

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

**ROL DE LA NEUROMODULACIÓN DOPAMINÉRGICA EN
EL RECONOCIMIENTO DE CONTEXTO**

Carolina Paula – L.U. 1063517
Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Pagani, Mario Rafael

**Laboratorio de Genética del Aprendizaje. Departamento de Fisiología.
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. IFIBIO-Houssay-
CONICET.**

Co-Tutor:

Pérez, Adriana Alicia
UADE

28 de junio de 2021



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

AGRADECIMIENTOS

A mi director Rafael Pagani, por haberme guiado durante todo este proyecto, por estar siempre abierto a escuchar mis opiniones y, sobre todo, por la paciencia.

Al equipo del Laboratorio de Genética del Aprendizaje, por brindarme el espacio y los recursos para realizar esta tesis.

A mi familia, por su cariño y apoyo incondicional; por ser mi soporte en este proceso largo y desafiante (y en muchos otros ámbitos de mi vida).

A Emi, por hacer los mejores planes de acción y por confiar en mí cuando yo no lo hacía.

A mis compañeros de curso y amigos, en especial a Lucía y Mateo, porque recorrer este camino sin ellos hubiera sido infinitamente menos divertido.

RESUMEN

La habituación del comportamiento exploratorio en un campo abierto no comparte los mismos mecanismos que el condicionamiento clásico y la habituación refleja. Aunque el condicionamiento clásico ha sido ampliamente estudiado, los mecanismos involucrados en la habituación a un contexto y el reconocimiento de este son esencialmente desconocidos. Por otra parte, distintos grupos de neuronas dopaminérgicas controlan la actividad locomotora y participan en procesos de aprendizaje y memoria.

En el presente trabajo analizamos si los grupos de neuronas dopaminérgicas PAM y PPL1 participan en la habituación a un contexto y en la memoria de reconocimiento en una segunda exposición al mismo. A tal efecto, se definió un paradigma de aprendizaje contextual y se realizaron ensayos de manipulación sobre los grupos de neuronas seleccionados.

Nuestros resultados sugieren que el paradigma de entrenamiento propuesto es adecuado para estudiar habituación y memoria al contexto. En cuanto a los grupos neuronales examinados, ni PAM ni PPL1 parecen tener un rol en estos procesos, sin embargo, no se excluyó la participación de otros grupos de neuronas dopaminérgicas. Para alcanzar resultados más concluyentes se considera necesario continuar el análisis ampliando el tamaño muestral y/o utilizando un protocolo de entrenamiento más fuerte. La determinación de los grupos de neuronas dopaminérgicas que participan en habituación y memoria de contexto, así como el posterior entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes, podrían proveer enfoques terapéuticos para patologías en las que estos comportamientos se encuentran afectados.

ABSTRACT

Habituation of exploratory behavior in an open field does not share the same mechanisms as classical conditioning and reflexive habituation. Although classical conditioning has been extensively studied, the mechanisms involved in habituation to and recognition of a context are essentially unknown. On the other hand, different groups of dopaminergic neurons control locomotor activity and participate in learning and memory processes.

In the present work we analyzed whether the dopaminergic neurons of the PAM and PPL1 groups participate in habituation to a context and in the recognition memory to that context. To this end, we defined a paradigm of contextual learning and manipulations were performed on the selected groups of neurons.

Our results suggest that the proposed training paradigm is suitable for studying habituation and memory to a context. Regarding the neuronal groups examined, neither PAM nor PPL1 seem to play a role in these processes, however, we did not exclude the participation of other groups of dopaminergic neurons. To achieve more conclusive results, it is necessary to continue the analysis by expanding the sample size and / or using a stronger training protocol. The determination of the groups of dopaminergic neurons that participate in habituation and context memory, as well as the subsequent understanding of the underlying molecular mechanisms, could provide therapeutic approaches for pathologies in which these behaviors are affected.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	7
ANTECEDENTES.....	8
Actividad exploratoria	8
Habitación	9
Memoria de reconocimiento.....	10
<i>Drosophila</i> como modelo para el estudio del comportamiento	10
Sistema GAL4/UAS.....	11
Sistemas shibire y TrpA1 termosensibles	12
Aprendizaje y memoria en <i>Drosophila</i> : condicionamiento clásico	13
Mushroom Body (MB): un centro de aprendizaje y memoria en <i>Drosophila</i>	16
Neuronas dopaminérgicas asociadas a Mushroom Body	17
Mecanismos moleculares del aprendizaje asociativo	18
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Nomenclatura	22
Ciclo de vida de <i>Drosophila</i>	22
Cría y mantenimiento de los animales	23
Líneas utilizadas.....	23
Cruzamientos genéticos.....	24
Ensayo de reconocimiento de contexto	25
Protocolos utilizados	26

Ensayo de especificidad de la memoria	26
Ensayo con inducción térmica.....	26
Equipamiento y condiciones experimentales	27
Análisis del comportamiento.....	28
Normalización de los datos	29
Habituaación al contexto.....	29
Memoria de reconocimiento de contexto	29
Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS	31
<i>Sección A. Ensayo conductual y caracterización del comportamiento del animal de genotipo silvestre.....</i>	<i>31</i>
Habituaación de la actividad exploratoria durante el entrenamiento	31
Memoria de reconocimiento de contexto	35
Protocolos de dos sesiones de entrenamiento.....	38
Relación entre la habituaación y la memoria al contexto	41
Especificidad de la memoria de contexto.....	42
Comparación con mutante clásico de memoria: <i>dnc</i> ¹	44
<i>Sección B. Efecto de la manipulación de la actividad neuronal sobre la actividad locomotora y los niveles de aprendizaje y memoria.....</i>	<i>48</i>
Prueba de inducción térmica bajo control regulatorio del sistema GAL4/UAS	48
Neuromodulación dopaminérgica sobre MB	49
Bloqueo de la transmisión sináptica en las neuronas del grupo PAM	49
Aumento de la transmisión sináptica en las neuronas del grupo PAM.....	53
Bloqueo de la transmisión sináptica en las neuronas del grupo PPL1	57
Aumento de la transmisión sináptica en las neuronas del grupo PPL1.....	60
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	64

Sección A. Ensayo conductual y caracterización del comportamiento del animal de genotipo silvestre..... 64

Sección B. Efecto de la manipulación de la actividad neuronal sobre la actividad locomotora y los niveles de aprendizaje y memoria..... 65

BIBLIOGRAFÍA..... 68

INTRODUCCIÓN

Cuando un animal encuentra un nuevo ambiente, despliega una alta actividad exploratoria que contribuye al conocimiento de este. Durante esta actividad exploratoria participan mecanismos de locomoción, motivación, aprendizaje, memoria y olvido. Distintos grupos de neuronas dopaminérgicas están involucrados en estos mecanismos (Gainetdinov, Jones, et al. 1999; Berry, Cervantes-Sandoval, et al. 2012; 2015).

