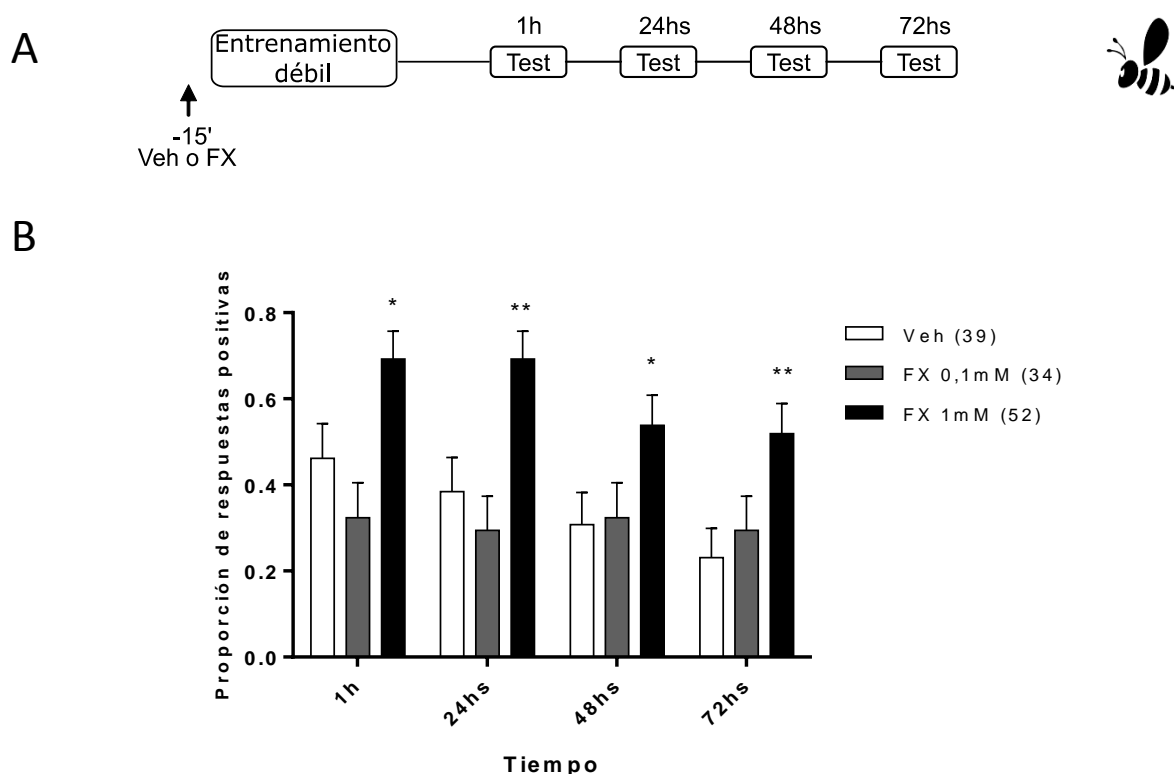
C



**Figura 8. La inyección de DA antes de la evaluación no interfiere con la evocación de la memoria apetitiva.** A) Esquema del procedimiento experimental. Todos los animales reciben un entrenamiento fuerte de 4 ensayos separados por un intervalo entre ensayos de 5 minutos y son evaluados 48 hs después del entrenamiento. Los animales son inyectados 15 minutos antes de la evaluación con DA 10mM o vehículo. B) Proporción de animales que muestran la respuesta condicionada durante la sesión de evaluación. El número de animales utilizados en cada grupo se muestra en cada barra. Los valores corresponden a la proporción de animales que respondieron positivamente en cada grupo +/- error estándar de la media.



**Figura 9. El efecto inespecífico de la inyección impide sacar conclusiones sobre el efecto de la DA sobre la evocación.** A) Procedimiento experimental. El grupo entrenado recibe un pellet de 80mg mientras que los animales del grupo no entrenado permanecen en el contexto sin recibir ninguna estimulación. Los mismos son inyectados 30 minutos antes de la evaluación con DA 0,1mM o vehículo. B) Respuesta de los animales durante la sesión de evaluación. Las barras blancas pertenecen a los animales del grupo no entrenado, mientras que las barras negras corresponden a los animales entrenados. La inyección recibida se indica en el gráfico. El número de animales utilizados en cada grupo se muestra entre paréntesis. Los valores corresponden a la media de la actividad exploratoria de cada grupo, normalizada a la media del grupo control inyectado con solución vehículo +/- error estándar.



**Figura 10. La inyección de un antagonista de DA 15 minutos antes del entrenamiento facilita la memoria apetitiva.** A) Esquema del procedimiento experimental. Todos los animales reciben un entrenamiento de un único ensayo y son evaluados a distintos tiempos después del entrenamiento. Los mismos son inyectados 15 minutos antes del entrenamiento con Flupentixol o vehículo. B) Proporción de los animales que responden de manera condicionada durante la sesión de evaluación. Las barras blancas corresponden al grupo control, las grises a Flupentixol 0,1mM y las negras a Flupentixol 1mM. El número de animales utilizados en cada grupo se muestra entre paréntesis. Los valores corresponden a la proporción de animales que respondieron positivamente en cada grupo  $\pm$  error estándar de la media. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; en contrastes LSD entre el grupo señalado y el control. Cuando no hay indicación quiere decir que no hay diferencias significativas.

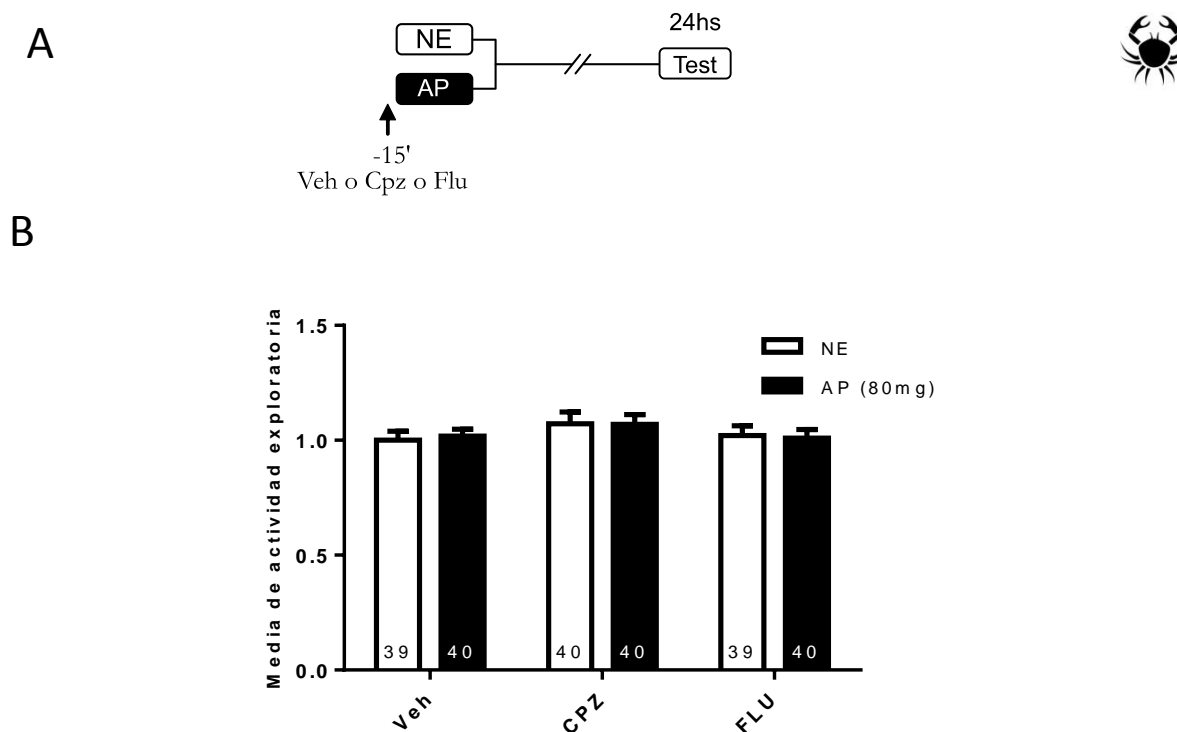


Figura 11. **La inyección de antagonistas de receptores de DA 30 minutos antes del entrenamiento no tiene efecto sobre la memoria apetitiva.** A) Esquema del procedimiento experimental. El grupo entrenado recibe un pellet de 10mg mientras que los animales del grupo no entrenado permanecen en el contexto sin recibir estimulación. Todos los animales son inyectados 30 minutos antes del entrenamiento con vehículo, Flufenzina o Clorpromazina (0,1mM). B) Actividad exploratoria durante la sesión de evaluación. Las barras blancas pertenecen a los grupos no entrenados, mientras que las barras negras corresponden a los animales entrenados. La inyección recibida se indica debajo de cada barra. El número de animales utilizados en cada grupo se muestra en cada barra. Los valores corresponden a la media de la actividad exploratoria de cada grupo, normalizada a la media del grupo control inyectado con solución vehículo +/- error estándar.

### 3.B Efecto de dos entrenamientos simultáneos de signo opuesto

Hasta el momento he analizado cómo la señal interna aversiva mediada por DA modula una memoria apetitiva. Los resultados llevan a interpretar que el efecto de la DA sobre la memoria apetitiva recapitula parte de la interacción que pueda existir entre aprendizajes apetitivos y aversivos, y el efecto que ello tenga sobre la memoria. Por ello, en esta sección analizaré mediante ensayos comportamentales, qué ocurre respecto del contenido mismo de la memoria cuando los animales reciben simultáneamente dos estímulos incondicionados de signo opuesto asociados a un estímulo condicionado.

Para responder esta pregunta utilicé dos modelos experimentales distintos. En el cangrejo *Neohelice granulata* utilicé el paradigma apetitivo gustativo utilizado anteriormente, en el que los animales asocian el mismo contexto con la presencia de comida, y el paradigma aversivo visual, en el que los animales asocian el contexto con un estímulo visual de peligro (EVP). Es importante destacar que, por utilizar el mismo contexto, estos dos paradigmas pueden ser combinados, recibiendo los animales ambos estímulos incondicionados de manera simultánea.

También utilicé el modelo de la mosca *Drosophila melanogaster* que, por las herramientas genéticas disponibles, me permitió diseccionar parte de los circuitos involucrados en el aprendizaje. En este caso, usé un paradigma en el cual la modalidad de los estímulos incondicionados apetitivos y aversivos es gustativa. En este paradigma se asocia un olor determinado con la presencia de sacarosa, que puede o no contener además una sustancia amarga, y por lo tanto desagradable para los animales (N,N-Dietil-meta-toluamida, DEET). Este compuesto, ampliamente usado como repelente de insectos, es detectado por medio de diferentes receptores gustativos, como son los Gr32a, Gr33a, and Gr66a (Lee et al., 2010). A pesar de que ha sido el repelente más utilizado de los últimos 60 años, no se conoce exactamente el mecanismo celular por el cual este compuesto funciona (Katz et al., 2008). Se ha demostrado que bajas dosis del mismo (menores al 1%, cuando los repelentes comerciales tienen por lo menos un 25% del mismo) reducen significativamente el comportamiento de alimentación de las moscas (Das et al., 2014; Lee et al., 2010). Se ha visto también que, si bien en concentraciones mucho mayores que las usadas en este trabajo (un orden de magnitud más), el DEET también es detectado por receptores olfatorios, generando una respuesta de evitación (Ditzen et al., 2008; Kain et al., 2013). Es decir, había sido ya demostrado que este compuesto podía funcionar como un estímulo aversivo. La posibilidad de disolverlo en una solución azucarada permitió poner a prueba un condicionamiento con un

estímulo mixto que contiene a la vez un componente apetitivo y otro aversivo. De la proporción entre sacarosa y DEET surge la valencia neta del US, siendo esta apetitiva cuando se usa sacarosa sola o sacarosa con DEET en bajas concentraciones, o aversiva, en el caso de utilizar sacarosa con DEET en altas concentraciones.

Describiré primero los resultados obtenidos en *Neohelice*, y luego los obtenidos en *Drosophila*, más allá de que algunas preguntas sean abordadas utilizando ambos modelos.

### 3.B.1 Cangrejo *Neohelice granulata*

#### *3.B.1.i La memoria evocada depende del balance entre la fuerza de los entrenamientos aversivo y apetitivo.*

Como primer paso, decidí analizar en qué medida los cangrejos podían asociar a un mismo contexto dos estímulos incondicionados simultáneos de valencia opuesta. Para esto entrené a los animales utilizando los dos protocolos introducidos anteriormente, el aversivo y el apetitivo.

En un trabajo anterior se había indicado que los cangrejos no establecían la doble asociación, a menos que transcurriera un intervalo de al menos una hora entre ambas modalidades de entrenamiento (Kaczer and Maldonado, 2009). En base a esos resultados diseñé y realicé una serie de experimentos para comprender la interacción entre aprendizajes apetitivos y aversivos, y describir las condiciones de entrenamiento en las cuales se evidencia interferencia entre las dos memorias. Inicialmente probé la dependencia de la fuerza de los entrenamientos. Realicé tres experimentos, en los que utilicé protocolos de distinta fuerza. En los tres experimentos incluí 4 grupos de animales. Un grupo no entrenado, que estuvo en el contexto de entrenamiento durante el mismo tiempo que los otros grupos, pero sin recibir ningún estímulo. El segundo grupo fue entrenado apetitivamente: luego de 5 minutos en el contexto recibió una porción de alimento, que fue ingerida durante los siguientes 45 minutos que el animal permanece en el contexto. En distintos experimentos se modificó la cantidad de alimento entre 40, 80 o 160 mg, que corresponde a un entrenamiento que denominamos bajo, intermedio o alto respectivamente. El tercer grupo, luego de pasar 5 minutos en el contexto, recibe un entrenamiento aversivo de 10, 15 o 30 ensayos con el EVP (bajo, intermedio o alto respectivamente). El intervalo entre estímulos se adaptó para que el tiempo total de entrenamiento sea de 45 minutos. Finalmente, contamos con un grupo entrenado de forma mixta, que recibe ambos protocolos de forma simultánea. Al día siguiente del entrenamiento todos los animales son colocados en el contexto. Durante 5 minutos se mide la actividad exploratoria, para evaluar la retención de memoria apetitiva. Luego de ese



tiempo, los animales reciben una presentación del EVP y se mide su respuesta de escape para evaluar la retención de la memoria aversiva. Se compara la actividad exploratoria del grupo “apetitivo” con la del grupo “no entrenado” con el fin de revelar la memoria apetitiva. Para evaluar la retención de la memoria apetitiva del grupo “mixto”, se compara su actividad exploratoria con la del grupo “aversivo”. No se realiza la comparación con el grupo “no entrenado” ya que éste difiere en dos tratamientos respecto del grupo “mixto”. Para evaluar la retención de la memoria aversiva se compara la respuesta de escape del grupo “aversivo” con la del grupo “no entrenado” y en el caso del grupo “mixto” se compara su respuesta de escape con la del grupo “apetitivo”.

En concordancia con los resultados obtenidos por Kaczer, cuando el grupo “mixto” recibe dos protocolos de entrenamiento bajo (40mg de alimento y 10 ensayos del EVP, Figura 12, página 78) no se revela retención de ninguna de las dos memorias 24 hs después del entrenamiento (Memoria aversiva: Mix vs Ap:  $F_{1,156} = 1.13$ ,  $p=0.26$ ; Memoria apetitiva: Mix vs Av:  $F_{1,156} = 0.87$ ,  $p=0.39$ ). Sin embargo, los grupos que recibieron solo entrenamiento aversivo o apetitivo, si muestran normal retención de las respectivas memorias (Ap vs NE:  $F_{1,156} = 2.01$ ,  $p<0.05$ ; Av vs NE:  $F_{1,156} = 2.06$ ,  $p<0.05$ ). El hecho de que ambos entrenamientos resulten suficientes para observar memoria de largo término cuando están solos y no lo sean cuando están combinados, indica un grado de interferencia supresiva entre ambos aprendizajes o bien entre las respectivas memorias.

En un segundo experimento, aumenté la fuerza de ambos protocolos, utilizando 80mg de alimento y 15 presentaciones del EVP (Figura 13, página 79). Nuevamente, como era de esperar, se observa retención de la memoria apetitiva y de la memoria aversiva para los grupos que recibieron los entrenamientos simples (Ap vs NE:  $F_{1,156} = 2.10$ ,  $p<0.05$ ; Av vs NE:  $F_{1,156} = 3.40$ ,  $p<0.001$ ). En este caso, el grupo “mixto” también muestra retención de ambas memorias (Mix vs Av:  $F_{1,156} = 4.14$ ,  $p<0.001$ ; Mix vs Ap:  $F_{1,156} = 3.75$ ,  $p<0.001$ ). Utilizando dos protocolos aun más fuertes (160mg y 30 ensayos, Figura 14, página 80) obtuvimos un resultado similar. Los grupos entrenados en forma simple muestran sus respectivas memorias (Ap vs NE:  $F_{1,155} = 2.91$ ,  $p<0.01$ ; Av vs NE:  $F_{1,156} = 3.48$ ,  $p<0.001$ ) y el grupo que recibió ambos entrenamientos de forma simultánea muestra retención de las dos memorias (Mix vs Av:  $F_{1,155} = 1.99$ ,  $p<0.05$ ; Mix vs Ap:  $F_{1,155} = 2.89$ ,  $p<0.01$ ).

A partir de estos tres experimentos se pueden sacar al menos dos conclusiones. Por un lado, es evidente que los animales puede asociar un mismo contexto con dos estímulos opuestos que son presentados de forma simultánea. Por otro lado, vemos que la expresión de esta memoria es dependiente de la fuerza de los protocolos de entrenamiento. Si ambos protocolos no son lo suficientemente fuertes, no se revela

memoria alguna. En qué momento se da esta interferencia, si es durante la adquisición o durante la evocación, trataré de responder en los próximos experimentos.

En un siguiente set de experimentos, teniendo en cuenta que vimos que el aprendizaje depende de la intensidad del entrenamiento, decidimos utilizar combinaciones de protocolos de entrenamiento “no balanceadas”. Es decir, combinamos un entrenamiento fuerte de un tipo con un entrenamiento intermedio del tipo opuesto.

En un primer experimento utilizamos un protocolo aversivo alto y un protocolo apetitivo intermedio (Figura 15a, página 81). Encontramos retención de ambas memorias cuando los animales reciben los entrenamientos de modo simple (Ap vs NE:  $F_{1,155} = 2.98$ ,  $p < 0.01$ ; Av vs NE:  $F_{1,155} = 2.31$ ,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, cuando los animales reciben ambos entrenamientos en forma simultánea solamente se muestra retención de la memoria aversiva (Mix vs Av:  $F_{1,155} = 1.10$ ,  $p = 0.27$ ; Mix vs Ap:  $F_{1,155} = 4.11$ ,  $p < 0.001$ ) a pesar de que el entrenamiento apetitivo era de tipo intermedio y asegura memoria apetitiva cuando esta combinado con un protocolo aversivo de fuerza intermedia.

En un experimento complementario utilizamos un protocolo apetitivo fuerte junto con un protocolo aversivo intermedio (Figura 15b, página 81). Los grupos que recibieron los entrenamientos de modo simple mostraron nuevamente retención de su respectiva memoria (Ap vs NE:  $F_{1,153} = 3.65$ ,  $p < 0.001$ ; Av vs NE:  $F_{1,153} = 3.51$ ,  $p < 0.001$ ). En este caso, el grupo mixto mostró solamente retención de la memoria apetitiva (Mix vs Av:  $F_{1,153} = 3.70$ ,  $p < 0.001$ ; Mix vs Ap:  $F_{1,153} = 0.24$ ,  $p = 0.81$ ) a pesar de que el entrenamiento aversivo de fuerza intermedia asegura una memoria aversiva cuando esta combinado con un protocolo apetitivo de fuerza intermedia.

Estos resultados junto con los anteriores demuestran que la memoria que se expresa depende del balance y la fuerza relativa de los protocolos de entrenamiento utilizados. Dependiendo de las condiciones de entrenamiento puede expresarse una memoria en el caso de que haya un entrenamiento de una fuerza mayor que el otro; dos memorias en el caso de que los dos entrenamientos tengan una fuerza equivalente y suficiente; o ninguna memoria, en el caso que los entrenamientos sean de baja intensidad. Esto último nos indica que hay una interacción entre las dos experiencias. En qué momento se produce dicha interferencia y cómo se codifica la asociación realizada son preguntas que dieron origen a los siguientes experimentos.

### 3.B.1.ii *Luego del entrenamiento mixto se generan dos trazas mnésicas en paralelo*

De la sección precedente surge la siguiente pregunta: ¿son las memorias apetitivas y aversivas asociadas al mismo contexto integradas en una misma traza mnésica o, por el contrario, se forman dos trazas separadas? Para responder esta pregunta realizamos dos experimentos que se valen de un protocolo de reconsolidación como herramienta. Como ya fue explicado anteriormente, luego de ser consolidada, si se presenta un recordatorio con determinadas características, la memoria puede entrar en un proceso de labilización-reconsolidación, durante el cual la misma puede ser modificada cuantitativa y cualitativamente (Nader et al., 2000; Sara, 2000). Se ha demostrado que la reconsolidación de las memorias aversiva y apetitiva puede ser interferida por el inhibidor de síntesis proteica cicloheximida (Kaczer et al., 2011; Pedreira et al., 2002). Sin embargo, si el recordatorio no incluye una discordancia entre la expectativa que indica la memoria ya formada y lo que realmente sucede, entonces la labilización no tiene lugar y la cicloheximida no tiene efecto. (Pedreira et al., 2004). En este caso, decimos que la ausencia de un *mismatch* “protege” a la memoria original, ya que la misma no pasa por el estado de fragilidad susceptible a cicloheximida.