En *Drosophila* se observó que neuronas dopaminérgicas del grupo PPL1 y PAM participan como refuerzo en el condicionamiento aversivo y apetitivo (Aso, Herb, et al. 2012; Liu, Plaçais, et al. 2012). Aunque se han identificado numerosos mecanismos neuronales y moleculares que intervienen en el aprendizaje asociativo, aquellos que participan en habituación motivada y reconocimiento de contexto aún han sido poco estudiados. En los siguientes apartados se introducen los conceptos necesarios para comenzar a estudiar estos procesos.

ANTECEDENTES

Actividad exploratoria

A través del movimiento, los animales pueden reunir información acerca de un ambiente novedoso para localizar recursos y evitar peligros. Sin embargo, la locomoción es una respuesta biológica compleja que abarca procesamiento sensorial, integración de estímulos, funciones ejecutivas y respuestas motoras (Crusio y Van Abeelen 1986; Liu, Davis, et al. 2007).

La actividad locomotora en un campo abierto es uno de los comportamientos más antiguamente estudiados (Walsh y Cummins 1976). Al situarse en campo abierto, muchas especies exhiben distintos perfiles de actividad locomotora. *Drosophila melanogaster*, varias especies de roedores, pollos, gatos domésticos y perros, todos demuestran un elevado nivel de actividad inicial, seguido por un rápido descenso hacia un nivel de deambulación más bajo y estable (Glickman y Hartz 1964; Connolly 1967; Candland y Nagy 1969). Esta elevada actividad inicial es independiente de la manipulación previa a ubicar el animal en la arena y es proporcional al tamaño de la arena (a menor superficie, menor actividad inicial), sugiriendo que la exploración es el mayor componente de la primera etapa. Experimentos en *Drosophila* inhibiendo farmacológica o genéticamente la neurotransmisión dopaminérgica sugieren que ésta no participa en la actividad inicial elevada. Sin embargo, se observó una disminución significativa en la deambulación posterior al reducir el nivel de dopamina, indicando que sí está involucrada en la regulación de la actividad siguiente a la etapa inicial (Liu, Davis, et al. 2007). Cabe destacar que Liu et al., (2007) utilizaron TH-GAL4 para dirigir la expresión de la toxina tetánica que bloqueaba la neurotransmisión. Este patrón de expresión no incluye al grupo PAM, de forma que no involucra al mayor grupo de neuronas dopaminérgicas (Liu, Plaçais, et al. 2012).

Otra característica de la actividad exploratoria es una tendencia a pasar la mayor parte del tiempo cerca del borde de la arena. Este seguimiento de las paredes podría ser el resultado de una interacción compleja que incluye respuestas tanto tigmotáxicas (atracción a tocar las paredes de la arena) como centrofóbicas (miedo a permanecer en el centro de la arena), y en muchas especies podría representar una búsqueda de seguridad (Treit y Fundytus 1989; Choleris, Thomas, et al. 2001). En roedores, la evasión de la zona central depende de factores externos tales como la visión y el nivel de iluminación, así como de la estimulación tigmotáxica

a través de los bigotes (Morato y Castrechini 1989; Cardenas, Lamprea, et al. 2001). De manera similar, el seguimiento de paredes en *Periplaneta americana* se basa tanto en la estimulación tigmotáctica de la antena como en la guía visual (Creed y Miller 1990). La presencia de componentes visuales y tigmotáxicos acoplados también ha sido propuesta para el comportamiento de *Drosophila* en la arena vacía (Besson y Martin 2005; Liu, Davis, et al. 2007). En arenas cuadradas, *Drosophila* tipo silvestre muestra una preferencia por las esquinas, lo que podría interpretarse como búsqueda de resguardo (Soibam, Mann, et al. 2012).

Moscas con impedimentos visuales mostraron defectos en el descenso de la actividad locomotora. Consistentemente, este defecto puede ser rescatado al aumentar el contraste del borde de la arena, sugiriendo que la disminución de la actividad se basa en la detección visual de los bordes. El borde de la arena es, por lo tanto, un objeto primario de exploración para *Drosophila* (Liu, Davis, et al. 2007).

Habitación

Un proceso cognitivo que puede detectarse durante la actividad exploratoria es la habitación. Describe el decaimiento de la respuesta comportamental ante un estímulo sensorial repetitivo no amenazante. Así, provee un mecanismo importante de filtrado sensorial que permite ignorar los estímulos irrelevantes en favor de los relevantes (Poon y Young 2006). La habitación tiene un claro valor evolutivo porque contribuye a la adaptación de un organismo al ambiente. Se cree que es un prerrequisito para otras formas de aprendizaje (Rankin, Abrams, et al. 2009). En humanos, la disrupción de la habitación correlaciona con déficits cognitivos y se ha observado en pacientes con desórdenes como esquizofrenia y trastornos del espectro autista (Geyer y Braff 1982; Ludewig, Geyer, et al. 2003; Ornitz, Lane, et al. 1993; Perry, Minassian, et al. 2007). Mientras que la habitación ha sido bien caracterizada a nivel comportamental (Thompson y Spencer 1966; Rankin, Abrams, et al. 2009), los mecanismos celulares y moleculares subyacentes aún no son completamente comprendidos.