Teniendo en cuenta esto, pensamos que si luego de un entrenamiento mixto, solamente una de las predicciones es cumplida, hay entonces dos resultados posibles. Si ambas asociaciones están codificadas en una misma traza mnésica entonces es posible pensar que el recordatorio las proteja a ambas o, en caso de resultar incompleto, no proteja a ninguna. En ambos casos, lo que esperamos ver es que ambas asociaciones tengan el mismo destino en el caso de que se administre un agente interferente como ser cicloheximida. Por el contrario, en un escenario en el que las dos asociaciones son codificadas independientemente una de la otra, es de esperar que ante un recordatorio incompleto, solamente una de ellas quede protegida del efecto de un agente interferente que bloquea la reconsolidación.

En el primer experimento utilizamos 4 grupos de animales, que como en la sección anterior, son los grupos: “no entrenado”, “apetitivo”, “aversivo” y “mixto”. En este caso utilizamos entrenamientos apetitivos y aversivos de fuerza intermedia, por lo que esperamos la expresión de ambas asociaciones. En el primer día los animales son entrenados. En el día siguiente todos los animales reciben una inyección de cicloheximida (45µg/animal) y media hora más tarde son re-expuestos al contexto de entrenamiento. Luego de 5 minutos reciben 20 mg de alimento que son ingeridos durante los siguientes 5 minutos. Posteriormente, los animales

son retirados del contexto. De acuerdo a los antecedentes, esta cantidad de alimento es suficiente para impedir el proceso de labilización-reconsolidación, es decir protege la memoria apetitiva del agente interferente (Kaczer et al., 2011). El día siguiente se lleva a cabo la sesión de evaluación, de la misma manera que fue explicada anteriormente (Figura 16, página 82). Pudimos revelar memoria apetitiva en el grupo “apetitivo”, pero no memoria aversiva en el grupo “aversivo” (Ap vs NE:  $F_{1,146} = 3.44$ ,  $p < 0.001$ ; Av vs NE:  $F_{1,146} = 0.35$ ,  $p = 0.73$ ). Esto era esperable, ya que el recordatorio apetitivo impide “protege” a la memoria apetitiva de la interferencia producida por la droga. En cambio, el grupo “aversivo” sufre un *mismatch*, ya que su predicción no se cumple, la memoria se labiliza y no es reconsolidada debido a la administración de la droga. Cuando evaluamos al grupo “mixto” vemos retención de la memoria apetitiva pero no de la memoria aversiva (Mix vs Av:  $F_{1,146} = 2.11$ ,  $p < 0.05$ ; Mix vs Ap:  $F_{1,146} = 0.83$ ,  $p = 0.41$ ). Esto quiere decir que una sola memoria fue interferida, quedando intacta la otra. En paralelo se corrió un par de grupos “no entrenado”-“aversivo”, que tuvieron el mismo tratamiento, solo que en el día de la re-exposición recibieron una inyección de solución salina en lugar de cicloheximida. En el día de la evaluación, el grupo “aversivo” mostró retención de la memoria al ser comparado con su control ( $t_{78} = 2.02$ ,  $p < 0.05$ ). Esto nos indica que el efecto amnésico observado anteriormente, tanto para el grupo “aversivo” como para el “mixto” inyectados con cicloheximida se debe al bloqueo de la reconsolidación de la memoria aversiva y no a que el entrenamiento aversivo haya sido insuficiente o a que el alimento durante el recordatorio haya sido disruptor de la memoria aversiva.

En un experimento recíproco se probó de interferir con la memoria apetitiva, sin interferir con la aversiva. Para esto se utilizó el mismo protocolo de entrenamiento del experimento anterior. Al día siguiente, todos los animales fueron re-expuestos al contexto de entrenamiento y luego de 5 minutos recibieron una presentación del EVP. Se ha descrito que esto impide el proceso de labilización-reconsolidación de la memoria aversiva (Pedreira et al., 2004). Treinta minutos después de la re-exposición los animales recibieron una inyección de cicloheximida (45µg/animal). Al día siguiente, los animales fueron evaluados (Figura 17, página 83). Se observó retención de la memoria aversiva pero no de la memoria apetitiva para los grupos respectivos (Av vs NE:  $F_{1,156} = 2.33$ ,  $p < 0.05$ ; Ap vs NE:  $F_{1,156} = 1.24$ ,  $p = 0.22$ ), de acuerdo con las predicciones. En este caso, el grupo “mixto” mostró memoria aversiva pero no apetitiva (Mix vs Ap:  $F_{1,156} = 2.43$ ,  $p < 0.05$ ; Mix vs Av:  $F_{1,156} = 0.83$ ,  $p = 0.41$ ). Nuevamente se corrió en paralelo un par de grupos “no entrenado”-“apetitivo” que funcionaron como control de la memoria apetitiva y que el día del recordatorio recibieron inyección de salina en lugar de

cicloheximida. En este par de grupos observamos retención normal de la memoria apetitiva ( $t_{70}=2.06$ ,  $p < 0.05$ ) lo que indica que la falta de memoria apetitiva en los grupos "apetitivo" y "mixto" inyectados con CHX fue por un fenómeno de labialización e interferencia de la reconsolidación de esa memoria, y no por un entrenamiento apetitivo insuficiente o por interferencia del EVP durante el recordatorio. En conclusión, nuevamente una sola de las dos memorias fue interferida sin afectar la expresión de la otra.

En base a estos dos experimentos planteamos que se forman dos trazas distintas, que son independientes entre sí, ya que la modulación de una de ellas durante la reconsolidación no involucra la modulación de la otra.

Los resultados hasta aquí mostrados y las conclusiones obtenidas provienen del análisis de la media de cada grupo experimental, pero podrían tener como base dos fenómenos distintos si fuesen analizados a nivel individual. Por un lado, podrían existir los animales que sean “buenos aprendedores” que forman ambas asociaciones correctamente y animales “malos aprendedores” que tienen dificultad en ambas tareas. Por otro lado, podría ocurrir que existiera un sub grupo de animales que estuviera realizando solo la asociación apetitiva y otro subgrupo que hiciera solo la asociación aversiva. En ambos escenarios la media de los animales podría indicar retención de las dos memorias, sin embargo las interpretaciones en cuanto a la coexistencia de las dos memorias sería completamente distinta. Para discernir cuál de las dos opciones se ajusta mejor con la realidad, analizamos si existe una correlación entre la actividad exploratoria y la respuesta de escape en los experimentos donde los resultados indican retención de las dos memorias, lo que ocurrió en dos situaciones, bajo protocolos intermedios y altos. No observamos correlación alguna entre las dos variables en ninguno de los dos experimentos. (Correlación de Pearson. Entrenamiento intermedio:  $R^2 = 0.0002$ . Entrenamiento fuerte:  $R^2 = 0.0466$ ). Esto nos lleva a pensar que las dos asociaciones son realizadas en forma independiente, ya que individualmente los animales pueden mostrar una, ninguna o las dos memorias.

Con la intención de realizar una descripción más completa de la distribución de las dos memorias en los animales calculamos las probabilidades de que un animal muestre las dos memorias, una o ninguna. Para este análisis, tomamos como criterio para decir que un cangrejo muestra memoria apetitiva al hecho de que su actividad exploratoria en la sesión de evaluación supere el límite marcado por la media de los animales control sumado 1 error estándar. Por otro lado, consideramos que un animal muestra memoria aversiva cuando su respuesta de escape esté por debajo del límite que representa la media del grupo control, menos 1 error

estándar. De esta manera encontramos luego de los protocolos de fuerza intermedia que de todos los animales que muestran alguna memoria luego de un entrenamiento mixto, el 40,6% muestra ambas memorias, mientras que el 31,3% y el 28,1% muestra solo memoria apetitiva o aversiva respectivamente. Es importante notar que la mayor proporción de animales muestra ambas memorias lo que confirma que ambas memorias no son mutuamente excluyentes. Sin embargo, si tomamos el total de animales en el grupo mixto, el porcentaje que muestra memoria apetitiva fue del 57,5% y de memoria aversiva el 55%. Es interesante que el porcentaje de animales que muestra memoria apetitiva en el grupo apetitivo es 75% y el de animales que muestran memoria aversiva en el grupo aversivo es 70%. La comparación entre la proporción de animales que muestran cada una de las memorias en el grupo mixto respecto de los grupos entrenados simple demuestra que hay un cierto grado de interferencia entre ambas memorias.

Un perfil similar de distribución se obtuvo para el entrenamiento mixto cuando se usaron los protocolos de intensidad alta. De todos los animales que mostraron memoria en el grupo mixto, el 54,5% evidenciaron la expresión de ambas memorias, mientras que el 18,2% y el 27,3% mostró solamente memoria apetitiva o aversiva respectivamente. Por su parte, de todos los animales del grupo mixto, el 60% mostró memoria apetitiva y el 67,5% mostró memoria aversiva, mientras que las probabilidades de mostrar las memorias en los respectivos grupos de entrenamiento simple son 65% para el grupo apetitivo y del 72,5% para el grupo aversivo.

### *3.B.1.iii Las memorias compiten por el control del comportamiento durante la evocación*

He demostrado la existencia de dos trazas de memoria, que son formadas independientemente y que compiten entre sí. Esto último quedó demostrado en el experimento en donde los dos protocolos de entrenamiento son de baja intensidad o en los experimentos en los que un entrenamiento es alto y el otro intermedio. La pregunta que surge a partir de estos resultados es en qué fase de la memoria se está produciendo esta interferencia. Esta podría ocurrir durante: a) la adquisición, no estableciendo los animales ninguna asociación o solo una de ellas; b) durante la consolidación, por lo que se estabilizaría solo una memoria de largo término o ninguna de ellas, o c) durante la evocación. En este último caso se formarían las dos trazas y estas serían estables, aunque podrían no expresarse debido a una competencia entre ellas durante la evocación.

Para contestar si la interferencia se produce durante la evocación elegimos el entrenamiento que combina protocolos de baja intensidad, tras el cual ninguna de las dos memorias es evidente, y nos valimos de un protocolo de reconsolidación que fortalece la memoria. La predicción que se desprende es clara: si las memorias están realmente formadas y la interferencia es solo durante la evocación, entonces las mismas deberían poder ser fortalecidas durante una reconsolidación de modo tal que luego si sean expresadas.

Para fortalecer una memoria reactivada nos valimos un protocolo de reconsolidación con privación de agua. Se sabe que, en cangrejos, 2 horas de restricción de agua durante la fase de consolidación o reconsolidación tanto de la memoria apetitiva como de la aversiva fortalecen la traza, haciendo que se expresen memorias que están consolidadas pero no se expresan (Frenkel et al., 2005; Kaczer et al., 2011).

Realizamos entonces el siguiente experimento: en el primer día, un grupo de animales fue entrenado con los dos protocolos de baja intensidad (40 mg de alimento y 10 ensayos del EVP); otro grupo solamente con el protocolo apetitivo, otro con el aversivo y el grupo restante permaneció en el contexto sin recibir ningún entrenamiento. En el segundo día de experimento todos los animales fueron re-expuestos al contexto de entrenamiento y, luego de 5 minutos recibieron un ensayo aversivo con el EVP. Después de esto los animales fueron colocados en los contenedores individuales, pero que en este caso no contenían agua. Dos horas más tarde, se les agregó agua a los mismos. Un día más tarde se evaluó la retención de ambas memorias (Figura 18a, página 84). Como era de esperar en base a nuestro resultado previo, tanto el grupo “apetitivo” como el “aversivo” mostraron su respectiva memoria (Ap vs NE:  $F_{1,156} = 2.14$ ,  $p < 0.05$ ; Av vs NE:  $F_{1,156} = 2.61$ ,  $p < 0.01$ ). Al analizar el desempeño del grupo “mixto” vemos que muestra retención de la memoria apetitiva, pero no muestra memoria aversiva (Mix vs Av:  $F_{1,156} = 2.21$ ,  $p < 0.05$ ; Mix vs Ap:  $F_{1,156} = 0.25$ ,  $p = 0.80$ ). Esto nos indica que la memoria apetitiva si estaba presente al momento de la re-exposición, por más que no se expresara. Es por esto que, labilizando la misma y fortaleciéndola durante la reconsolidación es que pudo ponerse de manifiesto en el día de la evaluación.

En un experimento recíproco, los animales fueron entrenados de la misma manera, pero en el día 2 del experimento, luego de ser re-expuestos 5 minutos al contexto, recibieron 20 mg de alimento que pudieron comer durante otros 5 minutos. Al igual que en el experimento anterior, los animales fueron sometidos a la privación de agua por 2 horas luego de la re-exposición al contexto (Figura 18b, página 84). En el día de la evaluación se observó que los animales entrenados de forma apetitiva y los entrenados de forma aversiva

muestran retención de su respectiva memoria (Ap vs NE:  $F_{1,152} = 2.58$ ,  $p < 0.05$ ; Av vs NE:  $F_{1,152} = 4.40$ ,  $p < 0.001$ ). En este caso, el grupo entrenado de forma mixta muestra retención de la memoria aversiva pero no de la memoria apetitiva (Mix vs Ap:  $F_{1,152} = 3.51$ ,  $p < 0.001$ ; Mix vs Av:  $F_{1,152} = 0.96$ ,  $p = 0.34$ ). Esto demuestra que la memoria aversiva estaba presente al momento del recordatorio, pudiendo entonces ser activada, labilizada y fortalecida durante la reconsolidación.

Los resultados de los últimos dos experimentos prueban que las memorias se interfieren mutuamente la evocación, ya que quedó en evidencia que ambas están presentes en el momento de la re-exposición y por eso pudieron ser fortalecidas. En el caso de que las dos trazas sean fuertes, creemos que la misma interferencia existe, pero dado que ambas memorias están por encima de un “umbral de expresión” estas logran ponerse de manifiesto. En el caso en el que una memoria sea más fuerte que la otra, esta interferiría a la otra en mayor medida, por lo que la memoria más débil no es expresada. La interferencia que la memoria débil produce sobre la más fuerte no alcanza para que ésta no se exprese. En cambio, en el caso de que las memorias sean débiles, y estén apenas por encima de ese umbral, la interferencia producida por la otra memoria hace que no se exprese, siendo esta interferencia mutua. En la próxima sección analizamos cómo el estado interno de los animales afecta la expresión de la memoria.

#### *3.B.1.iv El estado motivacional de los animales modula la expresión de la memoria*

Hasta este momento vimos como la fuerza de los entrenamientos, determina la fuerza de las memorias que influyen en la posterior expresión de las memorias formadas, y como éstas se interfieren mutuamente durante su evocación. Esta condición es impuesta a los animales, ya que depende del entrenamiento que recibieron. Ahora nos preguntamos cómo una clave interna afecta la expresión de ambas memorias y en qué medida puede modificar el balance entre ambas memorias y la toma de decisión. En este caso, analizamos si el estado motivacional, determinado por el nivel de hambre de los cangrejos, puede modular la expresión de una memoria y del balance de fuerza entre memorias apetitivas y aversiva. En moscas, se sabe que los animales deben estar hambreados para formar y expresar una memoria apetitiva (Krashes and Waddell, 2008). Nuestra experiencia en el laboratorio nos indica que, de la misma manera, si los animales no están suficientemente hambreados, el protocolo de condicionamiento apetitivo no tiene éxito.



Para analizar si el estado de saciedad de los animales influye en la expresión de la memoria realizamos el siguiente experimento. En el primer día entrenamos a los animales del grupo “mixto” combinando un protocolo de entrenamiento apetitivo alto (160 mg alimento) y un protocolo aversivo intermedio (15 presentaciones del EVP). Asimismo, contamos con un grupo no entrenado, un grupo entrenado exclusivamente con el protocolo aversivo intermedio y otro entrenado con el protocolo apetitivo alto. Al día siguiente, todos los animales recibieron 320mg de alimento en su contenedor individual (lo que representa el doble que lo que reciben en el entrenamiento alto). El mismo pudo ser ingerido durante 1 hora. Cinco horas luego de retirar el alimento los animales fueron colocados en el contexto de entrenamiento y evaluados (Figura 19, página 85). El grupo “aversivo” mostró retención de la memoria (Av vs NE:  $F_{1,145} = 2.95$ ,  $p < 0.01$ ), pero el grupo “apetitivo” no evidenció retención de la memoria apetitiva (Ap vs NE:  $F_{1,145} = 0.19$ ,  $p = 0.85$ ). Esto demuestra que, al igual que en el modelo de *Drosophila*, si los cangrejos están saciados no expresan la memoria apetitiva. Cuando analizamos al grupo “mixto”, vemos que este tampoco muestra retención de la memoria apetitiva (Mix vs Av:  $F_{1,145} = 1.11$ ,  $p = 0.27$ ). Más importante aún, es que cuando analizamos la memoria aversiva, vemos que este grupo si expresa la memoria aversiva (Mix vs Ap:  $F_{1,145} = 1.99$ ,  $p < 0.05$ ). Esto es relevante, ya que antes habíamos demostrado que, a partir de estas condiciones de entrenamiento, se expresaba la memoria apetitiva pero no la aversiva.

Este resultado apoya la hipótesis que postula que ambas memorias están presentes aunque no se expresen y además demuestra que la expresión de la memoria no solamente depende de una condición impuesta como es el balance de fuerzas entre estímulos incondicionados, sino que también se modula por el estado motivacional de los animales. Esto representa un gran valor adaptativo para los animales, ya que la memoria expresada está en relación tanto con las condiciones de aprendizaje como con el estado de los animales al momento de la evocación. El estado motivacional de los animales ha sido demostrado que afecta la capacidad de expresar una memoria apetitiva en *Drosophila* (Krashes et al., 2009). Se observó que el neuropéptido F (dNPF), que se libera cuando los animales tienen hambre, remueve una inhibición tónica que hace que la memoria apetitiva no se exprese. Es decir, cuando los animales comen, disminuye la liberación de dNPF, por lo que se produce la expresión de la memoria. Resulta muy interesante en el contexto de esta tesis que las neuronas que se ubican río abajo de las neuronas dNPF, y que inhiben la expresión de la memoria apetitiva sean dopaminérgicas.

### 3.B.2 Mosca *Drosophila melanogaster*

#### 3.B.2.i La memoria evocada depende del balance entre la fuerza de los entrenamientos

Los experimentos aquí mostrados fueron realizados en el laboratorio liderado por Scott Waddell, en el Centre for Neural Circuits and Behaviour (CNCB), dependiente de la Universidad de Oxford, en el marco de una pasantía financiada por la Universidad de Buenos Aires y el laboratorio Boehringer Ingelheim. Los experimentos fueron llevados a cabo en su totalidad por mí, pero no habrían sido posibles sin la guía de Gaurav Das, la discusión de los diseños experimentales y de resultados con Emmanuel Perisse, Wolf Huetteroth, Johannes Felsenberg, Suewei Lin y Fernando Locatelli, además de la contribución invaluable de Scott Waddell

Así como analizamos si los cangrejos podían asociar un mismo CS con dos US opuestos y simultáneos, en esta sección me propuse hacer lo mismo utilizando el modelo de *Drosophila*. Es importante hacer algunas consideraciones metodológicas relacionadas con este modelo. Antes mostré cómo los cangrejos pueden evidenciar las dos memorias en una misma sesión de evaluación y de forma casi simultánea, y que esto se debe a que los comportamientos mediante los cuales se expresan ambas memorias no son mutuamente excluyentes. Sin embargo, para los experimentos de moscas utilicé un laberinto en T, en el que en la fase de entrenamiento los animales asocian un olor (CS+) a un determinado US y otro olor (CS-) a la ausencia del US. En la sesión de evaluación se le presenta a los animales ambos olores: si los animales formaron una memoria apetitiva se aproximarán al CS+, mientras que si la memoria formada fue aversiva los animales se alejarán del CS+, lo que resulta en una aproximación al CS-. Es evidente que, teniendo en cuenta esta opción dicotómica, el paradigma no puede poner en evidencia si un mismo olor fue asociado a un estímulo positivo y a un estímulo negativo a la vez. Se podría esperar que los animales que hayan realizado ambas asociaciones tendrán una distribución balanceada entre los dos brazos del laberinto, pero esto es lo mismo que se observa para animales no entrenados. Por lo tanto es difícil discriminar, si los animales entrenados no muestran preferencia ni aversión por el olor entrenado, porque las dos memorias compiten o porque en definitiva no se formó ninguna memoria.

En el primer experimento utilicé 5 grupos experimentales, que fueron entrenados con una solución de sacarosa 1M y DEET, siendo la diferencia entre los grupos la concentración utilizada de esta última sustancia (0; 0,1; 0,2; 0,4 y 0,6%). En la evaluación realizada 3 minutos luego del entrenamiento analizamos la distribución de los animales en los dos brazos del laberinto (Figura 20, página 86). Vemos diferencias

significativas entre los grupos (ANOVA,  $F_{4,51} = 37,36$ ,  $p < 0.001$ ). Los Índices de Preferencia (IP) positivos revelan la expresión de una memoria apetitiva mientras que los IP negativos revelan memoria aversiva. Vemos que, si bien los animales entrenados con una solución de sacarosa 1M muestran una clara preferencia por el CS+, ésta va decayendo hasta transformarse en aversión en el grupo de 1M + 0,6% DEET. El grupo sacarosa 1M presenta diferencias significativas con el grupo 1M + 0,2% DEET ( $p < 0,05$ ) y con los grupo 1 + 0,4% DEET y 1M + 0,6% DEET ( $p < 0,001$ ); el grupo 1M + 0,1% DEET presenta diferencias significativas con el grupo 1M + 0,4% DEET ( $p < 0,01$ ) y 1M + 0,6% DEET ( $p < 0,001$ ); además de las diferencias mencionadas, los grupos 1M + 0,2% DEET y 1M + 0,4% DEET muestran diferencias significativas con el grupo 1M + 0,6% DEET ( $p < 0,001$ ). Este experimento demuestra entonces que, pocos minutos después del entrenamiento los animales muestran una preferencia o aversión por el CS+ que depende del balance entre los componentes aversivos y apetitivos del US.

Es notable haber encontrado, en otro modelo animal, y con estímulos de distinta modalidad sensorial, un resultado similar al que hemos obtenido con cangrejos respecto al efecto del balance de los estímulos

### *3.B.2.ii Luego del entrenamiento se generan dos trazas mnésicas en paralelo*

En el experimento anterior, resulta interesante analizar el desempeño del grupo entrenado con 1M + 0,4% DEET. Estos animales podrían haber formado las dos asociaciones, o por el contrario ambas podrían haberse visto impedidas. Como mencioné antes, a partir de este ensayo comportamental no es posible diferenciar entre estas alternativas. Mediante un razonamiento similar, nos podríamos preguntar si los animales que muestran un IP positivo después de haber sido entrenados con alguna concentración menor de DEET también habían formado una memoria aversiva, viéndose eclipsada ésta por una memoria apetitiva más fuerte y también si el grupo que muestra un IP negativo había formado una memoria apetitiva, eclipsada en este caso por la memoria aversiva. Teniendo en cuenta estas posibilidades decidí hacer el siguiente experimento.

Tomé cinco grupos de moscas *wild type* y las entrené utilizando 1M + 0,6% DEET. A distintos tiempos después del entrenamiento se evaluó la respuesta de los animales ante la presentación del CS+ y del CS- (Figura 21, página 87), encontrando diferencias significativas entre los grupos (ANOVA de una vía:  $F_{4,49}=18,16$ ;

$p < 0,001$ ). Como podemos ver, la aversión que se había observado en el experimento anterior a 3 minutos se vuelve a evidenciar, pero luego se transforma en preferencia, que dura desde 30 minutos luego del entrenamiento hasta por al menos un día. El grupo evaluado a 3 minutos presenta diferencias significativas con el resto de los grupos evaluados a otros tiempos ( $p < 0,001$ ); y el resto de esos grupos no presenta diferencias significativas entre sí. Este resultado sugiere que los animales entrenados con un US mixto pueden en realidad asociar ambos componentes opuestos con el CS. Inmediatamente se expresa la asociación aversiva y, más adelante en el tiempo se expresa la apetitiva. Al igual que en los experimentos en cangrejos, a partir de un entrenamiento mixto los animales aprenden que un mismo CS está relacionado con dos US distintos. En este caso, debido a las características del paradigma utilizado, las dos memorias no pueden expresarse en forma simultánea sino que lo hacen de manera secuencial, lo que nos permite revelar ambos aprendizajes.

Si bien podrían existir otras, la explicación más parsimoniosa que encontramos para explicar este resultado es que los animales forman dos memorias en paralelo, que debido a la diferencia en la persistencia de cada una se expresan en distintos momentos. De forma inmediata se evidencia la memoria aversiva y luego lo hace la memoria apetitiva. Esto coincide con la literatura, ya que se sabe que, en moscas, los protocolos aversivos necesitan de ensayos múltiples para generar memorias que se expresen a largo término, mientras que en el caso apetitivo un único ensayo resulta suficiente (Krashes and Waddell, 2011a, 2011b). Otra alternativa que considera también la formación de dos memorias, es que la expresión dependa de la motivación del animal, tal como indican los experimentos en cangrejos. Inmediatamente después del entrenamiento el animal es más selectivo respecto de la calidad de la recompensa, pero conforme pasa el tiempo tiene más hambre y se vuelve más tolerante a una recompensa menos palatable.

Al igual que en *Neohelice*, este resultado apunta a que la interferencia entre las memorias se produce durante la evocación de las mismas y no durante su formación o consolidación, ya que en caso de que esto estuviera ocurriendo no se vería la inversión en la respuesta comportamental. El hecho de que primero se exprese una memoria y luego la otra evidencia que, por más que no se estuviera expresando, la memoria que vemos en segundo orden estaba presente desde el inicio. Este resultado es coincidente con resultados posteriores utilizando un condicionamiento virtual en el que se asoció la presentación de un olor con la activación optogenética simultánea de las neuronas que señalizan el refuerzo positivo y el refuerzo negativo.

En dicho caso se observó que a corto término se expresa una memoria aversiva mientras que a largo término lo hace la memoria apetitiva (Aso and Rubin, 2016).

### *3.B.2.iii Dos circuitos neuronales distintos subyacen a las dos memorias*

A partir de una batería de herramientas genéticas, *Drosophila* permite hacer un análisis exhaustivo de los circuitos que subyacen a distintos comportamientos. Me propuse entonces disecar los circuitos involucrados en la formación de estas dos memorias.

Como expliqué anteriormente, se sabe que en la vía del procesamiento de la señal del azúcar están involucrados un grupo de neuronas de OA y un grupo de neuronas de DA, situadas estas últimas en el clúster PAM (Burke et al., 2012). Por otro lado, se sabe que las neuronas que señalizan al refuerzo negativo relacionado con el calor y con la elevada temperatura son dopaminérgicas, y están localizadas en el clúster PPL1 (Claridge-Chang et al., 2009; Galili et al., 2014). Me propuse evaluar en qué medida el comportamiento observado está relacionado con la actividad de estos tres tipos neuronales.

Como se puede ver en la figura 20 (página 86), existe una determinada combinación de DEET y sacarosa para la cual los animales no muestren preferencia ni rechazo. Por los resultados que le siguieron a ese experimento podemos suponer que en realidad las dos memorias se forman pero compiten por el control del comportamiento. Cabe preguntarse entonces, ¿Qué ocurre cuando no está presente el componente apetitivo que es señalado por OA? Para contestar esta pregunta realicé un experimento que constó de 3 grupos experimentales: animales *wild type* entrenados con sacarosa 1M + DEET 0.4%, animales *wild type* entrenados con sacarosa 1M + DEET 0,1% y animales *tbh*<sup>M118</sup> entrenados con sacarosa 1M + DEET 0,4% (Figura 22, página 88). Al igual que vimos anteriormente, los animales *wild type* muestran un índice positivo o negativo, dependiendo de la concentración de DEET presente en la solución. Como podemos ver, las moscas *tbh*<sup>M118</sup> entrenadas con 0,1% de DEET no presentan un comportamiento significativamente distinto al de las moscas WT entrenadas con 0,4% de DEET, pero sí con las entrenadas con 0,1% de DEET (ANOVA:  $F_{2,30} = 13,52$   $p < 0,001$ ; contrastes Tukey: WT 0,1% vs *tbh* 0,1%:  $p < 0,001$ ; WT 0,4% vs *tbh* 0,1%:  $p = 0,99$ ). Esto muestra que, sin el componente apetitivo señalado por OA, un estímulo que hacía que se expresara una memoria apetitiva, provoca ahora la expresión de una memoria aversiva.

En un siguiente paso quise saber cómo se modifica la memoria inmediata debido a la inhibición de parte de los circuitos responsables de la señalización de los estímulos apetitivos y aversivos. Las líneas de moscas utilizadas fueron elegidas en base a la bibliografía que indica que la línea GAL4-0104 se expresa en un grupo de neuronas dopaminérgicas del clúster PAM, que son necesarias y suficientes para generar una memoria apetitiva de corto término (Burke et al., 2012) y que la línea GAL4-C061 se expresa en un grupo de neuronas del clúster PPL1, necesarias y suficientes para generar una memoria aversiva (Claridge-Chang et al., 2009). Estas líneas fueron cruzadas con líneas *shibire*<sup>ts1</sup>-UAS. *Shibire* es un gen cuyo producto está involucrado en el reciclado de vesículas en la sinapsis, y la deficiencia en el mismo produce un déficit en la transmisión sináptica (van der Bliek and Meyerowitz, 1991; Damke et al., 1994). La variante *shi*<sup>ts1</sup> es termosensible, por lo que la transmisión sináptica se ve interrumpida a temperaturas superiores a 25°C (Kitamoto, 2001).

Realizamos un experimento con cada una de estas cruza. La lógica fue la misma para ambos: a partir de un entrenamiento cuyas condiciones no permitieran evidenciar retención de ninguna memoria cuando ésta es evaluada de forma inmediata (en este caso sacarosa 1M + 0,3% DEET), inhibimos las neuronas señalizadoras del refuerzo apetitivo o aversivo alternadamente. Esto se logró exponiendo a las moscas a una temperatura de 33°C durante la media hora anterior al entrenamiento.

En el primer experimento (Figura 23, página 89), utilizando moscas 0104-GAL4; UAS-*shi*<sup>ts1</sup> vemos diferencias significativas de parte del grupo experimental con los 3 grupos control: moscas WT, 0104-GAL4 y UAS-*shi*<sup>ts1</sup> (ANOVA:  $F_{3,63} = 5,58$ ,  $p < 0,01$ ; contrastes Tukey 0104-GAL4 vs todos los controles  $p < 0,01$ , el resto de las comparaciones  $p = 0,99$ ). Esto una vez más nos muestra la competencia entre las dos memorias, en este caso la “dulce” y la aversiva, y cómo removiendo la componente apetitiva podemos ver como emerge la memoria aversiva. Se realizó un experimento independiente como control adicional: se entrenaron animales de las mismas líneas con una solución sacarosa 1M + 0,3% DEET pero a una temperatura de 23°C. En este caso, no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos (ANOVA de una vía:  $F_{3,40} = 0,14$ ,  $p = 0,93$ ).

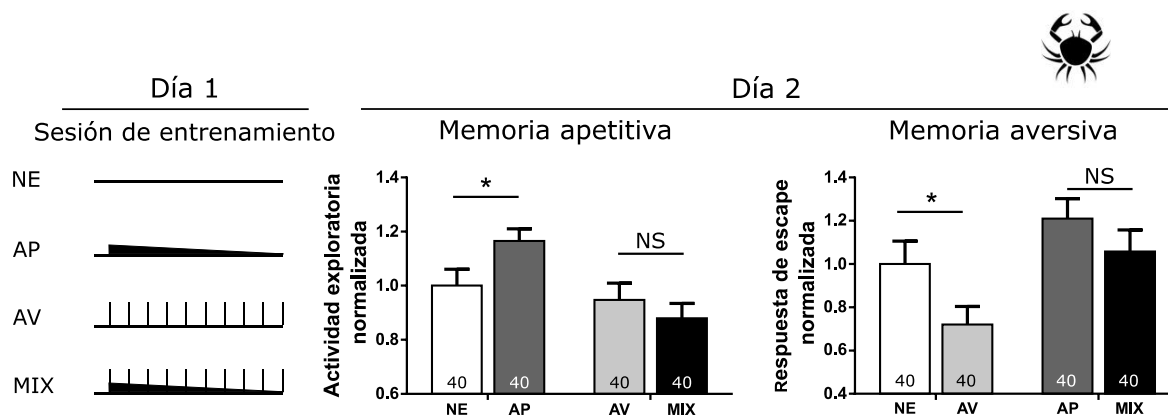
En el segundo experimento (Figura 24, página 90) utilicé la línea C061-GAL4; UAS-*shi*<sup>ts1</sup> y vi nuevamente diferencias entre el grupo experimental y los tres grupos control (ANOVA:  $F_{3,72} = 10,03$ ,  $p < 0,001$ ; contrastes Tukey C061-GAL4 vs todos los controles  $p < 0,01$ , el resto de las comparaciones  $p > 0,49$ ). En este caso vemos como al remover la señalización de la componente aversiva del entrenamiento emerge la memoria apetitiva.

Nuevamente, en el experimento control realizado a la temperatura permisiva de 23°C no se observan diferencias entre los grupos (ANOVA de una vía:  $F_{3,40} = 0,23$ ,  $p=0,87$ ).

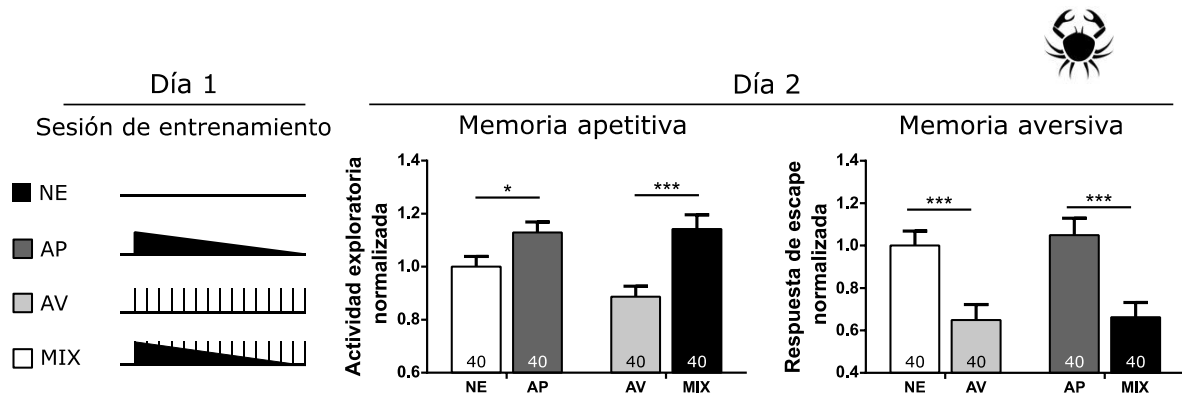
En resumen, en esta sección pude modular distintas partes de los circuitos relacionados con la formación de las memorias apetitivas y aversivas, y observamos como esto modifica el comportamiento. Vimos que, inhibiendo las neuronas asociadas con la señalización de los refuerzos positivos y negativos en una situación en la que no se evidencia retención de ninguna memoria, emerge la memoria de signo opuesto a las neuronas inhibidas. Incluso se puede modificar el signo de la memoria observada al inhibir uno de los componentes que señalizan los estímulos.

## Figuras de la sección 3.B

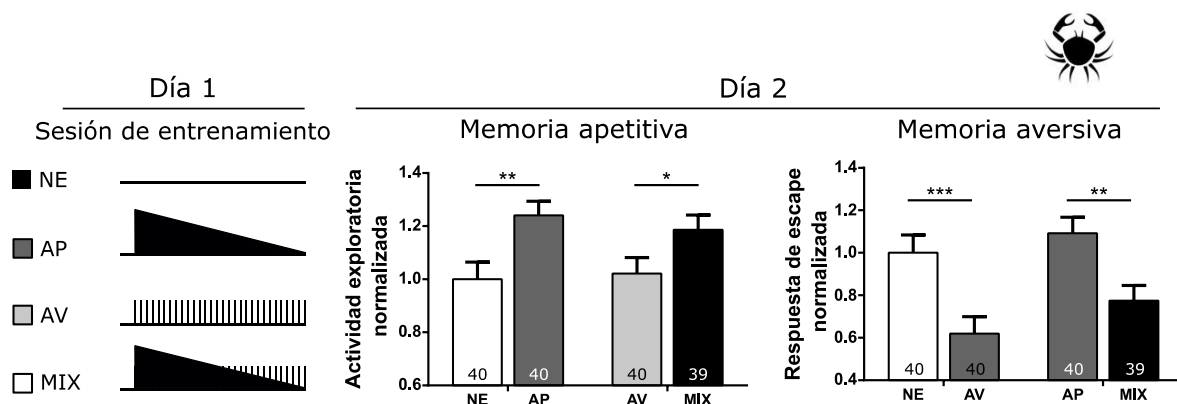




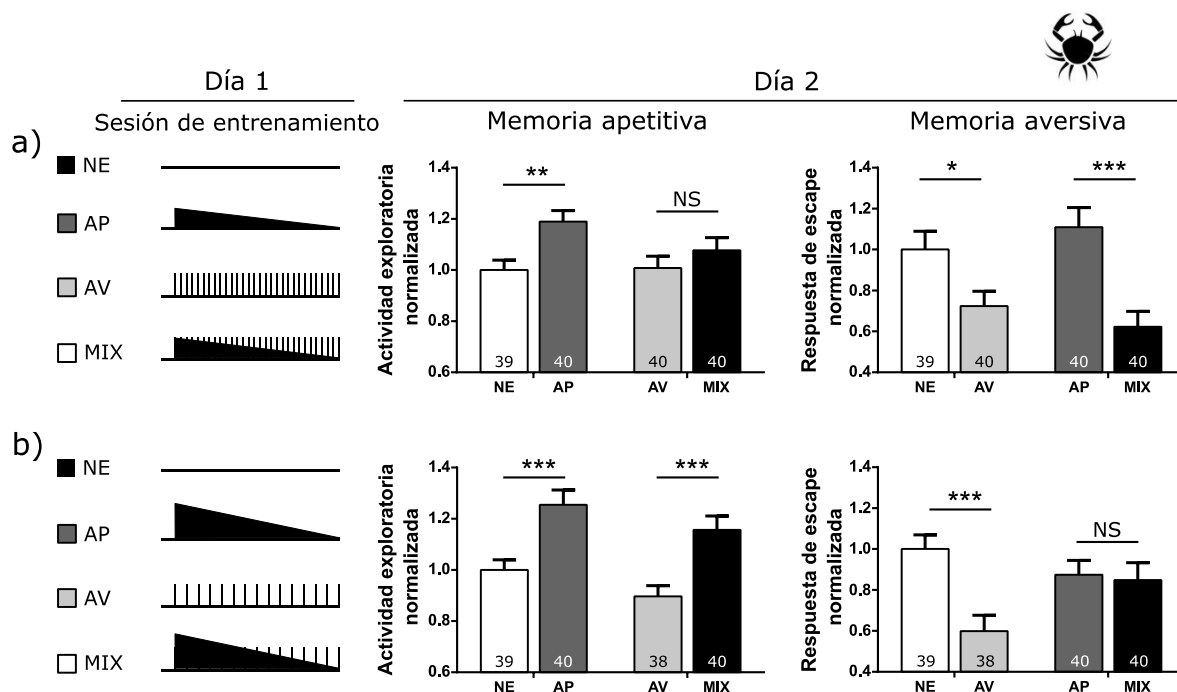
**Figura 12. Dos entrenamientos de valencia opuesta y de baja intensidad muestran interacción supresora tal que no se evidencia memoria de largo término.** Día 1: sesión de entrenamiento. El tamaño del triángulo representa la cantidad de comida recibida durante el entrenamiento, mientras que cada barra vertical representa un ensayo aversivo. NE, grupo no entrenado, que permanece en el contexto durante 50 minutos. AP, grupo apetitivo, que recibe un pellet de 40mg. AV, grupo aversivo que recibe 10 ensayos del EVP. MIX, grupo mixto, que recibe un pellet de 40mg y 10 ensayos del EVP. Día 2: sesión de evaluación. Memoria apetitiva: Actividad exploratoria media normalizada al promedio del grupo NE +/- error estándar. Memoria aversiva: respuesta media de escape normalizada al promedio de la respuesta del grupo NE +/- error estándar. Las barras blancas pertenecen al grupo NE, gris oscuro al grupo apetitivo, gris claro al grupo aversivo y las negras al grupo MIX. El número de animales se indica para cada barra. (\*)  $p < 0,05$ , NS diferencias no significativas en contrastes LSD entre el grupo señalado y su respectivo control en contrastes LSD entre el grupo señalado y su respectivo control.



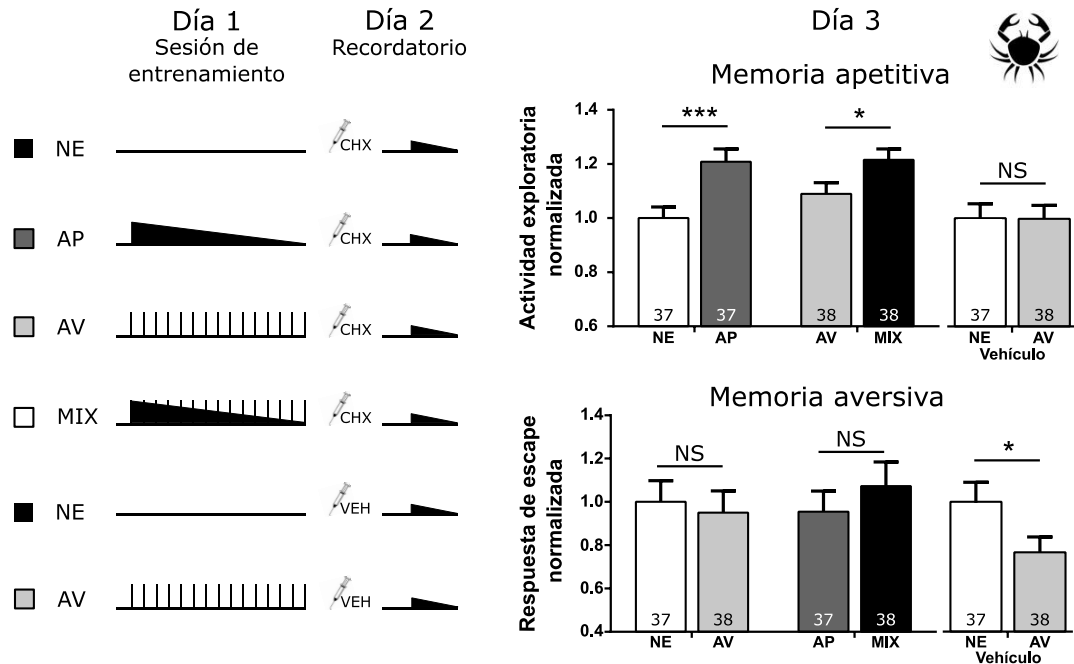
**Figura 13. Dos entrenamientos de valencia opuestas pero intensidad intermedia permiten evidenciar ambas memorias de largo término.** Día 1: sesión de entrenamiento. NE, grupo no entrenado que permanece en el contexto durante 50 minutos. AP, grupo apetitivo, que recibe un pellet de 80mg. AV, grupo aversivo que recibe 10 ensayos del EVP. MIX, grupo mixto que recibe un pellet de 80mg y 15 ensayos del EVP. Día 2: sesión de evaluación. Memoria apetitiva: Actividad exploratoria media normalizada al promedio del grupo NE +/- error estándar. Memoria aversiva: respuesta media de escape normalizada al promedio del grupo NE +/- error estándar. Las barras blancas pertenecen al grupo NE, gris oscuro al grupo apetitivo, gris claro al grupo aversivo y las negras al grupo MIX. El número de animales se indica para cada barra. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  en contrastes LSD entre el grupo señalado y su respectivo control.