Históricamente, la habitación se ha dividido en dos categorías: habitación refleja (respuesta involuntaria ante un estímulo repetitivo) y habitación del comportamiento motivado (comportamiento dirigido hacia o en contra de un estímulo). La habitación refleja es considerada una de las formas más básicas de memoria, mientras que la habitación del comportamiento motivado involucra procesos más complejos. Estos dos tipos de habitación

se basan en distintos mecanismos moleculares. Estudios previos mostraron que los mecanismos de habituación refleja son similares en ratones, *C. elegans* y *Drosophila* (Bozorgmehr, Ardiel, et al. 2013). Por otro lado, estos mecanismos parecerían no tener un rol en habituación motivada, como es el caso de la habituación al contexto, ni en memoria al contexto en una segunda presentación (Typlt, Mirkowski, et al. 2013). Mientras que la habituación del comportamiento motivado es dependiente de mecanismos colinérgicos, la habituación del comportamiento reflejo no lo es (Williams, Hamilton, et al. 1974; 1975). Esta evidencia apoya la idea de que no hay mecanismos universales, sino probablemente diferentes mecanismos que median la habituación de los distintos comportamientos, y que estos estarían altamente conservados a través de la evolución.

Memoria de reconocimiento

La memoria de reconocimiento es la capacidad de reconocer eventos u objetos que se han experimentado previamente (Mandler 1980; Brown y Aggleton 2001). El proceso de reconocimiento generalmente se considera compuesto por al menos dos componentes: uno es el juicio de familiaridad de los elementos, y otro la recolección de información contextual (espacial o temporal) donde esos elementos fueron encontrados (Brown y Aggleton 2001; Yonelinas, Kroll, et al. 2002).

Luego de exponer a un animal a un contexto en el que había habitado, una segunda exposición a ese contexto puede revelar memoria de reconocimiento al mismo. En ratones se observó que la actividad inicial al situarlos en una arena explorada 5 días antes fue menor que la actividad inicial al exponerlos por primera vez, mostrando una memoria al contexto que se mantiene en el tiempo (Typlt, Mirkowski, et al. 2013).

***Drosophila* como modelo para el estudio del comportamiento**

El estudio de las bases genéticas del comportamiento animal comenzó en la década del 60 con los trabajos pioneros de Seymour Benzer en *Drosophila* (Benzer 1967; Konopka y Benzer 1971). Benzer identificó mutantes para una amplia variedad de características, entre ellos, los mutantes de aprendizaje y memoria *rutabaga* y *dunce* (Dudai, Jan, et al. 1976; Livingstone, Sziber, et al. 1984). *Rutabaga* (*rut*) codifica una adenilil ciclasa de membrana activable por Ca^{2+} /calmodulina que sintetiza el AMPc. *Dunce* (*dnc*) codifica una fosfodiesterasa

específica de AMP cíclico (AMPC), responsable de la degradación del AMPC. Ambos componentes tienen un rol fundamental en el aprendizaje y en la plasticidad neuronal (Dudai, Jan, et al. 1976; Benzer 1971).

Por otro lado, la secuenciación del genoma de *Drosophila* (Berkeley *Drosophila* Genome Project, 2000) permitió identificar que el 62% de los genes asociados a enfermedades humanas parecen estar conservados en la mosca de la fruta. El descubrimiento de este alto grado de homología contribuyó al desarrollo de modelos de desórdenes cognitivos en *Drosophila* (Fortini y Bonini 2000; Inlow y Restifo 2004).

Además de una gran cantidad de mutantes y de modelos de desórdenes cognitivos, existe también una variedad de sistemas de expresión que posibilitan la expresión de transgenes de forma precisa con un control temporal y/o tisular (ej.: GAL4/UAS, GeneSwitch, TARGET) (Brand y Perrimon 1993; Roman, Endo, et al. 2001; McGuire, Le, et al. 2003). Asimismo, la organización de colecciones como Bloomington stock center y Vienna *Drosophila* Resource Center, y la disponibilidad de recursos informáticos como Flybase, vuelven a *Drosophila* un modelo particularmente atractivo para el estudio del comportamiento y de los procesos asociados a aprendizaje y memoria.

Sistema GAL4/UAS

Una herramienta de uso muy común en *Drosophila* es el sistema binario GAL4/UAS, que por medio del factor de transcripción de levaduras (GAL4) posibilita la expresión de transgenes bajo el control regulatorio de la secuencia promotora UAS (Brand y Perrimon 1993). Para obtener la expresión del transgén de interés en el patrón deseado se debe cruzar una línea que posea la secuencia que codifica para GAL4 bajo el promotor de tejido específico (ej.: neuronas dopaminérgicas identificadas por el promotor de tirosina-hidroxilasa (TH)) con la línea que contiene el transgén de interés bajo la secuencia UAS (ej.: *UAS-shi^{ts1}*). La descendencia de esa cruce (F1, o filial 1) que contenga las secuencias promotor-GAL4 y UAS-transgén, expresará la proteína codificada por el transgén de interés en el patrón deseado (Figura 1). Este sistema permite controlar la expresión espacialmente, pero no es para manipular temporalmente la expresión de los transgenes de interés.

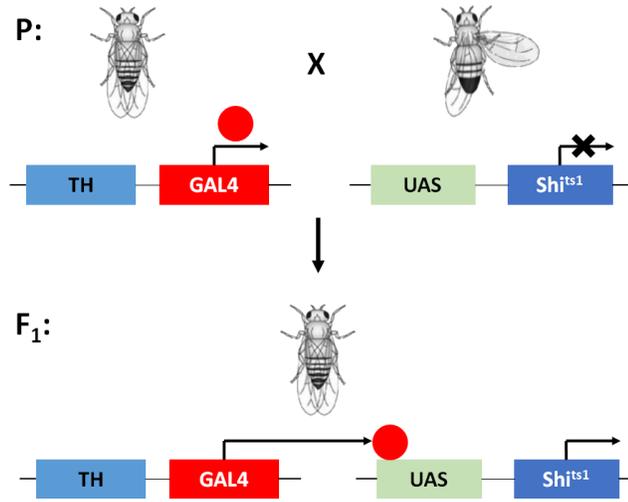


Figura 1. Representación esquemática del sistema de expresión binario GAL4/UAS. Líneas parentales (P) que expresan el factor de transcripción GAL4 (círculo) bajo el promotor de tirosina-hidroxilasa (TH) y contienen el transgén termosensible *shibire* (*shi^{ts1}*) bajo la secuencia promotora UAS son cruzadas. La generación resultante (F1) expresa el transgén *shi^{ts1}* en el patrón TH (neuronas dopaminérgicas) (Esquema tomado de: Tesis de licenciatura de Álvarez, 2017).