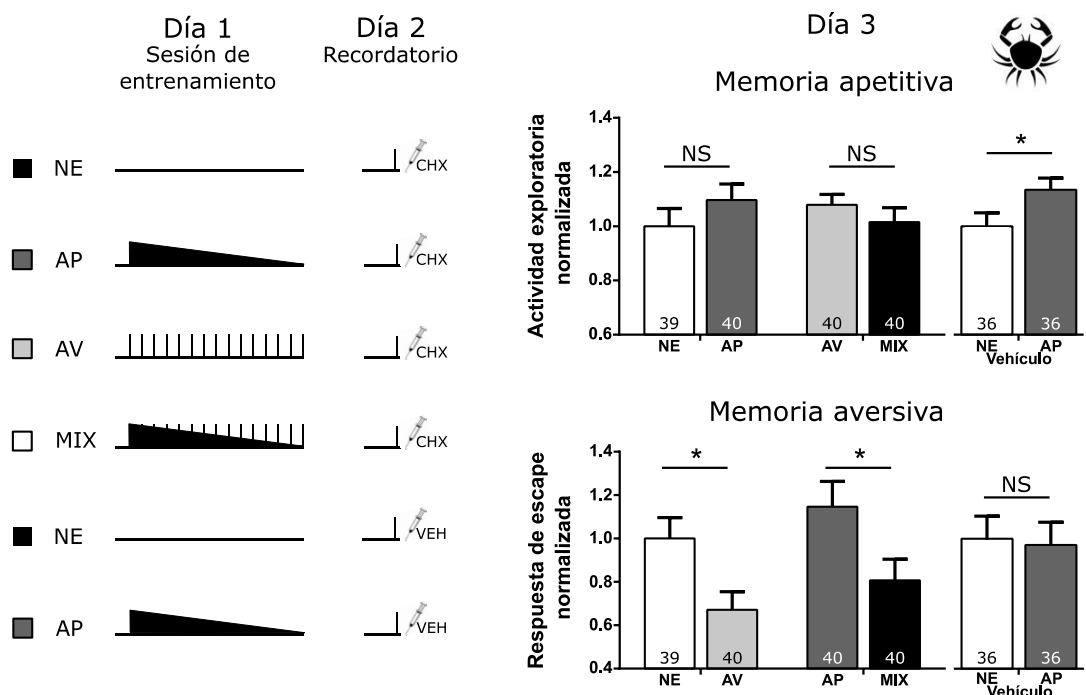
**Figura 14. Dos entrenamientos de valencia opuesta pero de intensidad alta permiten evidenciar ambas memorias de largo término.** Día 1: sesión de entrenamiento. NE, grupo no entrenado que permanece en el contexto durante 50 minutos. AP, grupo apetitivo que recibe un pellet de 160mg. AV, grupo aversivo que recibe 30 ensayos. MIX, grupo mixto que recibe un pellet de 160mg y 30 ensayos del EVP. Día 2: sesión de evaluación. Memoria apetitiva: Actividad exploratoria media normalizada al promedio del grupo NE +/- error estándar. Memoria aversiva: respuesta media de escape normalizada al promedio del grupo NE +/- error estándar. Las barras blancas pertenecen al grupo NE, gris oscuro al grupo apetitivo, gris claro al grupo aversivo y las negras al grupo MIX. El número de animales se indica para cada barra. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  en contrastes LSD entre el grupo señalado y su respectivo control.



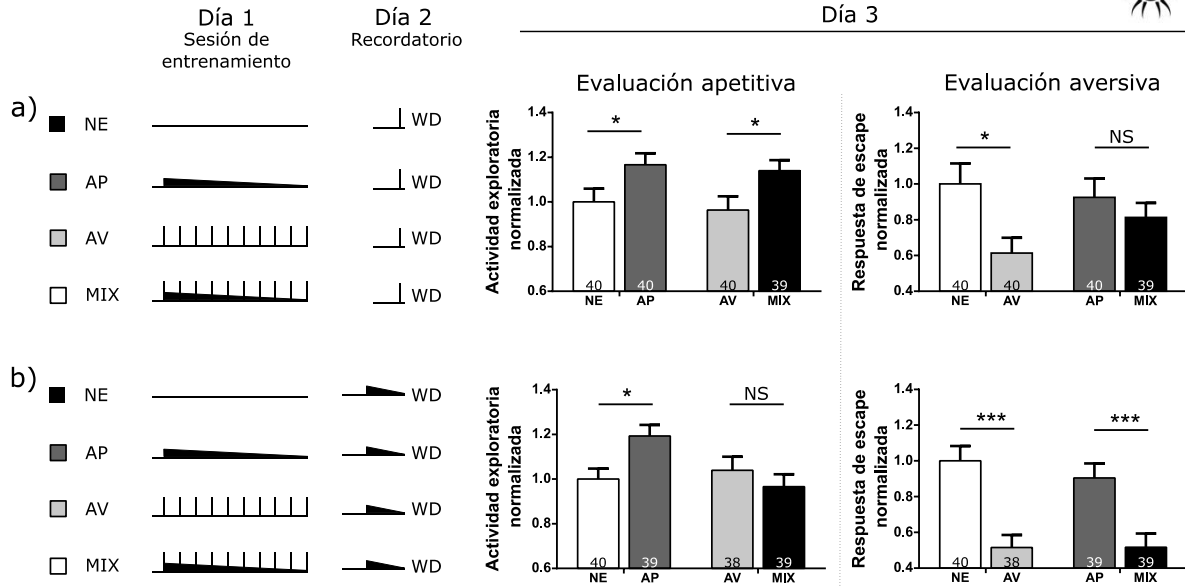
**Figura 15. Dos entrenamientos de intensidad no balanceada permiten evidenciar una sola memoria de largo término.** Día 1: sesión de entrenamiento. a) NE, grupo no entrenado que permanece en el contexto durante 50 minutos. AP, grupo apetitivo que recibe un pellet de 80mg; AV, grupo aversivo que recibe 30 ensayos; MIX, grupo mixto que recibe un pellet de 80mg y 30 ensayos. b) NE, grupo no entrenado que permanece en el contexto durante 50 minutos. AP, grupo apetitivo que recibe un pellet de 160mg; AV, grupo aversivo que recibe 15 ensayos; MIX, grupo mixto que recibe un pellet de 160mg y 15 ensayos. Día 2: sesión de evaluación. Memoria apetitiva: Actividad exploratoria media normalizada al grupo NE +/- error estándar. Memoria aversiva: respuesta media de escape normalizada al grupo NE +/- error estándar. Las barras blancas pertenecen al grupo NE, las barras gris oscuro al grupo apetitivo, las gris claro al grupo aversivo y las negras grupo MIX. El número de animales se indica para cada barra. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; NS diferencias no significativas en contrastes LSD entre el grupo señalado y su respectivo control.



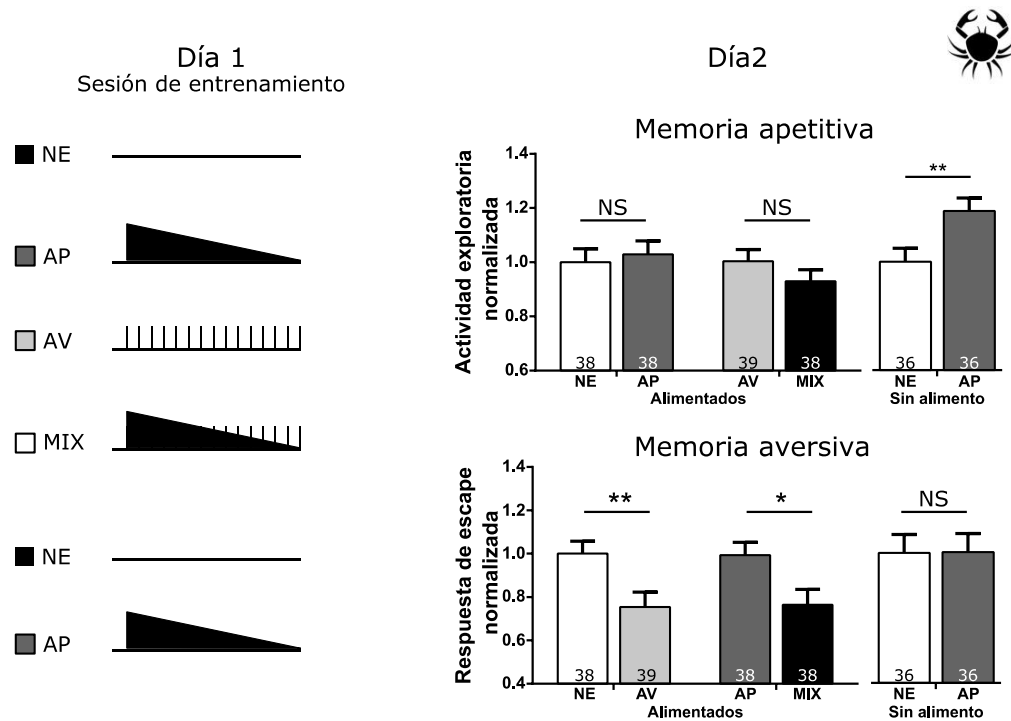
**Figura 16. Interrumpir la reconsolidación de la memoria aversiva no afecta la memoria apetitiva después de un entrenamiento mixto.** Día 1: sesión de entrenamiento. NE, grupo no entrenado que permanece en el contexto durante 50 minutos. AP, grupo apetitivo que recibe un pellet de 80mg. AV, grupo aversivo que recibe 15 ensayos. MIX, grupo mixto que recibe un pellet de 80mg y 15 ensayos del EVP. Día 2: sesión de recordatorio. Todos los animales reciben una inyección de vehículo o cicloheximida y 30 minutos después son re-expuestos al contexto de entrenamiento, en donde luego de 5 minutos reciben un pellet de 20mg. Cinco minutos después son retirados del mismo. Día 3: sesión de evaluación. Memoria apetitiva: Actividad exploratoria media normalizada al promedio del grupo NE +/- error estándar. Memoria aversiva: respuesta media de escape normalizada al promedio del grupo NE +/- error estándar. Las barras blancas pertenecen al grupo NE, gris oscuro al grupo apetitivo, gris claro al grupo aversivo y las negras al grupo MIX. El número de animales se indica para cada barra. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; en contrastes LSD entre el grupo señalado y su respectivo control.



**Figura 17. Interrumpir la reconsolidación de la memoria apetitiva no afecta la memoria aversiva después de un entrenamiento mixto.** Día 1: sesión de entrenamiento. NE, grupo no entrenado que permanece en el contexto durante 50 minutos. AP, grupo apetitivo que recibe un pellet de 80mg. AV, grupo aversivo que recibe 15 ensayos. MIX, grupo mixto que recibe un pellet de 80mg y 15 ensayos. Día 2: sesión de recordatorio. Todos los animales son re-expuestos al contexto de entrenamiento, en donde, luego de 5 minutos reciben un ensayo de EVP y son retirados del mismo. Treinta minutos después reciben una inyección de vehículo o cicloheximida. Día 3: sesión de evaluación. Memoria apetitiva: Actividad exploratoria media normalizada al promedio del grupo NE +/- error estándar. Memoria aversiva: respuesta media de escape normalizada al grupo NE +/- error estándar. Las barras blancas pertenecen al grupo NE, gris oscuro al grupo apetitivo, gris claro al grupo aversivo y las negras al grupo MIX. El número de animales se indica para cada barra. \*  $p < 0,05$  en contrastes LSD entre el grupo señalado y su respectivo control.



**Figura 18. Luego de un entrenamiento mixto de intensidad baja se forman dos memorias cuya expresión se interfiere mutuamente.** Día 1: sesión de entrenamiento. NE, grupo no entrenado que permanece en el contexto durante 50 minutos. AP, grupo apetitivo que recibe un pellet de 40mg. AV, grupo aversivo que recibe 10 ensayos del EVP. MIX, grupo mixto que recibe un pellet de 40mg y 10 ensayos del EVP. Día 2: sesión de recordatorio. Todos los animales son reexpuestos al contexto de entrenamiento, en donde, luego de 5 minutos reciben un ensayo y son retirados del mismo (a) o reciben un pellet de 20mg, permanecen 5 minutos más y luego son retirados (b). Durante 2 horas los animales son privados de agua (WD). Día 3: sesión de evaluación. Memoria apetitiva: Actividad exploratoria media normalizada al promedio del grupo NE +/- error estándar. Memoria aversiva: respuesta media de escape normalizada al promedio del grupo NE +/- error estándar. Las barras blancas pertenecen al grupo NE, las barras gris oscuro al grupo apetitivo, las gris claro al grupo aversivo y las negras al grupo MIX. El número de animales se indica para cada barra. \*  $p < 0,05$  en contrastes LSD entre el grupo señalado y su respectivo control.



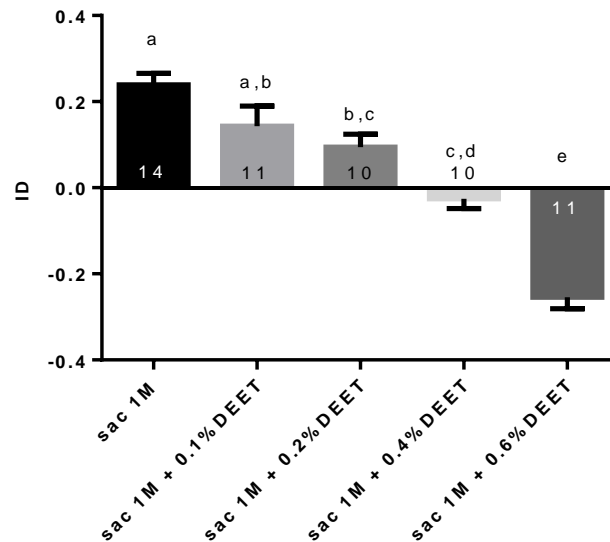
**Figura 19. La expresión de las memorias depende del estado motivacional de los animales.** Día 1: sesión de entrenamiento. NE, grupo no entrenado que permanece en el contexto durante 50 minutos. AP, grupo apetitivo que recibe un pellet de 160mg. AV, grupo aversivo que recibe 15 ensayos. MIX, grupo mixto que recibe un pellet de 160mg y 15 ensayos. Día 2: 6 hs antes de la evaluación, los animales que se indican reciben 320mg de comida. Memoria apetitiva: Actividad exploratoria media normalizada al promedio del grupo NE +/- error estándar. Memoria aversiva: respuesta media de escape normalizada al promedio del grupo NE +/- error estándar. Las barras negras pertenecen al grupo NE, gris oscuro al grupo apetitivo, gris claro al grupo aversivo y las blancas al grupo MIX. El número de animales en cada grupo se indica para cada barra. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  en contrastes LSD entre el grupo señalado y su respectivo control.



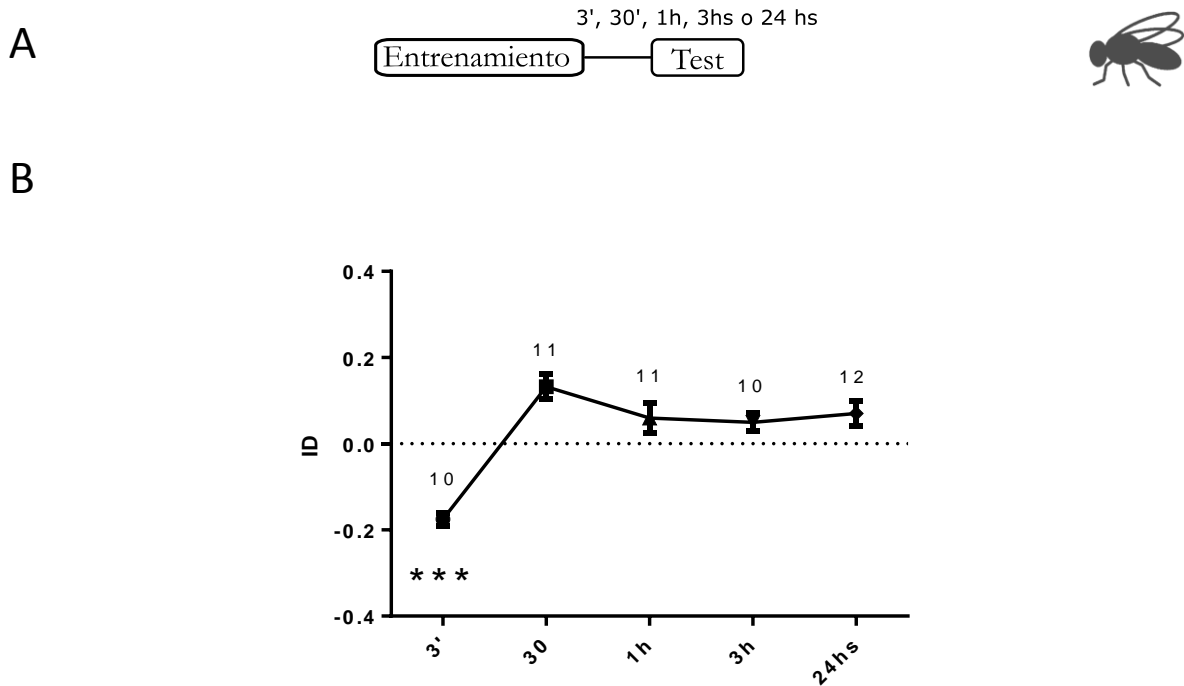
A



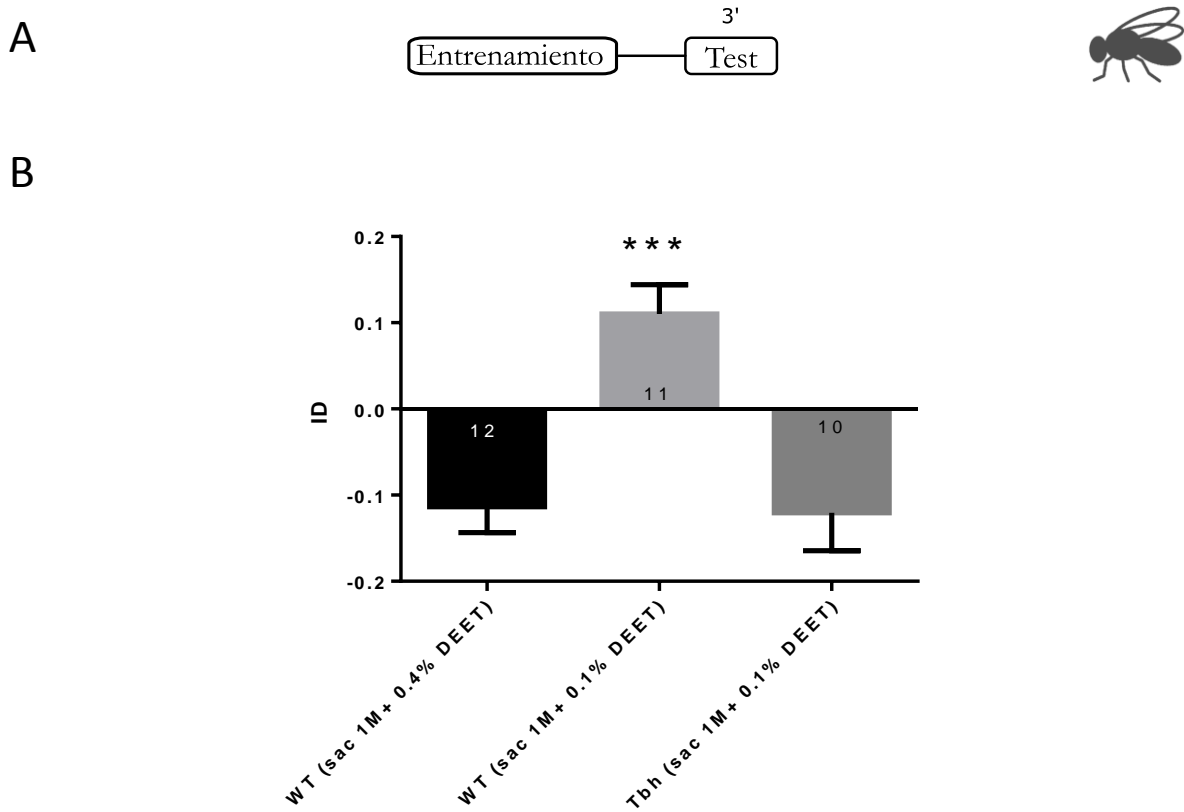
B



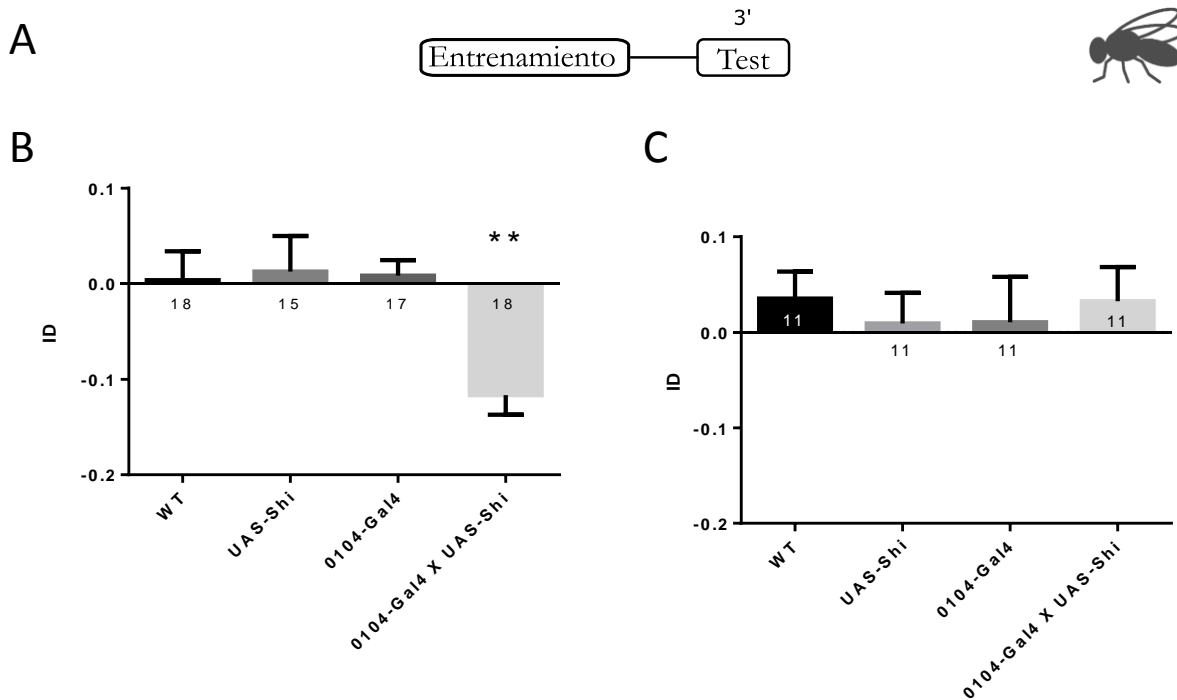
**Figura 20. La memoria evocada depende del balance de fuerza entre los estímulos incondicionados.** A) Procedimiento experimental. Todos los animales son sometidos a un condicionamiento diferencial e inmediatamente después se evalúa su preferencia por los dos olores usados en el entrenamiento. Cada columna corresponde a un grupo que recibe un US con una concentración distinta de DEET. B) Índice de discriminación de los animales en la sesión de evaluación. El número de unidades experimentales en cada grupo se indica para cada barra. Los valores corresponden a la media de cada grupo  $\pm$  error estándar. Letras distintas corresponden a valores diferentes luego de una prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).