Sistemas shibire y TrpA1 termosensibles

El alelo *UAS-shibire^{ts1}* es una de las herramientas más utilizadas para manipular neuronas específicas y analizar su papel en funciones motoras, sensoriales o cognitivas. *Shibire* codifica para dineína, una proteína necesaria para el reciclado vesicular en terminales sinápticos. La proteína *shibire^{ts1}* se desestabiliza a 29 °C, y bloquea la transmisión sináptica (Kitamoto 2001). De esta forma *UAS-shibire^{ts1}* en combinación con un transgén GAL4 de interés (ej.: *TH-GAL4*) puede expresarse en el patrón TH y bloquear la transmisión sináptica (Figura 2). Uno de los aspectos más atractivos de esta herramienta es que la transmisión sináptica se bloquea luego de 2 a 8 minutos a temperaturas mayores a 29 °C y su efecto es completamente reversible en minutos.

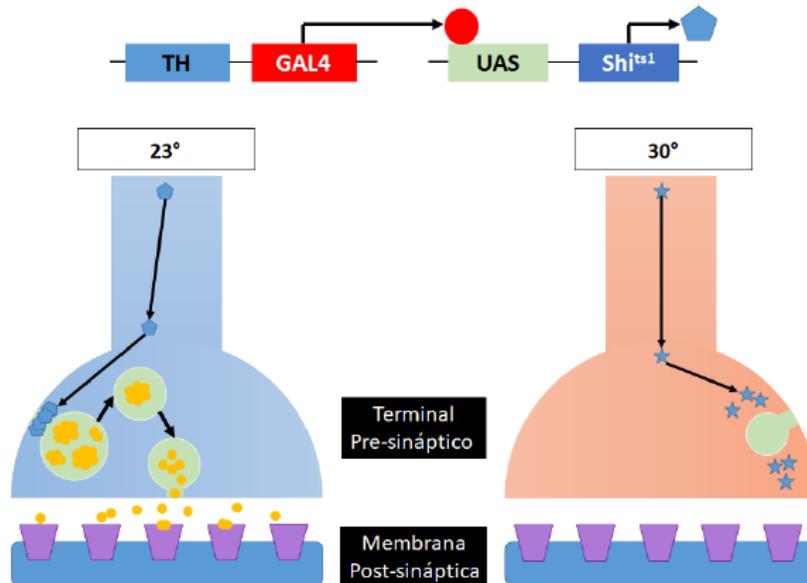


Figura 2. Representación esquemática del sistema *shibire* termosensible. Animales que expresan *shibire^{ts1}* (hexágono) en el patrón TH (neuronas dopaminérgicas que expresan tirosin-hidroxilasa) son criados a 23 °C (izquierda). En estas condiciones el reciclado vesicular y la transmisión sináptica son normales. Al aumentar la temperatura a 30 °C, el producto de *shit^{ts1}* es rápidamente desestabilizado (estrellas) y la transmisión sináptica es interrumpida. Este fenómeno es reversible al volver a la temperatura inicial (23 °C) (Esquema tomado de: Tesis de licenciatura de Álvarez, 2017).

El receptor de potencial transitorio A1 (*TrpA1*) es un canal catiónico con conductancias altamente dependientes de la temperatura que funciona como sensor molecular de calor. La expresión de este tipo de receptor puede hacer que la excitabilidad celular aumente con el aumento de temperatura (Hamada, Rosenzweig, et al. 2008). *UAS-TrpA1* en combinación con un transgén GAL4 puede utilizarse para expresar *TrpA1* en un patrón determinado y así aumentar la transmisión sináptica con control espaciotemporal. Al igual que ocurre con *shit^{ts1}*, el efecto producido por la inducción térmica de *TrpA1* es reversible luego de algunos minutos.

Aprendizaje y memoria en *Drosophila*: condicionamiento clásico

Numerosos ensayos conductuales se han desarrollado para investigar los mecanismos de aprendizaje y memoria en *Drosophila*, entre los que se destacan ensayos de condicionamiento clásico, condicionamiento operante, habituación y sensibilización. Sin embargo, la mayoría de los avances conceptuales han surgido del condicionamiento clásico usando estímulos aversivos

o apetitivos, por lo que la mayor parte de los mecanismos sobre aprendizaje y memoria en la literatura provienen del condicionamiento, que se presenta a continuación.

El condicionamiento olfatorio clásico se realiza presentando una sucesión de odorantes, aplicados con o sin shock eléctrico a grupos de moscas encerradas en un pequeño tubo de plástico (Figura 3A). El odorante usado como estímulo condicionado (CS+) se presenta durante 60 segundos junto con pulsos eléctricos aplicados cada 5 segundos, de manera que el shock funciona como el estímulo incondicionado (US) (Figura 3B). Las moscas luego reciben 60 segundos de un segundo odorante, el CS-, sin asociación con pulsos eléctricos. Este condicionamiento genera una memoria para el odorante CS+ asociada al estímulo aversivo del shock eléctrico, por lo que las moscas evitarán el CS+ por sobre el CS- al ser luego testeadas en un laberinto T (Figura 3A) (Tully y Quinn 1985).

El aprendizaje en esta situación es robusto, reproducible y persiste por más de 24 horas. Se pueden agregar múltiples sesiones de entrenamiento para evaluar la mejora en el desempeño en función del número de sesiones. La memoria olfatoria puede ser extendida si se aplican de 5 a 10 sesiones de entrenamiento presentadas casi inmediatamente, sin período de descanso entre sesiones (entrenamiento masivo) o permitiendo un descanso entre cada sesión de entrenamiento, usualmente de 15 minutos (entrenamiento espaciado). El condicionamiento espaciado produce memoria de largo plazo dependiente de síntesis de proteínas, mientras que el condicionamiento masivo produce memoria resistente a anestesia e independiente de síntesis de proteínas (Margulies, Tully, et al. 2005).

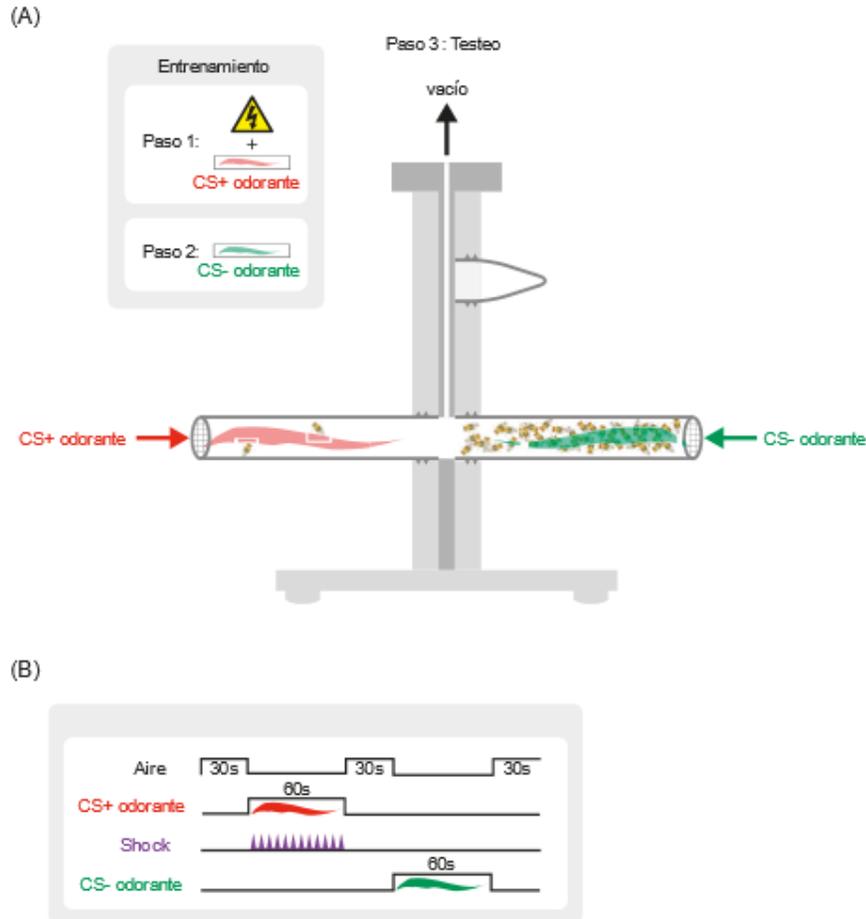


Figura 3. Ensayo de condicionamiento olfatorio clásico en *Drosophila*. (A) Las moscas son entrenadas en un tubo, donde reciben un odorante junto con un shock eléctrico (CS+), seguido por la presentación de un segundo odorante sin shock eléctrico (CS-). Luego las moscas se testean en un laberinto T, donde cada odorante se presenta en un tubo distinto. Si las moscas recuerdan la asociación CS+-electricidad, se mueven hacia el tubo que contiene el odorante CS-, evitando el CS+. (B) Protocolo de entrenamiento de condicionamiento olfatorio clásico.

Recientemente, una variante de condicionamiento utilizando un estímulo apetitivo como US ha cobrado interés, ya que permite el análisis de contrastes conductuales y moleculares interesantes respecto al condicionamiento aversivo clásico. Para el condicionamiento apetitivo, un filtro de papel seco previamente saturado con azúcar reemplaza al shock eléctrico utilizado en el condicionamiento aversivo, pero otros aspectos del procedimiento se mantienen esencialmente sin cambios.

El aprendizaje asociativo, basado en condicionamiento reforzado por un estímulo aversivo o apetitivo, se ha estudiado ampliamente en varios modelos (Cybulska-Kłosowicz 2016; Fernandes, Buckley, et al. 2018; Tully y Quinn 1985). En contraste, se sabe muy poco sobre los mecanismos que subyacen al aprendizaje y memoria de reconocimiento en animales que se comportan libremente.

Mushroom Body (MB): un centro de aprendizaje y memoria en *Drosophila*

Los Mushroom Bodies (MBs) o cuerpos pedunculados, son una estructura bilateral claramente distinguible en el cerebro de *Drosophila*. La red neuronal del MB está compuesta por células Kenyon (KCs), neuronas dopaminérgicas (DANs) y neuronas de salida del MB (MBONs). Entre estas, las KCs son el principal componente, habiendo 2500 KCs en cada MB. Sus dendritas forman una estructura llamada cáliz, donde hacen sinapsis con las neuronas de proyección (PNs) y reciben la información proveniente de estas. Los axones de los MBs se proyectan para formar el pedúnculo y se ramifican en la parte anterior del cerebro para formar los lóbulos (Aso et al., 2014a, b; Tanaka et al., 2008). Según su morfología y la posición de sus axones, las neuronas de MB se clasifican en tres clases distintas: neuronas α/β , neuronas α'/β' , ambas con axones ramificados, y neuronas γ , con axones sin ramificar (Figura 4) (Davis 2004).

Los MBs están involucrados en procesos como aprendizaje y memoria olfatoria, generalización del contexto, extracción de características y toma de decisión, pero también han sido vinculados a la ejecución de programas motores (Davis 2011; Wolf, Wittig, et al. 1998; Liu, Wolf, et al. 1999; Peng, Xi, et al. 2007; Tang y Guo 2001; Zhang, Guo, et al. 2007; Martin, Ernst, et al. 1998; Silva, Goles, et al. 2014).

Una gran cantidad de investigaciones, que comenzó Heisenberg en *Drosophila* y Menzel en abejas, mostró que los MBs son fundamentales para aprendizaje y memoria asociativa. Heisenberg reveló que los MBs tienen un papel importante en resolver situaciones conflictivas. Menzel identificó que el MB en su conjunto actúa como un dispositivo de recodificación, asignando valor a la información sensorial que recibe. Más recientemente, estudios de actividad neuronal indicaron que los MBs en moscas podrían funcionar como un centro en el que las entradas sinápticas dopaminérgicas dirigen la información olfatoria a diferentes circuitos de comportamiento, según el estado interno (ej.: nivel de saciedad) y la experiencia previa del animal (Menzel 2012; Heisenberg 2003; Cohn, Morantte, et al. 2015).

lóbulos verticales, y el cluster protocerebral posterior lateral 2ab (PPL2ab) inerva el cáliz de MB (Liu y Davis 2009).