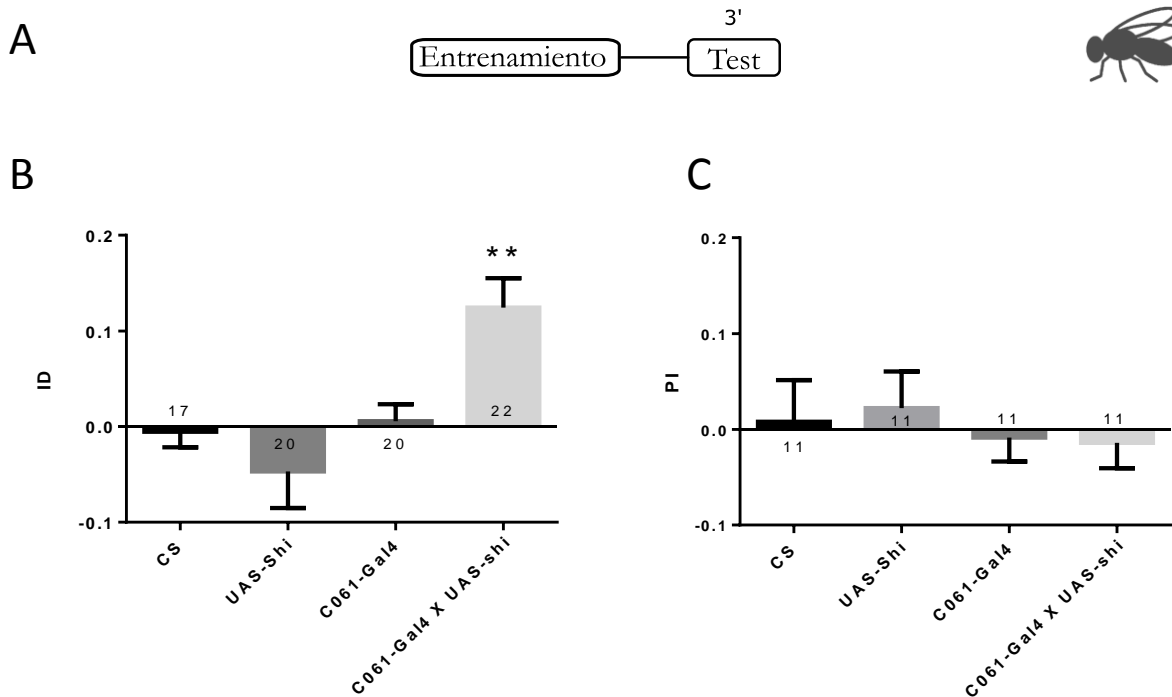
**Figura 21. La memoria evocada cambia conforme la evaluación se aleja del entrenamiento.** A) Procedimiento experimental. Todos los animales (WT) son sometidos a un condicionamiento diferencial con una solución de sacarosa 1M + 0,6% DEET y se evalúa su preferencia por los olores usados en el entrenamiento. Cada punto en el tiempo pertenece a un grupo de animales independiente B) Índice de discriminación de los animales en cada sesión de evaluación. El número unidades experimentales utilizados en cada grupo se indica para cada punto. Los valores corresponden a la media de cada grupo +/- error estándar. \*\*\*  $p < 0,01$  contra el resto de los grupos utilizando una prueba de Tukey.



**Figura 22. Los animales deficientes en OA forman una memoria aversiva en condiciones que darían evidencia de una memoria apetitiva.** A) Procedimiento experimental. Animales WT o TBH<sup>M18</sup> son sometidos a un condicionamiento diferencial con distintas soluciones y se evalúa su preferencia por los olores usados en el entrenamiento inmediatamente luego del mismo. B) Índice de discriminación de los animales en la sesión de evaluación. El número unidades experimentales utilizados en cada grupo se indica para cada barra. Los valores corresponden a la media de cada grupo +/- error estándar. \*\*\*  $p < 0,01$  contra el resto de los grupos utilizando una prueba de Tukey.



**Figura 23. La inactivación de neuronas que señalizan el refuerzo apetitivo lleva a la expresión de la memoria aversiva.** A) Procedimiento experimental. Animales WT, UAS-Shi, 0104-Gal4 o 0104-Gal4 x UAS-Shi son condicionados diferencialmente con una solución de sacarosa 1M + 0,3% DEET y se evalúa su preferencia por los olores usados en el entrenamiento inmediatamente luego del mismo. B) Índice de discriminación de los animales en la sesión de evaluación cuando el experimento se realiza en un cuarto a 32°C. C) Índice de discriminación de los animales en la sesión de evaluación cuando el experimento se realiza en un cuarto a 23°C. El número unidades experimentales utilizados en cada grupo se indica para cada barra. Los valores de ID corresponden a la media de cada grupo +/- error estándar. \*\*  $p < 0,01$  contra todos los controles utilizando una prueba de Tukey.



**Figura 24. La inactivación de neuronas que señalizan el refuerzo aversivo lleva a la expresión de la memoria apetitiva.** A) Procedimiento experimental. Animales WT, UAS-Shi, C061-Gal4 o C061-Gal4 x UAS-Shi son condicionados diferencialmente con una solución de sacarosa 1M + 0,3% DEET y se evalúa su preferencia por los olores usados en el entrenamiento inmediatamente luego del mismo. B) Índice de discriminación de los animales en la sesión de evaluación cuando el experimento se realiza en un cuarto a 32°C. C) Índice de discriminación de los animales en la sesión de evaluación cuando el experimento se realiza en un cuarto a 23°C. El número de unidades experimentales utilizadas en cada grupo se indica para cada barra. Los valores corresponden a la media de ID de cada grupo +/- error estándar. \*\*  $p < 0,01$  contra todos los controles utilizando una prueba de Tukey.

### 3.C Descripción inicial del sistema dopaminérgico en abeja y cangrejo a partir de ensayos de inmunohistoquímica

Los resultados de los capítulos anteriores en base a la modulación de la memoria apetitiva por dopamina y por antagonistas dopaminérgico, junto a los antecedentes que señalan que dopamina es el neurotransmisor involucrado en mediar información aversiva (Klappenbach et al., 2012; Vergoz et al., 2007), resultan consistentes con la hipótesis de que la interacción entre la información apetitiva y aversiva debe ser, al menos en cangrejos y en abejas, un elemento intrínseco de los mecanismos determinantes de la memoria de largo término. Estas conclusiones fueron alcanzadas con inyección sistémicas en ambos modelos, y si bien sabemos por antecedentes y por características anatómicas de estas dos especies, que las drogas inyectadas por esa vía alcanzan los neuropilos de los ganglios nerviosos, nos resulta imposible determinar cuáles fueron las áreas del cerebro o neuropilos blanco de las drogas para provocar una alteración en la memoria. Si bien existe una detallada descripción del sistema dopaminérgico en *Drosophila* (Kaun and Rothenfluh, 2017; Mao and Davis, 2009), esto es algo que falta aún tanto en el cangrejo como en la abeja. Haciendo hincapié en las zonas relacionadas a los procesos de aprendizaje y memoria, realicé una serie de ensayos de inmunohistoquímica para empezar a describir el sistema dopaminérgico en estos dos modelos. Para esto utilizamos un anticuerpo anti tirosina-hidroxilasa (TH). Como mencioné en la introducción, esta enzima es la que cataliza la conversión de tirosina a L-DOPA, que luego se convierte en dopamina gracias a la acción de la DOPA decarboxilasa. Como este paso es muy rápido se toma a la TH como la enzima limitante en la biosíntesis de DA siendo el marcado con esta enzima es lo que normalmente se utiliza como marcador de neuronas dopaminérgicas, ya que se ha demostrado que los anticuerpos anti-TH tienen un patrón de tinción muy consistente con los patrones descritos utilizando anticuerpos anti-DA (Cournil et al., 1994; Wood and Derby, 1996).

#### 3.C.1 Cangrejo *Neohelice granulata*

El cerebro de crustáceos decápodos consiste en un protocerebro, un deutocerebro, y un tritocerebro. El protocerebro se divide en tres partes: los ganglios ópticos y el protocerebro lateral, ambos ubicados en el interior de los pedúnculos ópticos, y el protocerebro medio, que es parte anatómica del ganglio supraoesofágico, junto con el deutero y el tritocerebro. Los ganglios ópticos pueden ser a su vez subdivididos

en cinco neuropilos: la lámina, la médula, la lóbula, la lóbula *plate* y el protocerebro lateral (Maza et al., 2016). A través de estos estratos el procesamiento visual va aumentando los grados de integración (Sztarker et al., 2005). Resulta muy interesante que encontramos neuronas TH-inmunorreactivas en todos los ganglios observados del sistema nervioso central, algunas de ellas que tienen proyecciones locales y otra que tienen proyecciones más distantes.

En la figura 25 (página 97) se puede observar que en los ganglios ópticos encontramos cuerpos celulares inmunorreactivos en el borde distal de la médula y una tinción homogénea en la región que corresponde con las proyecciones columnares de los somas marcados. También se encontró una alta inmunoreactividad en una fracción de somas en la lóbula y en las neuronas columnares correspondientes del mismo neuropilo. El patrón de tinción de TH en la médula y lóbula revelan varias capas transversales, que presumiblemente corresponden a regiones sinápticas entre las neuronas columnares, así como con las neuronas tangenciales que recopilan información retinotópica (Sztarker et al., 2005). Resulta interesante que se ha demostrado anteriormente que estas neuronas procesan también información visual del tracto protocerebral contralateral.

En las figuras 26 y 27 (páginas 98 y 99) se ve que no se encontró ningún clúster o tracto en el ganglio supraesofágico homogéneamente teñido con el anticuerpo anti-TH. En contraste, las células TH-positivas se reparten en varios grupos con una estricta distribución bilateral. Cuerpos celulares teñidos son vecinos de otros no teñidos, lo que revela la heterogeneidad neuroquímica de todos los clústeres. De acuerdo con reportes anteriores en otros crustáceos, una fracción importante de las células TH-positivas se encuentran en el clúster 6, un grupo prominente que se ubica en el margen anterior del ganglio supraesofágico (Cournil et al., 1994; Fort et al., 2004). Aunque las proyecciones de estas neuronas no comparten un patrón común de arborización, todas ellas alcanzan neuropilos distantes en el ganglio supraesofágico. Varias neuronas TH-positivas fueron reconocidas de forma consistente en todas las preparaciones y dos de ellas se corresponden con descripciones anteriores realizadas en otros crustáceos. Estas últimas son la pareja de células cuyos soma y axones son reconocibles en el conectivo circumoesofágico (Fort et al., 2004) y el par de células Br, previamente descrito en *Homarus gammarus* (Beltz, 1999). Las células Br muestran un prominente cuerpo celular ubicado en el clúster 16, adyacente al lóbulo olfatorio, y se ramifican de forma bilateral en todo el ganglio supraesofágico,

neuropilos anterior y posterior, y también envían proyecciones al conectivo circumoesofágico. En sintonía con otras especies de crustáceos, encontramos neuronas dopaminérgicas en todo el cerebro central de *Neohelice*. Se tiñeron neuronas TH-positivas que proyectan distalmente e interconectan varios neuropilos del ganglio supraesofágico. Este patrón sería consistente con un papel de DA como un neurotransmisor no estrictamente vinculado a una modalidad sensorial, sino más bien con un rol integrador y/o coordinador de funciones. Es importante destacar que una serie de estudios han indicado que el complejo central, una estructura prominente en el cerebro central de los insectos, está implicada en la memoria de patrones visuales (Liu et al., 2006; Pan et al., 2009) y de memoria espacial (Neuser et al., 2008). Teniendo en cuenta que se ha sugerido una posible homología entre el cuerpo central de los insectos y de los crustáceos (Utting et al., 2000), y que nos encontramos con una serie de fibras dopaminérgicas que conectan los neuropilos ópticos con el cuerpo central, sería interesante analizar el papel de esta área en la formación de la memoria visual aversiva.

En los ganglios ópticos se puede ver una intensa tinción dopaminérgica adyacente al protocerebro lateral que corresponde a la glándula del seno y el órgano X, que son dos importantes glándulas neuroendócrinas en crustáceos. Esto es coherente con el papel bien documentado de la DA como neurohormona (Christie, 2011). Además, como se puede observar de la figura 28a (página 100), un grupo de fibras descendientes por el conectivo que conecta al ganglio supraesofágico se separa y se pierde en ramas menores en la zona más distal del protocerebro lateral. Recientemente se ha identificado en ese área del protocerebro lateral un neuropilo denominado cuerpo hemielipsoideo que guarda una estrecha relación evolutiva con *mushroom bodies* de insectos. Resulta además interesante que la actividad evocada por el estímulo visual de peligro en el cuerpo hemielipsoideo se reduce conforme transcurre el entrenamiento aversivo y que los cambios en este lugar son específicos del contexto de entrenamiento (Maza et al., 2016). En la figura 28b (página 100) podemos ver las *globuli cells*, neuronas intrínsecas del cuerpo hemielipsoideo, análogas a las *Kenyon cells*, que proyectan sus axones formando los lóbulos ventral y el lateral. En ambos lóbulos vemos que hay una marca punteada, que podría corresponder con terminales de neuronas dopaminérgicas que inervan los lóbulos de los cuerpos hemielipsoideos, de la misma forma que sucede en *Drosophila* (Mao and Davis, 2009). Esta arquitectura de la red dopaminérgica daría sustento anatómico a las observaciones mostradas en este trabajo ya que la inervación dopaminérgica observada en lóbulos del cuerpo



hemielipsoideo podría bien estar relacionada con la integración entre claves visuales de reconocimiento del contexto y el valor aversivo del entrenamiento.

En resumen, las neuronas dopaminérgicas están ampliamente distribuidas en el cerebro de *Neohelice*. Mientras que en los primeros ganglios ópticos, las neuronas TH-positivas parecen ser parte intrínseca de la estructura de los neuropilos que participan en el procesamiento visual, en el resto del cerebro, las neuronas dopaminérgicas proyectan distalmente, interconectando varios neuropilos de distintas modalidades y probablemente orquestando funciones relacionadas con situaciones y estímulos de valor hedónico negativo.

### 3.C.2 Abeja *Apis mellifera*

Al igual que en el cangrejo, observamos neuronas TH-positivas como elementos intrínsecos de la lóbula (figura 29, página 101). Vemos que hay procesos que corren de forma transversal y otros que lo hacen a través de las columnas. Estas neuronas, al igual que en el caso de cangrejo, es probable que participen de la red local de procesamiento de información visual. Además, en relación al sistema visual, vemos una profusa tinción del tubérculo óptico, neuropilo que está relacionado con procesamiento y reconocimiento de la información de color (Mota et al., 2016).

En el cerebro central sobresale la marca de dos cuerpos neuronales en la región medial que proyectan sobre los lóbulos de los *mushroom bodies*. Neuronas con una arquitectura similar se observan en *Drosophila*, y son candidatas a producir la señalización de los estímulos aversivos en esta importante parte del cerebro de los animales (Mao and Davis, 2009).

Es de particular interés la inervación dopaminérgica observada en el lóbulo antenal (figura 30, página 102). Este neuropilo es el primer centro de relevo en la vía de procesamiento olfatorio, y se considera una estructura homóloga al bulbo olfatorio de mamíferos. Es aquí donde llegan los axones de las células receptoras, que hacen sinapsis con dendritas de las neuronas de proyección, que luego llevan la información a otros centros, como los *mushroom bodies* y el *lateral horn*. Además, existe una red de interneuronas locales que modulan la información, por lo que no es una simple estación de relevo, sino que existe un procesamiento de la señal. Se ha demostrado que esta estructura presenta plasticidad asociada a aprendizaje y memoria, y está bien descrita la inervación octopaminérgica que recibe, en particular por parte de la neurona VUmX1,

responsable de la señal del estímulo apetitivo (Sinakevitch et al., 2013). Se sabe que la señalización octopaminérgica en los lóbulos antenales es necesaria para el aprendizaje olfatorio apetitivo. Respecto de DA, es sumamente interesante haber hallado en este neuropilo una profusa innervación dopaminérgica que probablemente medie información aversiva que compite localmente con la información mediada por OA. En los clusters de somas adyacentes al lóbulo antenal, se observan somas marcados positivamente para TH, entremezclados con somas no marcados. Estos somas envían sus proyecciones hacia el centro del lóbulo, desde dónde ramifican en glomérulos. La tinción con TH es heterogénea entre glomérulos, lo que probablemente esté relacionado con las cualidades o valor de los olores que los distintos glomérulos codifican.

## Figuras de la sección 3.C

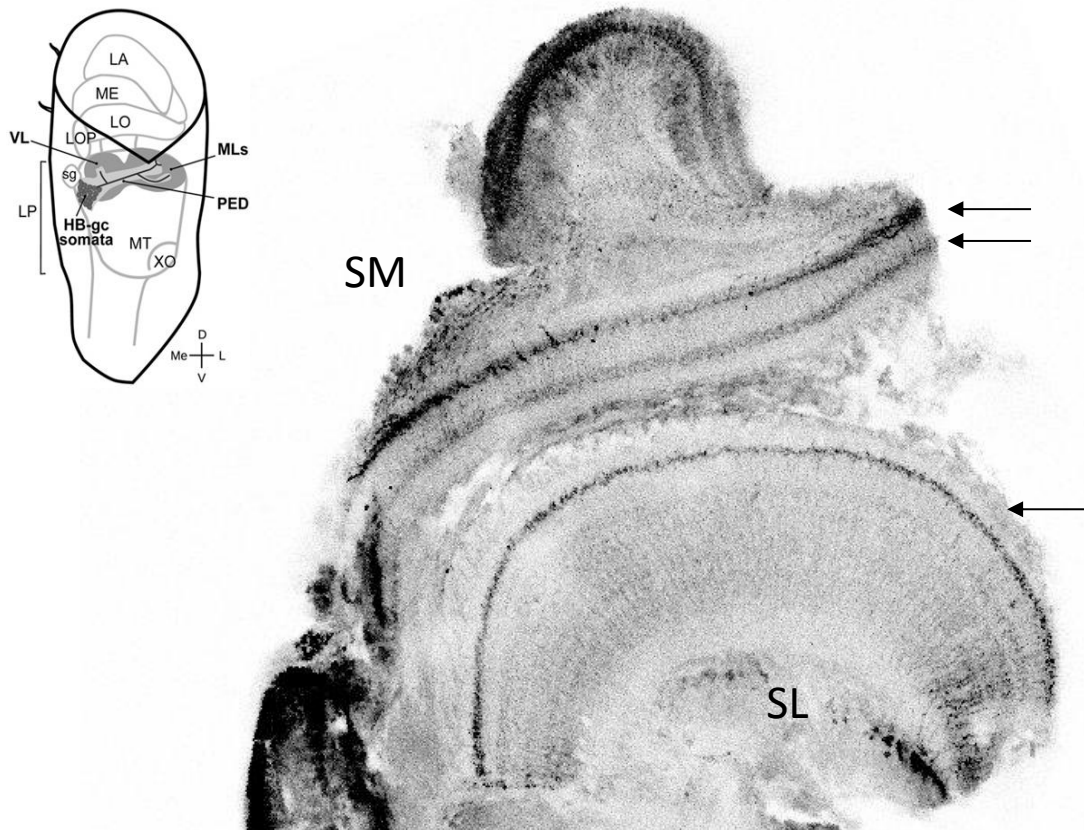


Figura 25. Patrón de tinción anti-TH en el lóbulo óptico del cangrejo *Neohelice*. Se observan somas teñidos en la región de la lóbula (SL) y en la región de la médula (SM). Estas neuronas generan procesos columnares que terminan en distintas capas transversales, marcadas con flechas. Inserto: esquema del pedúnculo óptico tal cual aparece en (Maza et al., 2016). (LA) lámina, (ME) Médula, (LO) lóbula, (LOP) *lobula plate*, (SG) glándula del seno, (LP) protocebro lateral, (HB-GC) somas de las *globuli cells*, (VL) lóbulo ventral, (MLs) lóbulos mediales, (PED) pedúnculo, (XO), órgano X, (MT) médula terminal

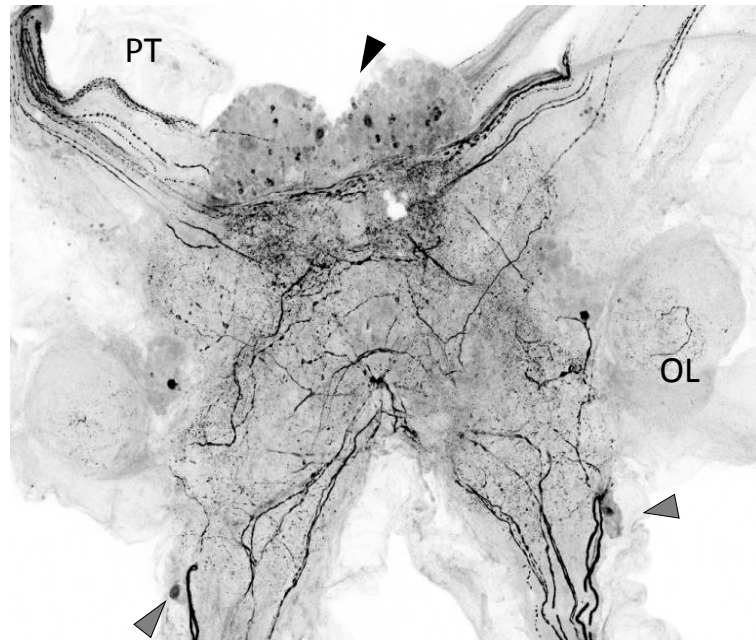


Figura 26. Vista dorsal del ganglio supraesofágico. Tinción dopaminérgica en el cluster 6 (punta de flecha negra), células L (punta de flecha gris). Tracto protocerebral (PT). Lóbulo olfatorio (OL).