PAM y PPL1 son dos de las poblaciones dopaminérgicas cerebrales de *Drosophila* más estudiadas. Se han asociado con el aprendizaje y la memoria olfatoria y con la integración de la memoria apetitiva y el estado motivacional de alimentación de un animal (Krashes, DasGupta, et al. 2009; Aso, Herb, et al. 2012; Liu, Plaçais, et al. 2012; Yamagata, Ichinose, et al. 2015). Estos grupos de DANs también se han vinculado a la recompensa de agua en moscas sedientas (Lin, Oswald, et al. 2014). Sin embargo, recientemente se evidenció que también pueden modular comportamientos innatos. Por ejemplo, una subpoblación específica de neuronas PAM está involucrada en la aversión innata al CO₂, una respuesta que depende de la activación de MBONs específicas (Lewis, Siju, et al. 2015).

Para agregar otra capa de complejidad, una subpoblación de neuronas dopaminérgicas PAM ha sido relacionada con defectos motores en el modelo de α -sinucleína para la enfermedad de Parkinson en *Drosophila* (Riemensperger, Issa, et al. 2013). Además de esto, se ha reportado que moscas con expresión disminuida de PINK1, una proteína mitocondrial también asociada a esta enfermedad neurodegenerativa, presentan un número reducido de DANs en PPL1 que correlaciona con los defectos motores (Yang, Gehrke, et al. 2006). En conjunto, estas evidencias apoyan la idea de que estas poblaciones neuronales dopaminérgicas no sólo contribuyen a modular la valencia innata o aprendida de un odorante, sino también a la ejecución de los programas motores asociados a la respuesta conductual hacia el estímulo olfatorio. Es decir que la aversión o atracción provocada en las moscas por un odorante podría verse como un comportamiento complejo con dos componentes: el valor para el odorante y el programa motor asociado con la ejecución de la respuesta conductual.

Mecanismos moleculares del aprendizaje asociativo

Durante el condicionamiento olfatorio, la información procedente del odorante (CS) se transmite a través de neuronas colinérgicas y GABAérgicas del circuito olfatorio, mientras que la información del shock eléctrico o el azúcar (US) se transmite a través de neuronas dopaminérgicas u octopaminérgicas (Figura 5A). La concurrencia en el MB entre la despolarización causada por acetilcolina y la activación de receptores asociados a proteínas G (GPCRs) por la señal del US, activa a la adenilil ciclasa *rutabaga* (*rut*), que cataliza la síntesis

de AMPc, segundo mensajero de esta vía de señalización (Figura 5B). Los niveles de AMPc en la célula son regulados por otro grupo de enzimas – fosfodiesterasas (PDEs) – de las cuales *dunce (dnc)* es la principal (Gervasi, Tchénio, et al. 2010). Un incremento en los niveles de AMPc activa la **proteína quinasa A (PKA)** que entonces puede fosforilar a diferentes proteínas blanco, incluyendo otras quinasas, factores de transcripción y canales iónicos.

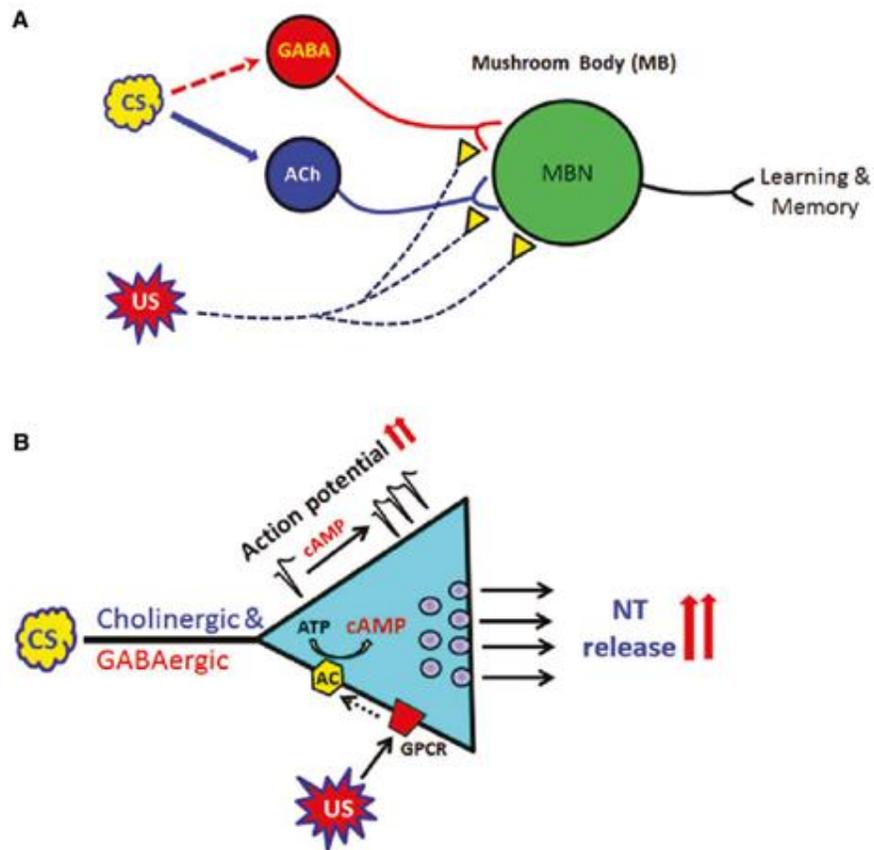


Figura 5. Acciones del AMPc en la plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria en *Drosophila*. (A) Diagrama mostrando los circuitos neuronales de *Drosophila* que median el aprendizaje asociativo y la formación de memoria. La información sensorial olfatoria (CS) es principalmente transducida a través de inputs sinápticos colinérgicos excitatorios hacia el MB. Inputs inhibitorios GABAérgicos hacia el MB modelan la transducción de esta información sensorial, aunque sus circuitos de procesamiento sensorial aún permanecen poco conocidos (líneas punteadas). El US (recompensa o castigo) es mediado a través de inputs sinápticos modulatorios dopaminérgicos u octopaminérgicos. La asociación del CS y el US en el MB es la base del aprendizaje. (B) El AMPc tiene el rol general de incrementar la excitabilidad presináptica y la liberación de neurotransmisor (adaptado de Lee 2015).

Dado que la adenilil ciclasa Rut actúa como detector de coincidencia al asociar el US con el CS en las neuronas del MB, esta potenciación de la señalización dopaminérgica y octopaminérgica está abolida en animales mutantes para Rut, que carecen de actividad adenil ciclasa y muestran defectos de aprendizaje y memoria de corto término (Livingstone, Sziber, et al. 1984; Livingstone 1985). Así, la actividad reducida en la vía de AMPc/PKA en respuesta a la liberación de neuromodulador, produciría una pérdida de detección de coincidencia que conduce a defectos en la plasticidad estructural y funcional (Gervasi, Tchénio, et al. 2010).

La actividad de las fosfodiesterasas regula la activación de PKA a través de neuromoduladores en varios tipos celulares (Conti y Beavo 2007). Durante la señalización por dopamina, la PDE dnc degrada AMPc en los lóbulos β y γ del MB, restringiendo la activación de PKA al lóbulo α únicamente. Sin embargo, dnc no participa en la degradación de AMPc inducida por octopamina en MBs (Gervasi, Tchénio, et al. 2010). Las neuronas dopaminérgicas y octopaminérgicas inervan amplias áreas del cerebro, incluyendo los MBs (Nässel y Elekes 1992; Riemensperger, Völler, et al. 2005; Sinakevitch y Strausfeld 2006; Busch, Selcho, et al. 2009). En *Drosophila*, históricamente se creía que las neuronas dopaminérgicas transmitían la información del estímulo incondicionado aversivo (Claridge-Chang, Roorda, et al. 2009), mientras que el estímulo reforzante apetitivo era señalizado a través de neuronas octopaminérgicas (Schwaerzel, Monastirioti, et al. 2003; Schroll, Riemensperger, et al. 2006). Recientemente se mostró que sólo la memoria apetitiva a corto plazo está reforzada por octopamina y que, además, la formación de memoria dependiente de octopamina requiere de señalización a través de neuronas dopaminérgicas. La necesidad de un sistema dopaminérgico funcional para la formación de memoria apetitiva señalizada por octopamina lleva a pensar que la dopamina se encuentra río abajo de la octopamina en procesos de memoria apetitiva (Burke, C., Huetteroth, et al. 2012). Estos hallazgos apoyan resultados previos con dopamina y octopamina que sugieren que los sistemas de refuerzo en moscas son más similares a los de los mamíferos de lo que se creía previamente (Burke, Christopher J., Huetteroth, et al. 2012).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El objetivo general de este proyecto es comprender el rol de la neuromodulación dopaminérgica en el reconocimiento de un contexto novedoso.

Los antecedentes presentados más arriba proporcionan dos conceptos clave para el objetivo de este estudio. Uno de ellos es que la habituación del comportamiento exploratorio no comparte los mismos mecanismos que el condicionamiento y la habituación refleja (Typlt, Mirkowski, et al. 2013). Los mecanismos involucrados en aprendizaje y memoria de reconocimiento de contexto sin estímulos aversivos son esencialmente desconocidos. Por otro lado, distintos grupos de neuronas dopaminérgicas controlan la actividad locomotora y participan en procesos de aprendizaje y memoria (Liu y Davis 2009).

Estas evidencias sugieren la siguiente hipótesis de trabajo:

Distintos grupos de neuronas dopaminérgicas modulan los niveles de aprendizaje y memoria en el reconocimiento de contexto.

Para poner a prueba esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Establecer un paradigma para el estudio de aprendizaje y memoria en el reconocimiento de contexto.
- Determinar el efecto de manipular la actividad de distintos grupos de neuronas dopaminérgicas sobre los niveles de aprendizaje y memoria en un ensayo de reconocimiento de contexto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nomenclatura

A continuación, se define la nomenclatura utilizada para escribir los genotipos. La nomenclatura incluida en esta tesis fue tomada del consorcio Flybase (Attrill, Falls, et al. 2016) <http://flybase.org/wiki/FlyBase:Nomenclature>.

- Todo lo que no se muestra o escribe se presume que está en estado silvestre.
- El genotipo de un cromosoma es identificado sólo si hay una mutación o modificación respecto del genotipo tipo silvestre.
- Los genotipos se escriben en cursiva.
- Los nombres y símbolos de genes y transgenes se escriben con su primera letra en minúscula si tienen fenotipo recesivo o en mayúscula si son dominantes.
- Los alelos de un gen particular se distinguen por medio del superíndice. Por ejemplo, *dunce*¹ (*dnc*¹).
- El símbolo “+” se utiliza para describir el alelo salvaje.
- Los genotipos de diferentes cromosomas se separan por punto y coma. Los genes sobre un mismo cromosoma se separan por comas.
- Los alelos en cromosomas homólogos se separan por una barra, (ej.: *dnc*¹/*dnc*⁺). Para este propósito, los cromosomas X e Y se consideran homólogos. En los genotipos en homocigosis sólo se nombran una vez (ej.: *dnc*¹). Para los genotipos en heterocigosis ambos alelos se representan (ej.: *dnc*¹/*dnc*⁺).

Ciclo de vida de *Drosophila*

Drosophila es un insecto que sufre metamorfosis completa (holometábolo), experimentando cuatro fases de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 6). La duración del ciclo de vida depende fuertemente de la temperatura de cultivo, siendo de 10 días a 25 °C y de 20 días a 18 °C.