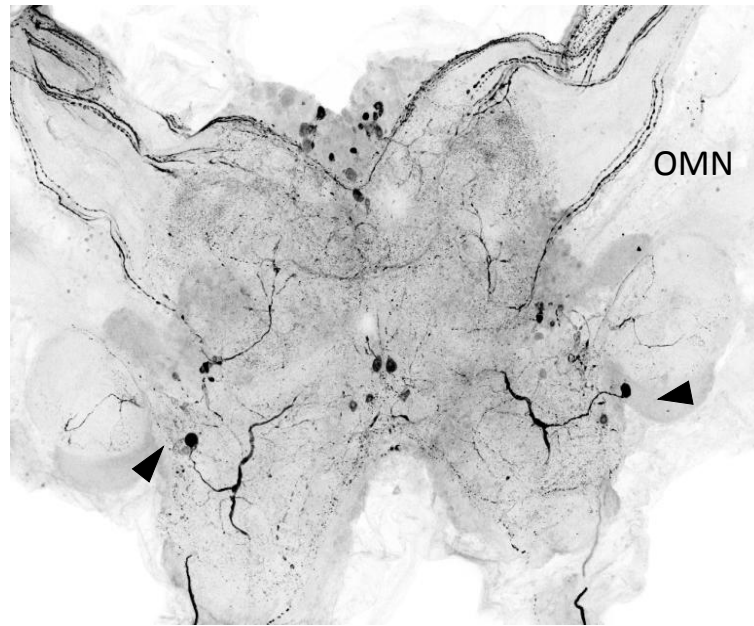


Figura 27. Vista ventral del ganglio supraesofágico. Tinción dopaminérgica de las células Br (punta de flecha negra). Nervio oculomotor (OMN).

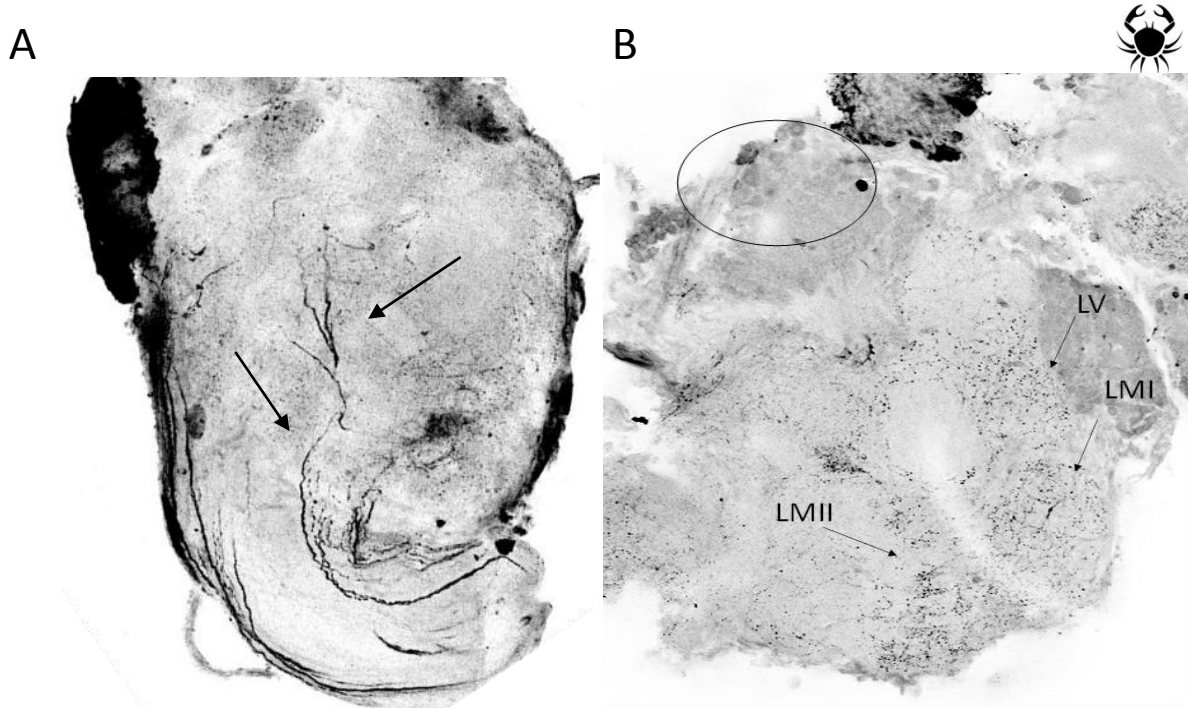
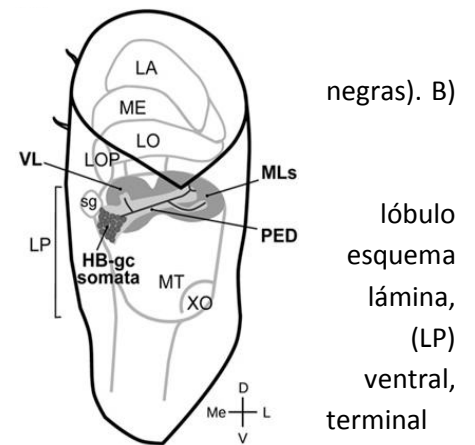
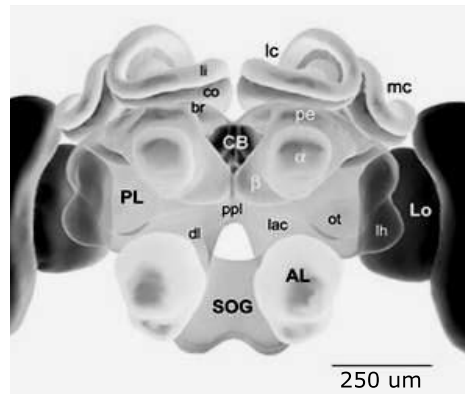


Figura 28. A) Patrón de tinción de fibras provenientes del ganglio supraesofágico, que se ramifican en el protocerebro lateral (Flechas Protocerebro lateral. Se observan las *globuli cells* en el borde lateral del protocerebro lateral (dentro del círculo negro). Se tiñen terminales dopaminérgicas en los lóbulos de salida del cuerpo hemielipsoideo. LV: ventral. LMI: lóbulo medial I. LMII: lóbulo medial II. A la derecha: del pedúnculo óptico tal cual aparece en (Maza et al., 2016). (LA) (ME) Médula, (LO) lóbula, (LOP) *lobula plate*, (SG) glándula del seno, protocebro lateral, (HB-GC) somas de las *globuli cells*, (VL) lóbulo (MLs) lóbulos mediales, (PED) pedúnculo, (XO), órgano X, (MT) médula



A



B

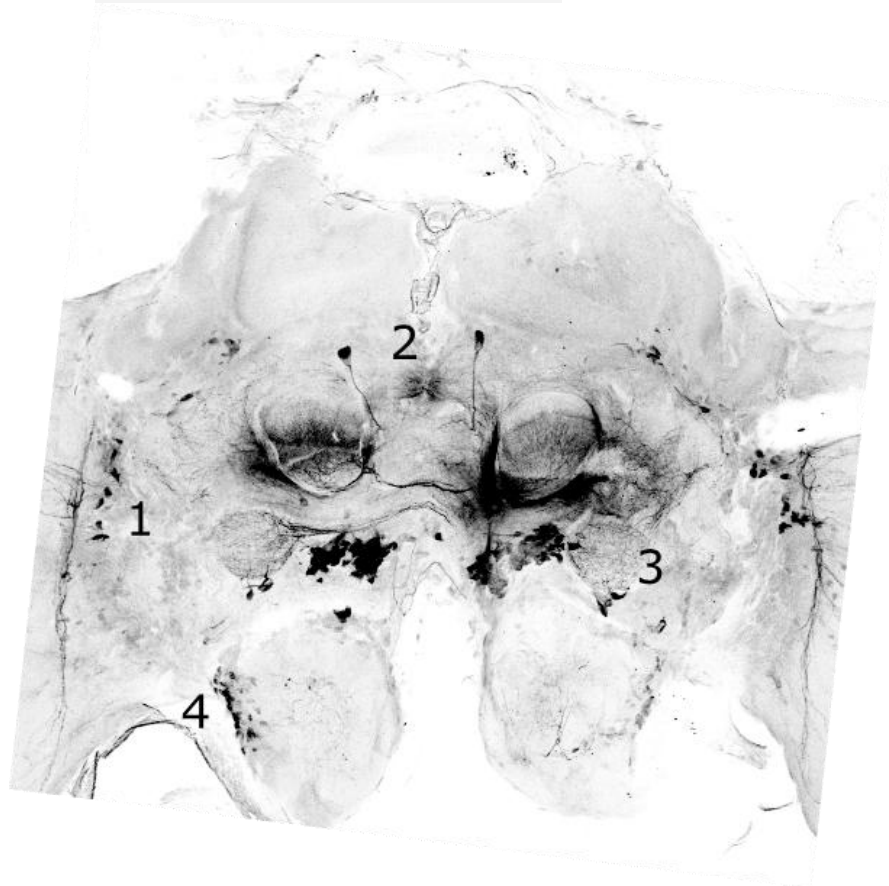
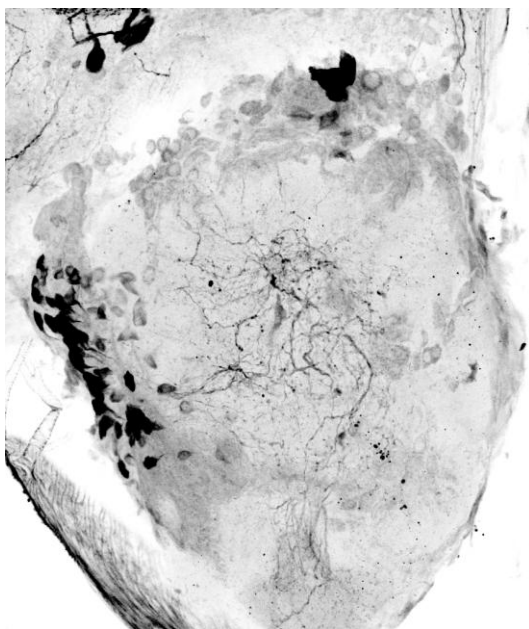


Figura 29. A) Esquema del cerebro de la abeja, modificado a partir de (Rybak et al., 2010). (MB) *mushroom bodies*, (PL) lóbulos protocerebrales, (SOG) ganglio subesofágico, (AL) lóbulo antenal, (mc) cáliz medial, (lc) cáliz lateral, (lh) *lateral horn*, (CB) *central body*, (LO) lóbula (LO), (ot) tubérculo óptico. B) Tinción dopaminérgica en el cerebro entero de la abeja. (1) Somas situados en el borde de la lóbula, con proyecciones transversales y longitudinales. (2) En el sector medial se ve un par de somas que extienden sus proyecciones hacia los lóbulos de los *mushroom bodies*. (3) Tinción homogénea en el tubérculo óptico. (4) Tinción en la parte lateral del lóbula antenal derecho.



A



B

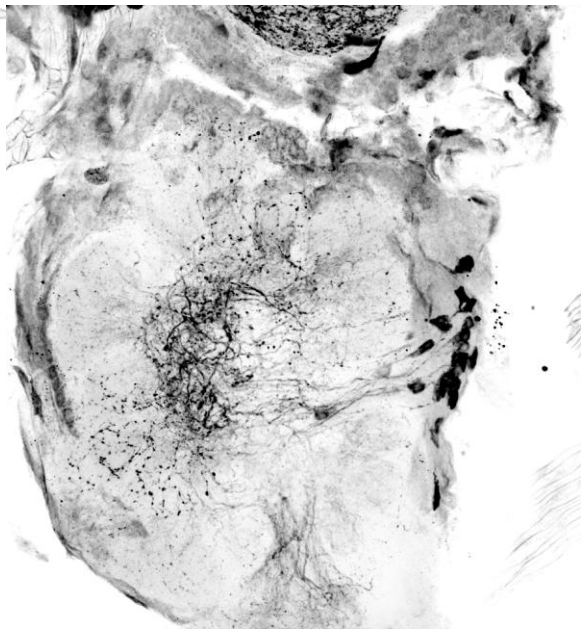


Figura 30. A) Lóbulo antenal derecho y B) Lóbulo antenal izquierdo. Se observa teñido un grupo de somas en el borde lateral del lóbulo entremezclados con otros somas no teñidos. Estos envían sus proyecciones hacia el centro del lóbulo, en donde se ramifican hacia los glomérulos.

## Conclusión

Los objetivos principales de esta tesis fueron estudiar la interacción entre señales apetitivas y aversivas que compiten en situaciones reales de aprendizaje y memoria, estudiar la participación de DA como neurotransmisor mediador de la información de tipo aversiva en esta interacción, y entender el efecto que esto tiene sobre el contenido y la expresión de las memorias.

Para esto me valí de tres modelos animales distintos, no solo con la intención de explotar las ventajas técnicas que cada uno de ellos proporciona, sino también con el objetivo de poner a prueba el grado de universalidad de los conceptos evaluados.

Los resultados más destacados consistieron en haber demostrado que:

- La inyección de DA interfiere con la memoria apetitiva de largo término. Esto se comprobó en cangrejos y abejas.
- La inyección de un antagonista de receptores dopaminérgicos favorece la formación de una memoria apetitiva de largo término en abejas, demostrando así un control tónico dopaminérgico sobre la memoria apetitiva. No se comprobó que fuese así en cangrejos.
- A partir de un entrenamiento mixto que contiene estímulos aversivos y apetitivos se forman dos memorias independientes entre sí, que compiten al momento de la expresión. Esto se comprobó en cangrejos y moscas.
- Luego de un entrenamiento de tipo mixto, la memoria que se expresa luego de un entrenamiento depende del balance de fuerzas entre los estímulos aversivos y apetitivos tanto en cangrejos como en moscas.
- Demostramos en cangrejos que el estado motivacional (hambre-saciedad) modula no solo la expresión de la memoria apetitiva sino también la expresión de una memoria aversiva que compite con dicha memoria apetitiva.
- Mediante ensayos inmunohistoquímicos iniciamos la descripción del circuito dopaminérgico en sistema nervioso central de abejas y cangrejos, comprobando en ambos casos inervación dopaminérgica en áreas del cerebro involucradas en aprendizaje y memoria.

Los resultados obtenidos se ajustan a la hipótesis general de este trabajo, que postula que las aminas biogénicas, octopamina y dopamina, tienen un rol dual en el aprendizaje y memoria, lo cual permite un procesamiento coordinado de la información contradictoria presente en eventos de la vida real de un animal. Por un lado señalizan a un tipo de aprendizaje e instruyen para la formación de un tipo de memoria, mientras que por otro interfieren con la memoria de signo opuesto. Comentaré algunos de los resultados en el contexto de la bibliografía relacionada.

## Discusión

En el capítulo 3.1 vimos que la inyección de DA en el cangrejo y la inyección de DA o de un agonista de receptores dopaminérgicos en la abeja interfieren con la memoria apetitiva de largo término. Es importante destacar que para que este efecto se produzca la administración de las drogas debe ser antes del entrenamiento, aunque que no afecta al mismo.

Existen antecedentes directos en abejas y en cangrejos que apoyan estos resultados. Por un lado, se ha visto que la inyección de OA previo a un entrenamiento aversivo interfiere con la memoria aversiva de largo término en cangrejos (Kaczer and Maldonado, 2009). En base a este resultado y al aquí presentado podemos cerrar el esquema propuesto algunos años atrás: la OA señala el refuerzo apetitivo e interfiere con la memoria aversiva (Kaczer and Maldonado, 2009), mientras que la DA señala al refuerzo negativo, al mismo tiempo que interfiere con la memoria apetitiva (Klappenbach et al., 2012).

Por su parte, en abejas se ha visto que la administración por vía oral de OA impide la formación de un aprendizaje aversivo (Agarwal et al., 2011). En este caso se trató de un paradigma de *place preference* en el que los animales asocian un determinado lugar pintado de un color con un *shock* eléctrico. Los animales que son alimentados con OA pasan más tiempo en el lugar en el que reciben el shock en comparación con los animales del grupo control que no reciben OA. Por el contrario, abejas que son alimentadas con DA pasan menos tiempo en el lugar en el que fueron castigados. Esto indica entonces que la administración de DA facilita la adquisición de una memoria aversiva (al igual que habíamos visto en cangrejo (Klappenbach et al., 2012), mientras que la administración de OA interfiere con la misma.

Hemos visto que la inyección de DA, que afecta la memoria cuando se administra antes del entrenamiento, no afectaría la evocación de la misma. Este resultado sería contrario a lo que se podría predecir en base a los resultados obtenidos en grillos, aunque iría de la mano con lo visto en cangrejos (Kaczer et al., 2011; Mizunami and Matsumoto, 2010). En el primer caso, se vio que tanto DA como OA son necesarias para la evocación de la memoria aversiva y apetitiva respectivamente, ya que la administración de antagonistas de sus receptores previo al testeo bloquea la expresión de las mismas. En contraposición, en cangrejos se ha visto que la OA, a pesar de ser necesaria durante el entrenamiento para la formación de la memoria apetitiva, no lo

es para la evocación de la misma. Existen clásicamente dos modelos asociativos mediante los cuales pueden explicarse estos fenómenos de plasticidad: uno denominado “S-S” (S por estímulo) otro denominado “S-R” (S por estímulo, R por respuesta) (Rescorla, 1988). Este modelo asume que existe una representación neuronal del CS conectada muy débilmente a la vía que activa la CR, mientras que el US también tiene su representación neuronal en forma paralela. Durante el entrenamiento, la activación de la vía del US fortalece la conexión entre el CS y la CR (S-R), por lo que luego del mismo, la estimulación con el CS hace que se ejecute la CR. Es importante destacar que en este caso la respuesta se vuelve independiente de la vía del US. En cambio, bajo el modelo “S-S”, es la vía del US la que está conectada directamente con la respuesta. A partir del entrenamiento, se genera una conexión entre la representación del CS y la del US (S-S). A partir de entonces, la estimulación con el CS activa la del US la que a su vez activa la respuesta. Lo que debemos destacar en este último caso es que para que se produzca la CR debe activarse la vía del US. Los resultados obtenidos en grillos se explicarían en base al modelo “S-S”, por lo que la presentación del CS lleva a la CR por medio de activar internamente la vía del US, la cual involucra DA o OA. Esto explica los casos en que bloqueo de la transmisión DAérgico u OAérgica impida la evocación de la memoria respectiva. Bajo el modelo “S-R”, la asociación se produce entre el CS y la CR, por lo cual para que se produzca la respuesta no es necesaria que estén presentes las aminas que señalizan al US. Este último es el modelo bajo el cual se han explicado resultados obtenidos en cangrejos respecto del rol de la OA en la evocación de la memoria apetitiva (Kaczer et al., 2011). Los resultados presentados en este trabajo referidos a que la DA no interfiera con la memoria apetitiva en cangrejos y abejas, también coinciden con esta última interpretación.

En la sección de resultados comenté que una posibilidad por la cual la DA podría afectar la formación de la memoria de largo es disminuir el valor del refuerzo positivo. De esta forma, los animales recibirían un refuerzo menor, lo que generaría una memoria de más corto término. A favor de esta hipótesis podemos citar un trabajo realizado en abejas, en el que se ve que la DA afecta la responsividad de los animales (Scheiner et al., 2002). Sin embargo, como mencioné anteriormente, es importante que nuestros experimentos fueron llevados a cabo con una solución muy concentrada de sacarosa (2M), que es equivalente a la concentración mayor usada en el trabajo de Scheiner, y que la modulación por DA se vio sobre las concentraciones más bajas. No obstante, si bien nuestros animales responden positivamente al azúcar, podrían estar percibiendo una

menor concentración, que resultaría en una recompensa menos atractiva, que hace que los animales no muestren diferencias en la cantidad de solución ingerida cuando son inyectados con DA, pero que solamente generaría una memoria de corto plazo. Para contrastar esta hipótesis se podría hacer un experimento de *imaging* de calcio, en el que se vea la señal que evoca la solución azucarada en el cerebro de los animales en ausencia o presencia de la DA, bajo un protocolo similar al utilizado anteriormente (Rath et al., 2011). Se espera que si la DA disminuye el valor hedónico del azúcar, entonces que las señales evocadas en presencia de DA sean menores que las evocadas en una situación control.

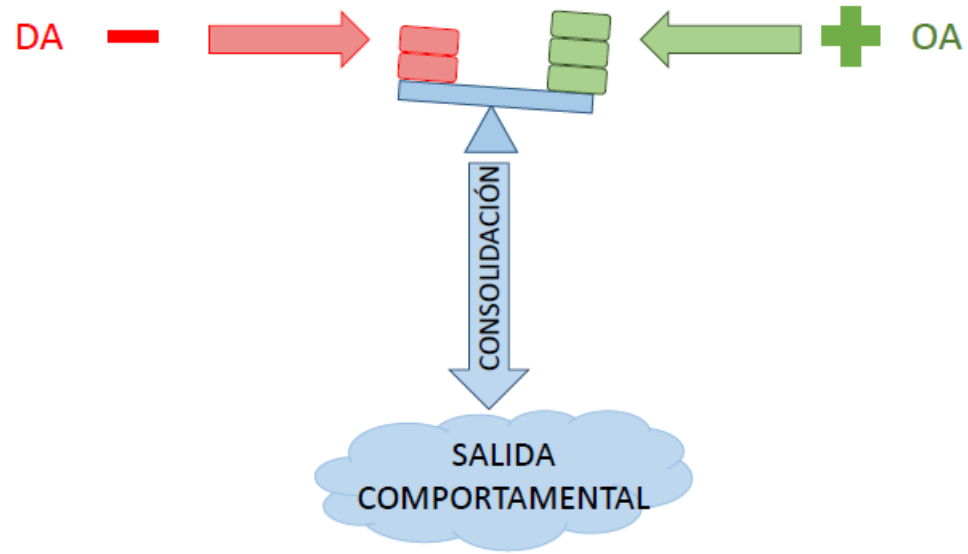
En cuanto a los experimentos realizados con dos entrenamientos en simultáneo, resulta muy interesante que se formen dos memorias en paralelo, no viéndose afectada la formación de las mismas. Esta independencia a la hora de la formación de ambas trazas resulta semejante a un trabajo reciente publicado en *Drosophila*, en el que se analiza la capacidad de distintas cepas de moscas para generar una memoria de alivio (que es considerada apetitiva) y una aversiva. Si bien hay que tener en cuenta que no se trata de entrenamientos simultáneos, sino que trabajan con grupos distintos de moscas, es interesante ver que, al igual que en el caso de *Neohelice*, no existe correlación alguna entre la capacidad de generar ambas memorias (Appel et al., 2016). No obstante, en el momento de la evocación, las mismas compiten por el control del comportamiento. En esta competencia influyen agentes externos, como es la fuerza de los estímulos durante el entrenamiento, que determinará la persistencia de la memoria, pero también agentes internos, como es el estado motivacional de los animales. Recientemente ha surgido una gran cantidad de trabajos en *Drosophila* enfocados en este tema, que describen con gran precisión la conexión entre los circuitos apetitivos y aversivos (Cohn et al., 2015; Hige et al., 2015; Lewis et al., 2015; Oswald et al., 2015), revisados en (Oswald and Waddell, 2015). Así como en trabajos anteriores se había descripto la parte del circuito que llevaba la señal del US a los MB, en la que las neuronas PPL1 llevaban la información aversiva y las PAM la información apetitiva, en este caso se enfocan en otro grupo de neuronas, las *mushroom bodies output neurons* (MBON). Se observa que, luego del aprendizaje, dependiendo de la valencia del mismo se ven potenciados o deprimidos distintos tipos neuronales. Lo que resulta sumamente interesante es que las mismas neuronas son modificadas bidireccionalmente dependiendo del entrenamiento recibido (Bouzaiane et al., 2015; Oswald et al., 2015). Estos trabajos dan cuenta entonces del sitio en donde se podría producir la integración entre las memorias apetitivas

y aversivas. Será un desafío de los próximos años entender más sobre estos circuitos, y llevar este conocimiento a otras especies.

El hecho de que los aprendizajes opuestos no se suprimen durante el aprendizaje o durante la consolidación sino que se estabilizan como memorias independientes que compiten durante la evocación a memoria representa una ventaja adaptativa para los animales, ya que de esa manera cuentan con mayor cantidad de información y alternativas al momento de la toma de decisiones. Supongamos que un animal en busca de comida se topa con este estímulo compuesto, como sucede en el caso de la mosca. Es adaptativo que en primera instancia lo rechace, ya que las sustancias amargas están asociadas a sustancias tóxicas. Sin embargo, ante la imposibilidad de encontrar una mejor fuente de alimento, a medida que pasa el tiempo al animal le convendría volver a esa fuente, ya que tiene un componente dulce, normalmente asociado a sustancias con un valor energético. No obstante, solo es conveniente formar una memoria de largo término en el caso de que ese estímulo realmente tenga ese valor para los animales. Obviamente, como mencioné antes, todas estas decisiones se ven moduladas por el estado interno de los animales. Así es como vemos en cangrejos que a partir de una situación en la que se expresaría solamente una memoria apetitiva se expresa en cambio una memoria aversiva si es que los animales no están lo suficientemente hambreados.

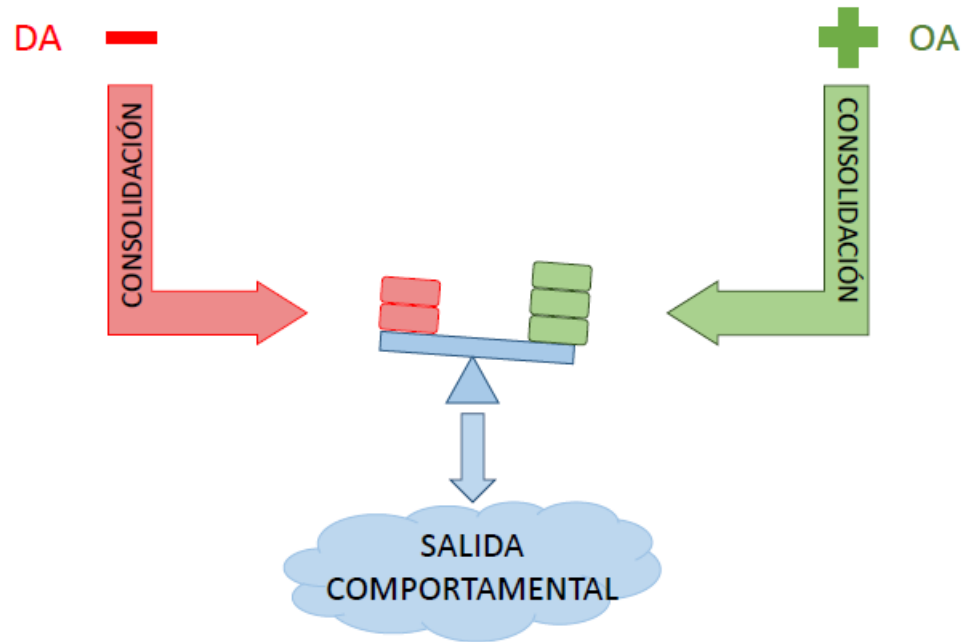
Estos ejemplos nos muestran como los animales pueden formar distintas asociaciones a partir de una misma experiencia y como en base a su estado de motivación y a la interacción entre las memorias formadas entre sí es que los animales pueden generar comportamientos coherentes y adaptativos que les permitan sobrevivir.

Para terminar, me gustaría presentar una serie de modelos que explican los resultados mostrados en este trabajo.

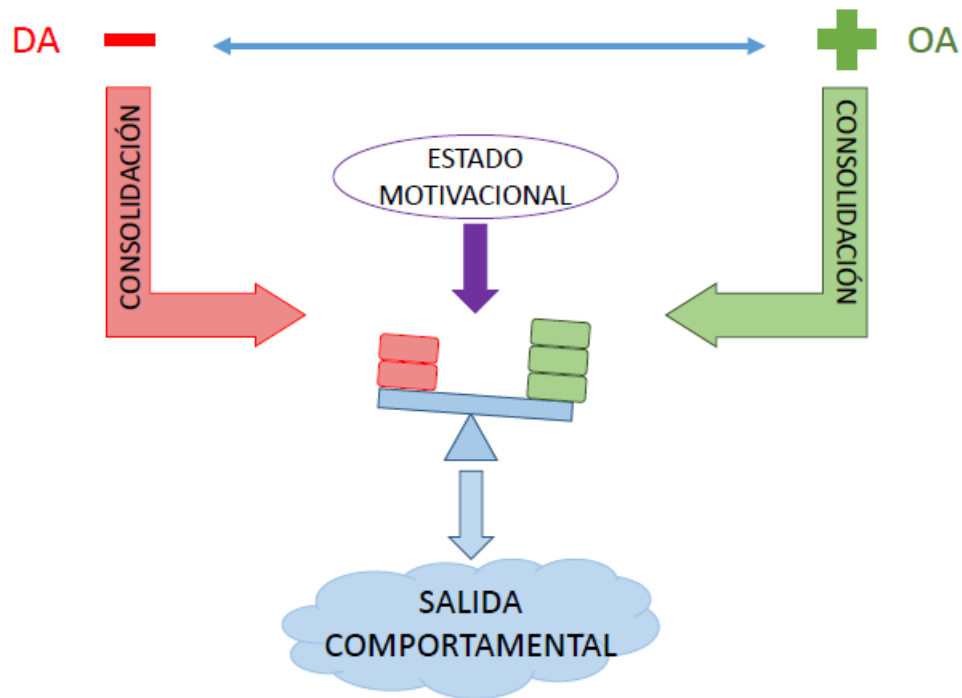


Modelo 1. Durante una experiencia mixta, el animal recibe estímulos positivos y negativos al mismo tiempo. A partir del balance de los mismos, los animales pueden o no formar una memoria. Es importante destacar que el destino de la memoria se establece en el momento del aprendizaje. Este modelo sería compatible con los resultados obtenidos en la sección 1 de resultados, a partir de los ensayos farmacológicos en abejas y cangrejos.





Modelo 2. Durante una experiencia mixta, el animal recibe estímulos positivos y negativos al mismo tiempo. A partir de estos, se forman dos memorias en paralelo, que pasan por un proceso de consolidación. Al momento en el que se evocan estas memorias se produce un balance entre las mismas, teniendo en cuenta también el estado motivacional del animal. A partir de dicho balance es que se produce la expresión de una, dos, o ninguna memoria. Este modelo es compatible con los resultados obtenidos en la sección 2 de resultados, a partir de un entrenamiento mixto en cangrejos y moscas.



Modelo 3. Este modelo integra los dos anteriores y es compatible con todos los resultados presentados hasta aquí. Mediante el mismo proponemos que los animales reciben distintos estímulos, cuyas señales podrían interactuar al momento de la experiencia modulando mutuamente su fuerza relativa. Luego de la experiencia se forman dos memorias en paralelo que se consolidan de forma independiente. Al momento de la evocación, a partir del balance de las mismas, y teniendo en cuenta el estado motivacional de los animales se produce un determinado comportamiento.

De esta forma, vemos que las experiencias se almacenan a partir de la recolección de sus partes por separado, lo que es de gran valor adaptativo para los animales, ya que de esta manera maximizan la información almacenada, y la misma está disponible al momento de tomar una decisión.

## **Bibliografía**

- Abbott, J. (1970). Absence of blood-brain barrier in a crustacean, *Carcinus maenas* L. *Nature* 225, 291–293.
- Abel, T., and Kandel, E. (1998). Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26, 360–378.
- Adrover, M.F., Shin, J.H., and Alvarez, V.A. (2014). Glutamate and dopamine transmission from midbrain dopamine neurons share similar release properties but are differentially affected by cocaine. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 3183–3192.
- Agarwal, M., Guzmán, M.G., Morales-Matos, C., Del Valle Díaz, R.A., Abramson, C.I., and Giray, T. (2011). Dopamine and octopamine influence avoidance learning of honey bees in a place preference assay. *PloS One* 6, e25371.
- Alberini, C.M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci.* 28, 51–56.
- Antonsen, B.L., and Paul, D.H. (1997). Serotonin and octopamine elicit stereotypical agonistic behaviors in the squat lobster *Munida quadrispina* (Anomura, Galatheidae). *J. Comp. Physiol. A* 181, 501–510.
- Appel, M., Scholz, C.-J., Kocabey, S., Savage, S., König, C., and Yarali, A. (2016). Independent natural genetic variation of punishment- versus relief-memory. *Biol. Lett.* 12.
- Aso, Y., and Rubin, G.M. (2016). Dopaminergic neurons write and update memories with cell-type-specific rules. *eLife* 5.
- Avarguès-Weber, A., and Mota, T. (2016). Advances and limitations of visual conditioning protocols in harnessed bees. *J. Physiol. Paris*.
- Awata, H., Wakuda, R., Ishimaru, Y., Matsuoka, Y., Terao, K., Katata, S., Matsumoto, Y., Hamanaka, Y., Noji, S., Mito, T., et al. (2016). Roles of OA1 octopamine receptor and Dop1 dopamine receptor in mediating appetitive and aversive reinforcement revealed by RNAi studies. *Sci. Rep.* 6, 29696.
- Barker, D.L., Kushner, P.D., and Hooper, N.K. (1979). Synthesis of dopamine and octopamine in the crustacean stomatogastric nervous system. *Brain Res.* 161, 99–113.
- Barron, A.B., Søvik, E., and Cornish, J.L. (2010). The roles of dopamine and related compounds in reward-seeking behavior across animal phyla. *Front. Behav. Neurosci.* 4, 163.
- Baxter, D.A., and Byrne, J.H. (2006). Feeding behavior of *Aplysia*: a model system for comparing cellular mechanisms of classical and operant conditioning. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 13, 669–680.
- Beggs, K.T., Hamilton, I.S., Kurshan, P.T., Mustard, J.A., and Mercer, A.R. (2005). Characterization of a D2-like dopamine receptor (AmDOP3) in honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 873–882.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L.M., Bevilacqua, L.R.M., Izquierdo, I., and Medina, J.H. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53, 261–277.

- Beltz, B.S. (1999). Distribution and functional anatomy of amine-containing neurons in decapod crustaceans. *Microsc. Res. Tech.* **44**, 105–120.
- Benes, F.M. (2001). Carlsson and the discovery of dopamine. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 46–47.
- Berón, M.P. (2003). Dieta de juveniles de Gaviota Cangrejera (*Larus atlanticus*) en estuarios de la provincia de Buenos Aires. *El Hornero* **018**, 113–117.
- Berry, J.A., Cervantes-Sandoval, I., Nicholas, E.P., and Davis, R.L. (2012). Dopamine is required for learning and forgetting in *Drosophila*. *Neuron* **74**, 530–542.
- Bitterman, M.E., Menzel, R., Fietz, A., and Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Psychol. Wash. DC* **1983** **97**, 107–119.
- Björkstrand, J., Agren, T., Åhs, F., Frick, A., Larsson, E.-M., Hjorth, O., Furmark, T., and Fredrikson, M. (2016). Disrupting Reconsolidation Attenuates Long-Term Fear Memory in the Human Amygdala and Facilitates Approach Behavior. *Curr. Biol. CB* **26**, 2690–2695.
- Blenau, W., Erber, J., and Baumann, A. (1998). Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain. *J. Neurochem.* **70**, 15–23.
- van der Blik, A.M., and Meyerowitz, E.M. (1991). Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature* **351**, 411–414.
- Bouzaiane, E., Trannoy, S., Scheunemann, L., Plaçais, P.-Y., and Preat, T. (2015). Two Independent Mushroom Body Output Circuits Retrieve the Six Discrete Components of *Drosophila* Aversive Memory. *Cell Rep.* **11**, 1280–1292.
- Burke, C.J., Huetteroth, W., Oswald, D., Perisse, E., Krashes, M.J., Das, G., Gohl, D., Silies, M., Certel, S., and Waddell, S. (2012). Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. *Nature* **492**, 433–437.
- Candy, D.J., Becker, A., and Wegener, G. (1997). Coordination and Integration of Metabolism in Insect Flight\*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **117**, 497–512.
- Carbó Tano, M., Molina, V.A., Maldonado, H., and Pedreira, M.E. (2009). Memory consolidation and reconsolidation in an invertebrate model: the role of the GABAergic system. *Neuroscience* **158**, 387–401.
- Christie, A.E. (2011). Crustacean neuroendocrine systems and their signaling agents. *Cell Tissue Res.* **345**, 41–67.
- Claridge-Chang, A., Roorda, R.D., Vrontou, E., Sjulson, L., Li, H., Hirsh, J., and Miesenböck, G. (2009). Writing memories with light-addressable reinforcement circuitry. *Cell* **139**, 405–415.
- Clark, M.C., and Baro, D.J. (2006). Molecular cloning and characterization of crustacean type-one dopamine receptors: D1alphaPan and D1betaPan. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **143**, 294–301.
- Clark, M.C., and Baro, D.J. (2007). Arthropod D2 receptors positively couple with cAMP through the Gi/o protein family. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **146**, 9–19.

- Cohn, R., Morantte, I., and Ruta, V. (2015). Coordinated and Compartmentalized Neuromodulation Shapes Sensory Processing in *Drosophila*. *Cell* 163, 1742–1755.
- Cournil, I., Helluy, S.M., and Beltz, B.S. (1994). Dopamine in the lobster *Homarus gammarus*. I. Comparative analysis of dopamine and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the nervous system of the juvenile. *J. Comp. Neurol.* 344, 455–469.
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E., and Schmid, S.L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* 127, 915–934.
- Das, G., Klappenbach, M., Vrontou, E., Perisse, E., Clark, C.M., Burke, C.J., and Waddell, S. (2014). *Drosophila* learn opposing components of a compound food stimulus. *Curr. Biol.* CB 24, 1723–1730.
- Davis, H.P., and Squire, L.R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.* 96, 518–559.
- Delorenzi, A., Pedreira, M.E., Romano, A., Pirola, C.J., Nahmod, V.E., and Maldonado, H. (1995). Acute administration of angiotensin II improves long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurosci. Lett.* 196, 193–196.
- Delorenzi, A., Dimant, B., Frenkel, L., Nahmod, V.E., Nässel, D.R., and Maldonado, H. (2000). High environmental salinity induces memory enhancement and increases levels of brain angiotensin-like peptides in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *J. Exp. Biol.* 203, 3369–3379.
- Delorenzi, A., Maza, F.J., Suárez, L.D., Barreiro, K., Molina, V.A., and Stehberg, J. (2014). Memory beyond expression. *J. Physiol. Paris* 108, 307–322.
- Ditzen, M., Pellegrino, M., and Vosshall, L.B. (2008). Insect Odorant Receptors Are Molecular Targets of the Insect Repellent DEET. *Science* 319, 1838–1842.
- Donly, C., Verellen, L., Cladman, W., and Caveney, S. (2007). Functional comparison of full-length and N-terminal-truncated octopamine transporters from *Lepidoptera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 933–940.
- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 211–216.
- Eisenhardt, D. (2014). Molecular mechanisms underlying formation of long-term reward memories and extinction memories in the honeybee (*Apis mellifera*). *Learn. Mem. Cold Spring Harb.* N 21, 534–542.
- Elofsson, R., Laxmyr, L., Rosegren, E., and Hansson, C. (1982). Identification and quantitative measurements of biogenic amines and Dopa in the central nervous system and haemolymph of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea). *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 71, 195–201.
- Erspamer, V. (1948). Active Substances in the Posterior Salivary Glands of Octopoda. II. Tyramine and Octopamine (Oxyoctopamine). *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)* 4, 224–247.
- Evans, P.D., and Maqueira, B. (2005). Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors. *Invertebr. Neurosci.* IN 5, 111–118.
- Farooqui, T. (2007). Octopamine-Mediated Neuromodulation of Insect Senses. *Neurochem. Res.* 32, 1511–1529.

- Farooqui, T., Robinson, K., Vaessin, H., and Smith, B.H. (2003). Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 5370–5380.
- Federman, N., Fustiñana, M.S., and Romano, A. (2009). Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 16, 600–606.
- Federman, N., Fustiñana, M.S., and Romano, A. (2012). Reconsolidation involves histone acetylation depending on the strength of the memory. *Neuroscience* 219, 145–156.
- Feld, M., Dimant, B., Delorenzi, A., Coso, O., and Romano, A. (2005). Phosphorylation of extra-nuclear ERK/MAPK is required for long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Behav. Brain Res.* 158, 251–261.
- Felsenberg, J., Gehring, K.B., Antemann, V., and Eisenhardt, D. (2011). Behavioural pharmacology in classical conditioning of the proboscis extension response in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Fernandez, P.C., Locatelli, F.F., Person-Rennell, N., Deleo, G., and Smith, B.H. (2009). Associative conditioning tunes transient dynamics of early olfactory processing. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 10191–10202.
- Fingerman, M., and Kulkarni, G.K. (1993). Quantitative measurement by reverse phase high performance liquid chromatography of norepinephrine in the central nervous system of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* and physiologically and pharmacologically induced alterations. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 104, 117–123.
- Flood, J.F., Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., and Orme, A.E. (1973). The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiol. Behav.* 10, 555–562.
- Fort, T.J., Brezina, V., and Miller, M.W. (2004). Modulation of an integrated central pattern generator-effector system: dopaminergic regulation of cardiac activity in the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Neurophysiol.* 92, 3455–3470.
- Frenkel, L., Maldonado, H., and Delorenzi, A. (2005). Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1757–1766.
- Freudenthal, R., Locatelli, F., Hermitte, G., Maldonado, H., Lafourcade, C., Delorenzi, A., and Romano, A. (1998). Kappa-B like DNA-binding activity is enhanced after spaced training that induces long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neurosci. Lett.* 242, 143–146.
- Friedrich, A., Thomas, U., and Müller, U. (2004). Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase A cascade in formation of long-term memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4460–4468.
- Galili, D.S., Dylla, K.V., Lüdke, A., Friedrich, A.B., Yamagata, N., Wong, J.Y.H., Ho, C.H., Szyszka, P., and Tanimoto, H. (2014). Converging circuits mediate temperature and shock aversive olfactory conditioning in *Drosophila*. *Curr. Biol. CB* 24, 1712–1722.
- Giurfa, M. (2006). Associative learning: the instructive function of biogenic amines. *Curr. Biol. CB* 16, R892–895.

- Giurfa, M., and Sandoz, J.-C. (2012). Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 19, 54–66.
- Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S., and Kandel, E.R. (1986). The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322, 419–422.
- Hammer, M. (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366, 59–63.
- Hammer, M. (1997). The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends Neurosci.* 20, 245–252.
- Hammer, M., and Menzel, R. (1998). Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 5, 146–156.
- Han, K.-A., Millar, N.S., Grotewiel, M.S., and Davis, R.L. (1996). DAMB, a Novel Dopamine Receptor Expressed Specifically in *Drosophila* Mushroom Bodies. *Neuron* 16, 1127–1135.
- Hepp, Y., Tano, M.C., Pedreira, M.E., and Freudenthal, R.A.M. (2013). NMDA-like receptors in the nervous system of the crab *Neohelice granulata*: a neuroanatomical description. *J. Comp. Neurol.* 521, 2279–2297.
- Hermitte, G., Pedreira, M.E., Tomsic, D., and Maldonado, H. (1999). Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long-term habituation after spaced, but not massed, training in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol. Learn. Mem.* 71, 34–49.
- Hige, T., Aso, Y., Rubin, G.M., and Turner, G.C. (2015). Plasticity-driven individualization of olfactory coding in mushroom body output neurons. *Nature* 526, 258–262.
- Hoeger, U., and Florey, E. (1989). Catecholamine degradation in the hemolymph of the Chinese crab, *Eriocheir Sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 92, 323–327.
- Howell, D. (2012). *Statistical Methods for Psychology* (Cengage Learning).
- Hoyer, S.C., Eckart, A., Herrel, A., Zars, T., Fischer, S.A., Hardie, S.L., and Heisenberg, M. (2008). Octopamine in male aggression of *Drosophila*. *Curr. Biol. CB* 18, 159–167.
- Huetteroth, W., Perisse, E., Lin, S., Klappenbach, M., Burke, C., and Waddell, S. (2015). Sweet taste and nutrient value subdivide rewarding dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Curr. Biol. CB* 25, 751–758.
- Humphries, M.A., Mustard, J.A., Hunter, S.J., Mercer, A., Ward, V., and Ebert, P.R. (2003). Invertebrate D2 type dopamine receptor exhibits age-based plasticity of expression in the mushroom bodies of the honeybee brain. *J. Neurobiol.* 55, 315–330.
- Ivanina, T., Varon, D., Peleg, S., Rishal, I., Porozov, Y., Dessauer, C.W., Keren-Raifman, T., and Dascal, N. (2004). G $\alpha$ i1 and G $\alpha$ i3 Differentially Interact with, and Regulate, the G Protein-activated K<sup>+</sup> Channel. *J. Biol. Chem.* 279, 17260–17268.
- Izquierdo, I. (1989). Different forms of post-training memory processing. *Behav. Neural Biol.* 51, 171–202.

- Kaczer, L., and Maldonado, H. (2009). Contrasting role of octopamine in appetitive and aversive learning in the crab *Chasmagnathus*. *PLoS One* 4, e6223.
- Kaczer, L., Klappenbach, M., and Maldonado, H. (2011). Dissecting mechanisms of reconsolidation: octopamine reveals differences between appetitive and aversive memories in the crab *Chasmagnathus*. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1170–1178.
- Kain, P., Boyle, S.M., Tharadra, S.K., Guda, T., Pham, C., Dahanukar, A., and Ray, A. (2013). Odour receptors and neurons for DEET and new insect repellents. *Nature* 502, 507–512.
- Kandel, E.R. (2001). The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science* 294, 1030–1038.
- Katz, T.M., Miller, J.H., and Hebert, A.A. (2008). Insect repellents: Historical perspectives and new developments. *J. Am. Acad. Dermatol.* 58, 865–871.
- Kaun, K.R., and Rothenfluh, A. (2017). Dopaminergic rules of engagement for memory in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 43, 56–62.
- Kemenes, I., O'Shea, M., and Benjamin, P.R. (2011). Different circuit and monoamine mechanisms consolidate long-term memory in aversive and reward classical conditioning. *Eur. J. Neurosci.* 33, 143–152.
- Kim, J.J., and Fanselow, M.S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256, 675–677.
- Kim, Y.-C., Lee, H.-G., Seong, C.-S., and Han, K.-A. (2003). Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr. Patterns* 3, 237–245.
- Kitamoto, T. (2001). Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. *J. Neurobiol.* 47, 81–92.
- Klappenbach, M., Maldonado, H., Locatelli, F., and Kaczer, L. (2012). Opposite actions of dopamine on aversive and appetitive memories in the crab. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 19, 73–83.
- Klappenbach, M., Kaczer, L., and Locatelli, F. (2013). Dopamine interferes with appetitive long-term memory formation in honey bees. *Neurobiol. Learn. Mem.* 106, 230–237.
- Krashes, M.J., and Waddell, S. (2008). Rapid consolidation to a radish and protein synthesis-dependent long-term memory after single-session appetitive olfactory conditioning in *Drosophila*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 3103–3113.
- Krashes, M.J., and Waddell, S. (2011a). *Drosophila* appetitive olfactory conditioning. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011, pdb.prot5609.
- Krashes, M.J., and Waddell, S. (2011b). *Drosophila* aversive olfactory conditioning. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011, pdb.prot5608.
- Krashes, M.J., and Waddell, S. (2011c). *Drosophila* appetitive olfactory conditioning. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011, pdb.prot5609.



- Krashes, M.J., DasGupta, S., Vreede, A., White, B., Armstrong, J.D., and Waddell, S. (2009). A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in *Drosophila*. *Cell* 139, 416–427.
- Kume, K., Kume, S., Park, S.K., Hirsh, J., and Jackson, F.R. (2005). Dopamine Is a Regulator of Arousal in the Fruit Fly. *J. Neurosci.* 25, 7377–7384.
- Lee, Y., Kim, S.H., and Montell, C. (2010). Avoiding DEET through insect gustatory receptors. *Neuron* 67, 555–561.
- Lewis, L.P.C., Siju, K.P., Aso, Y., Friedrich, A.B., Bulteel, A.J.B., Rubin, G.M., and Grunwald Kadow, I.C. (2015). A Higher Brain Circuit for Immediate Integration of Conflicting Sensory Information in *Drosophila*. *Curr. Biol. CB* 25, 2203–2214.
- Lima, S.Q., and Miesenböck, G. (2005). Remote Control of Behavior through Genetically Targeted Photostimulation of Neurons. *Cell* 121, 141–152.
- Lin, S., Oswald, D., Chandra, V., Talbot, C., Huetteroth, W., and Waddell, S. (2014). Neural correlates of water reward in thirsty *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 17, 1536–1542.
- Liu, C., Plačais, P.-Y., Yamagata, N., Pfeiffer, B.D., Aso, Y., Friedrich, A.B., Siwanowicz, I., Rubin, G.M., Preat, T., and Tanimoto, H. (2012). A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in *Drosophila*. *Nature* 488, 512–516.
- Liu, G., Seiler, H., Wen, A., Zars, T., Ito, K., Wolf, R., Heisenberg, M., and Liu, L. (2006). Distinct memory traces for two visual features in the *Drosophila* brain. *Nature* 439, 551–556.
- Locatelli, F., and Romano, A. (2005). Differential activity profile of cAMP-dependent protein kinase isoforms during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol. Learn. Mem.* 83, 232–242.
- Locatelli, F., Maldonado, H., and Romano, A. (2002). Two critical periods for cAMP-dependent protein kinase activity during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol. Learn. Mem.* 77, 234–249.
- Locatelli, F., Bundrock, G., and Müller, U. (2005). Focal and temporal release of glutamate in the mushroom bodies improves olfactory memory in *Apis mellifera*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 11614–11618.
- Locatelli, F.F., Fernandez, P.C., Villareal, F., Muezzinoglu, K., Huerta, R., Galizia, C.G., and Smith, B.H. (2013). Nonassociative plasticity alters competitive interactions among mixture components in early olfactory processing. *Eur. J. Neurosci.* 37, 63–79.
- Lorenz, K. (1981). *The Foundations of Ethology* (Springer Science & Business Media).
- Lozada, M., Romano, A., and Maldonado, H. (1990). Long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiol. Behav.* 47, 35–41.
- Maldonado, H., Romano, A., and Tomsic, D. (1997). Long-term habituation (LTH) in the crab *Chasmagnathus*: a model for behavioral and mechanistic studies of memory. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 30, 813–826.

- Mao, Z., and Davis, R.L. (2009). Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. *Front. Neural Circuits* 3, 5.
- Marsden, C.D. (1992). Dopamine and basal ganglia disorders in humans. *Semin. Neurosci.* 4, 171–178.
- Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J.-C., and Giurfa, M. (2012). Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees: A step toward standardized procedures. *J. Neurosci. Methods* 211, 159–167.
- Matsumoto, Y., Sandoz, J.-C., Devaud, J.-M., Lormant, F., Mizunami, M., and Giurfa, M. (2014). Cyclic nucleotide-gated channels, calmodulin, adenylyl cyclase, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II are required for late, but not early, long-term memory formation in the honeybee. *Learn. Mem.* 21, 272–286.
- Maza, F.J., Sztarker, J., Shkedy, A., Peszano, V.N., Locatelli, F.F., and Delorenzi, A. (2016). Context-dependent memory traces in the crab's mushroom bodies: Functional support for a common origin of high-order memory centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E7957–E7965.
- Menzel, R. (2001). Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 8, 53–62.
- Menzel, R. (2012). The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 758–768.
- Mercer, A.R. (2008). A bee-line into learning and memory mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 3521–3524.
- Merlo, E., and Romano, A. (2007). Long-term memory consolidation depends on proteasome activity in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience* 147, 46–52.
- Merlo, E., Freudenthal, R., Maldonado, H., and Romano, A. (2005). Activation of the transcription factor NF-kappaB by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 12, 23–29.
- Misanin, J.R., Miller, R.R., and Lewis, D.J. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160, 554–555.
- Mizunami, M., and Matsumoto, Y. (2010). Roles of aminergic neurons in formation and recall of associative memory in crickets. *Front. Behav. Neurosci.* 4, 172.
- Monastirioti, M., Linn, C.E., and White, K. (1996). Characterization of *Drosophila* tyramine beta-hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 3900–3911.
- Montague, S.A., and Baker, B.S. (2016). Memory Elicited by Courtship Conditioning Requires Mushroom Body Neuronal Subsets Similar to Those Utilized in Appetitive Memory. *PLoS One* 11, e0164516.
- Mota, T., Kreissl, S., Carrasco Durán, A., Lefer, D., Galizia, G., and Giurfa, M. (2016). Synaptic Organization of Microglomerular Clusters in the Lateral and Medial Bulbs of the Honeybee Brain. *Front. Neuroanat.* 10, 103.
- Müller, U. (2000). Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron* 27, 159–168.

Mustard, J.A., Blenau, W., Hamilton, I.S., Ward, V.K., Ebert, P.R., and Mercer, A.R. (2003a). Analysis of two D1-like dopamine receptors from the honey bee *Apis mellifera* reveals agonist-independent activity. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *113*, 67–77.

Mustard, J.A., Blenau, W., Hamilton, I.S., Ward, V.K., Ebert, P.R., and Mercer, A.R. (2003b). Analysis of two D1-like dopamine receptors from the honey bee *Apis mellifera* reveals agonist-independent activity. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *113*, 67–77.

Mustard, J.A., Pham, P.M., and Smith, B.H. (2010). Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee. *J. Insect Physiol.* *56*, 422–430.

Mustard, J.A., Dews, L., Brugato, A., Dey, K., and Wright, G.A. (2012). Consumption of an acute dose of caffeine reduces acquisition but not memory in the honey bee. *Behav. Brain Res.* *232*, 217–224.

Nader, K., Schafe, G.E., and Le Doux, J.E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* *406*, 722–726.

Nall, A., and Sehgal, A. (2014). Monoamines and sleep in *Drosophila*. *Behav. Neurosci.* *128*, 264–272.

Neuser, K., Triphan, T., Mronz, M., Poeck, B., and Strauss, R. (2008). Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. *Nature* *453*, 1244–1247.

Orchard, I., Carlisle, J.A., Loughton, B.G., Gole, J.W., and Downer, R.G. (1982). In vitro studies on the effects of octopamine on locust fat body. *Gen. Comp. Endocrinol.* *48*, 7–13.

Osborne, R.H. (1996). Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. *Pharmacol. Ther.* *69*, 117–142.

Owald, D., and Waddell, S. (2015). Olfactory learning skews mushroom body output pathways to steer behavioral choice in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* *35*, 178–184.

Owald, D., Felsenberg, J., Talbot, C.B., Das, G., Perisse, E., Huetteroth, W., and Waddell, S. (2015). Activity of defined mushroom body output neurons underlies learned olfactory behavior in *Drosophila*. *Neuron* *86*, 417–427.

Pan, Y., Zhou, Y., Guo, C., Gong, H., Gong, Z., and Liu, L. (2009). Differential roles of the fan-shaped body and the ellipsoid body in *Drosophila* visual pattern memory. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* *16*, 289–295.

Pankiw, T., and Page, R.E., Jr (1999). The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. [A]* *185*, 207–213.

Pedetta, S., Kaczer, L., and Maldonado, H. (2010). Individual aggressiveness in the crab *Chasmagnathus*: Influence in fight outcome and modulation by serotonin and octopamine. *Physiol. Behav.* *101*, 438–445.

Pedreira, M.E., and Maldonado, H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* *38*, 863–869.

Pedreira, M.E., Dimant, B., Tomsic, D., Quesada-Allue, L.A., and Maldonado, H. (1995). Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *52*, 385–395.

- Pedreira, M.E., Dimant, B., and Maldonado, H. (1996). Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *54*, 611–617.
- Pedreira, M.E., Pérez-Cuesta, L.M., and Maldonado, H. (2002). Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 8305–8311.
- Pedreira, M.E., Pérez-Cuesta, L.M., and Maldonado, H. (2004). Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* *11*, 579–585.
- Pendleton, R.G., Rasheed, A., Sardina, T., Tully, T., and Hillman, R. (2002). Effects of tyrosine hydroxylase mutants on locomotor activity in *Drosophila*: a study in functional genomics. *Behav. Genet.* *32*, 89–94.
- Pereyra, P., González Portino, E., and Maldonado, H. (2000). 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*, 119–134.
- Pérez-Cuesta, L.M., and Maldonado, H. (2009). Memory reconsolidation and extinction in the crab: mutual exclusion or coexistence? *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* *16*, 714–721.
- Prier, K.R., Beckman, O.H., and Tublitz, N.J. (1994). Modulating a modulator: biogenic amines at subthreshold levels potentiate peptide-mediated cardioexcitation of the heart of the tobacco hawkmoth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* *197*, 377–391.
- Puhl, J.G., and Mesce, K.A. (2008). Dopamine activates the motor pattern for crawling in the medicinal leech. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 4192–4200.
- Quinn, W.G., Harris, W.A., and Benzer, S. (1974). Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *71*, 708–712.
- Rankin, C.H. (2000). Context conditioning in habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Behav. Neurosci.* *114*, 496–505.
- Rath, L., Giovanni Galizia, C., and Szyszka, P. (2011). Multiple memory traces after associative learning in the honey bee antennal lobe. *Eur. J. Neurosci.* *34*, 352–360.
- Rescorla, R.A. (1988). Pavlovian conditioning. It's not what you think it is. *Am. Psychol.* *43*, 151–160.
- Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., Iché-Torres, M., Cassar, M., Strauss, R., Preat, T., et al. (2011). Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 834–839.
- Roeder, T. (2005). Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu. Rev. Entomol.* *50*, 447–477.
- Romano, A., Locatelli, F., Delorenzi, A., Pedreira, M.E., and Maldonado, H. (1996). Effects of activation and inhibition of cAMP-dependent protein kinase on long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res.* *735*, 131–140.

- Romano, A., Locatelli, F., Freudenthal, R., Merlo, E., Feld, M., Ariel, P., Lemos, D., Federman, N., and Fustiñana, M.S. (2006). Lessons from a crab: molecular mechanisms in different memory phases of *Chasmagnathus*. *Biol. Bull.* 210, 280–288.
- Roozendaal, B., Nguyen, B.T., Power, A.E., and McGaugh, J.L. (1999). Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11642–11647.
- Rosenthal, R., and Rosnow, R.L. (1985). *Contrast Analysis: Focused Comparisons in the Analysis of Variance* (CUP Archive).
- Rybak, J., Kuß, A., Lamecker, H., Zachow, S., Hege, H.-C., Lienhard, M., Singer, J., Neubert, K., and Menzel, R. (2010). The Digital Bee Brain: Integrating and Managing Neurons in a Common 3D Reference System. *Front. Syst. Neurosci.* 4.
- Sandeman, D.C. (1967). The vascular circulation in the brain, optic lobes and thoracic ganglia of the crab *Carcinus*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 168, 82–90.
- Sara, S.J. (2000). Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 7, 73–84.
- Sawin, E.R., Ranganathan, R., and Horvitz, H.R. (2000). *C. elegans* Locomotory Rate Is Modulated by the Environment through a Dopaminergic Pathway and by Experience through a Serotonergic Pathway. *Neuron* 26, 619–631.
- Scavone, C., Mckee, M., and Nathanson, J.A. (1994). Monoamine uptake in insect synaptosomal preparations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 589–597.
- Scheiner, R., Plückhahn, S., Oney, B., Blenau, W., and Erber, J. (2002). Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. *Behav. Brain Res.* 136, 545–553.
- Schultz, W. (2010). Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behav. Brain Funct. BBF* 6, 24.
- Schulz, D.J., and Robinson, G.E. (2001). Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *J. Comp. Physiol. [A]* 187, 53–61.
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelín, F., Birman, S., and Heisenberg, M. (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 10495–10502.
- Schwärzel, M., and Müller, U. (2006). Dynamic memory networks: dissecting molecular mechanisms underlying associative memory in the temporal domain. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 989–998.
- Sidhu, A. (1998). Coupling of D1 and D5 dopamine receptors to multiple G proteins: Implications for understanding the diversity in receptor-G protein coupling. *Mol. Neurobiol.* 16, 125–134.

- Sinakevitch, I.T., Smith, A.N., Locatelli, F., Huerta, R., Bazhenov, M., and Smith, B.H. (2013). *Apis mellifera* octopamine receptor 1 (AmOA1) expression in antennal lobe networks of the honey bee (*Apis mellifera*) and fruit fly (*Drosophila melanogaster*). *Front. Syst. Neurosci.* 7, 70.
- Sneddon, L.U., Taylor, A.C., Huntingford, F.A., and Watson, D.G. (2000). Agonistic behaviour and biogenic amines in shore crabs *Carcinus maenas*. *J. Exp. Biol.* 203, 537–545.
- Sombati, S., and Hoyle, G. (1984). Generation of specific behaviors in a locust by local release into neuropil of the natural neuromodulator octopamine. *J. Neurobiol.* 15, 481–506.
- Stevenson, P.A., Hofmann, H.A., Schoch, K., and Schildberger, K. (2000). The fight and flight responses of crickets depleted of biogenic amines. *J. Neurobiol.* 43, 107–120.
- Suo, S., Culotti, J.G., and Van Tol, H.H.M. (2009). Dopamine counteracts octopamine signalling in a neural circuit mediating food response in *C. elegans*. *EMBO J.* 28, 2437–2448.
- Sztarker, J., Strausfeld, N.J., and Tomsic, D. (2005). Organization of optic lobes that support motion detection in a semiterrestrial crab. *J. Comp. Neurol.* 493, 396–411.
- Takeda, K. (1961). Classical conditioned response in the honey bee. *J. Insect Physiol.* 6, 168–179.
- Tempel, B.L., Bonini, N., Dawson, D.R., and Quinn, W.G. (1983). Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 1482–1486.
- Thompson, R.F., and Spencer, W.A. (1966). Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol. Rev.* 73, 16–43.
- Thorpe, W.H. (1963). *Learning and instinct in animals*. (London: Methuen).
- Tomsic, D., de Astrada, M.B., Sztarker, J., and Maldonado, H. (2009). Behavioral and neuronal attributes of short- and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92, 176–182.
- Trannoy, S., Redt-Clouet, C., Dura, J.-M., and Preat, T. (2011). Parallel processing of appetitive short- and long-term memories in *Drosophila*. *Curr. Biol. CB* 21, 1647–1653.
- Tully, T., and Quinn, W.G. (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. [A]* 157, 263–277.
- Unoki, S., Matsumoto, Y., and Mizunami, M. (2005). Participation of octopaminergic reward system and dopaminergic punishment system in insect olfactory learning revealed by pharmacological study. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1409–1416.
- Unoki, S., Matsumoto, Y., and Mizunami, M. (2006). Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in mediating reward and punishment signals in insect visual learning. *Eur. J. Neurosci.* 24, 2031–2038.
- Utting, M., Agricola, H., Sandeman, R., and Sandeman, D. (2000). Central complex in the brain of crayfish and its possible homology with that of insects. *J. Comp. Neurol.* 416, 245–261.
- Vallone, D., Picetti, R., and Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 125–132.

- Vergoz, V., Roussel, E., Sandoz, J.-C., and Giurfa, M. (2007). Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. *PloS One* 2, e288.
- Waddell, S. (2013). Reinforcement signalling in *Drosophila*; dopamine does it all after all. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 324–329.
- Wagener-Hulme, C., Kuehn, J.C., Schulz, D.J., and Robinson, G.E. (1999). Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. *J. Comp. Physiol. [A]* 184, 471–479.
- Wierenga, J.M., and Hollingworth, R.M. (1990). Octopamine uptake and metabolism in the insect nervous system. *J. Neurochem.* 54, 479–489.
- Wolff, G.H., and Strausfeld, N.J. (2015). Genealogical correspondence of mushroom bodies across invertebrate phyla. *Curr. Biol. CB* 25, 38–44.
- Wood, D.E., and Derby, C.D. (1996). Distribution of dopamine-like immunoreactivity suggests a role for dopamine in the courtship display behavior of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Cell Tissue Res.* 285, 321–330.
- Wright, G.A., Mustard, J.A., Simcock, N.K., Ross-Taylor, A.A.R., McNicholas, L.D., Popescu, A., and Marion-Poll, F. (2010). Parallel reinforcement pathways for conditioned food aversions in the honeybee. *Curr. Biol. CB* 20, 2234–2240.
- Wustenberg, D., Gerber, B.T., and Menzel, R. (1998). Long- but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2742–2745.
- Yu, D., Akalal, D.-B.G., and Davis, R.L. (2006). *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron* 52, 845–855.
- Zhiwei Wang, Hayakawa, Y., and Downer, R.G.H. (1990). Factors influencing cyclic AMP and diacylglycerol levels in fat body of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 20, 325–330.
- Zou, S., Li, L., Pei, L., Vukusic, B., Van Tol, H.H.M., Lee, F.J.S., Wan, Q., and Liu, F. (2005). Protein-protein coupling/uncoupling enables dopamine D2 receptor regulation of AMPA receptor-mediated excitotoxicity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 4385–4395.