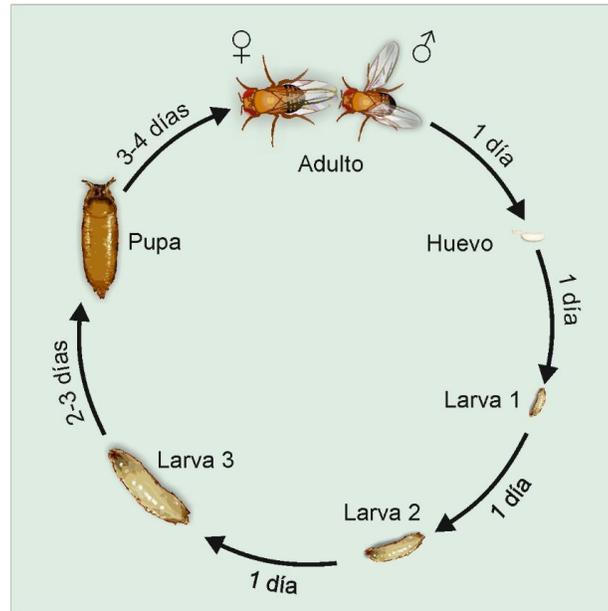


Figura 6. Ciclo de vida de *Drosophila*. Una vez que la mosca hembra deposita el huevo fecundado, a 25 °C, éste sufre secuencialmente etapas de desarrollo larvario (Larva 1 a 3). Posteriormente, la larva de estadio 3 se convierte en pupa, la cual permanece en ese estadio por 3-4 días hasta que se completa el desarrollo a través de un proceso de metamorfosis completa, eclosionando el individuo adulto al día 9-11.

Cría y mantenimiento de los animales

Los animales fueron criados en viales de poliestireno de 37 ml, conteniendo 10 ml de medio de cultivo estándar compuesto por harina de maíz 6,65%, levadura 2%, Agar-Agar 1%, sacarosa 4%, ácido propiónico 0,45%, Nipagin 0,64% en agua destilada.

Se mantuvieron condiciones constantes de cultivo: 23 °C, 60-70 % de humedad y en ciclos de luz : oscuridad de 12 : 12 horas.

Líneas utilizadas

Para todos los experimentos se utilizaron individuos machos adultos de 2-6 días de *Drosophila melanogaster*. Se usó la línea silvestre *Canton-Special* (CS), el mutante clásico de memoria *dunce*¹(*dnc*¹) y las líneas transgénicas que se listan en la siguiente tabla:

Tabla I. Líneas transgénicas utilizadas.

Línea	FlyBase ID	Descripción
<i>TH-GAL4</i>	FBtp0114847	Expresan GAL4 en distintos subgrupos de neuronas dopaminérgicas (Liu, Liu, et al. 2012; Liu, Plaçais, et al. 2012).
<i>R58E02-GAL4</i>	FBtp0061564	
<i>TH-D4-GAL4</i>	FBti0151783	
<i>UAS-shi^{ts1}</i>	FBal0015610	Expresa bajo control de GAL4 el alelo termosensible <i>shibire^{ts1}</i> (Kitamoto 2001).
<i>UAS-TrpA1</i>	FBgn0035934	Expresa bajo control de GAL4 el canal catiónico termosensible <i>TrpA1</i> (Hamada, Rosenzweig, et al. 2008).

Las características de los mutantes y transgenes se describen en detalle en la base de datos de genes y genomas de *Drosophila*, FlyBase <http://flybase.org>.

Cruzamientos genéticos

Los cruzamientos se realizaron en viales, seleccionando un promedio de 10 hembras y 5 machos. Los viales se mantuvieron a temperatura y humedad controlada (23 °C y 60-70 % humedad) con un ciclo de luz : oscuridad de 12 : 12 horas. La separación de machos y hembras adultos se realizó bajo breve anestesia (<2 min) con CO₂ y discriminación bajo lupa del aparato genital y morfología general de las moscas (Figura 7).

Las cruzas fueron diseñadas para que la hembra siempre portara el gen identificador del grupo neuronal para dirigir la expresión (ej.: *TH-GAL4*). Estas hembras se cruzaron con machos portadores de los distintos transgenes *shi^{ts1}* o *TrpA1* bajo el promotor UAS.



Figura 7. Selección de moscas por dimorfismo sexual. Características morfológicas de machos y hembras. A la izquierda una hembra y a la derecha un macho en vista ventral (*panel izquierdo*) y vista lateral (*panel derecho*). En la foto puede observarse una clara diferencia entre la genitalia y morfología general de ambos sexos.

Ensayo de reconocimiento de contexto

Para evaluar la memoria al contexto se realizó un ensayo conductual que consta de dos etapas principales identificadas como entrenamiento (Tr) y testeo (Ts). El ensayo consiste en exponer a un único animal a una arena circular con claves visuales en sus paredes. Esta arena constituye el contexto que el animal debe reconocer (Liu, Davis, et al. 2007; Soibam, Mann, et al. 2012).

Durante el entrenamiento el animal explora el contexto, previamente desconocido, y se familiariza con él. Luego se retira y se coloca en un vial apartado de la luz por un período de retención (Ret.). Por último, se ubica nuevamente en la arena para evaluar la memoria (Figura 8).

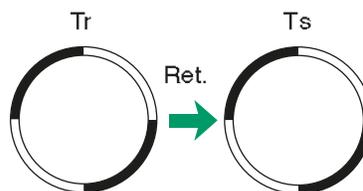


Figura 8. Representación gráfica del ensayo de reconocimiento de contexto. El ensayo se compone de una primera etapa de entrenamiento (Tr) en la que el animal se expone por primera vez al contexto. Luego es retirado del contexto durante un tiempo de retención (Ret.). Finalmente, se vuelve a colocar al animal en el contexto para evaluar la memoria en la etapa de testeo (Ts).

Protocolos utilizados

Se probaron 4 protocolos distintos, compuestos por una o dos sesiones de entrenamiento de diferente duración, separadas por un intervalo de tiempo variable, como se describe a continuación:

Protocolos de entrenamiento de sesión única

- **Protocolo 1:** Tr 10' + Ret. 1' + Ts 2'
- **Protocolo 2:** Tr 20' + Ret. 1' + Ts 2'

Protocolos de entrenamiento de dos sesiones separadas por un intervalo inter-sesión (ITI)

- **Protocolo 3:** Tr 10' + ITI 1'+ Tr 10' + Ret. 1' + Ts 2' (entrenamiento masivo)
- **Protocolo 4:** Tr 10' + ITI 20'+ Tr 10' + Ret. 1' + Ts 2' (entrenamiento espaciado)

Ensayo de especificidad de la memoria

Para evaluar si la memoria era específica del contexto y si había generalización del aprendizaje, se utilizó el Protocolo 1 (Tr 10' + Ret. 1' + Ts 2'). El animal se entrenó en un contexto (C1) y en la fase de testeo se lo expuso al mismo contexto, a un contexto similar (C2), o a un contexto distinto (C3) (Figura 9).

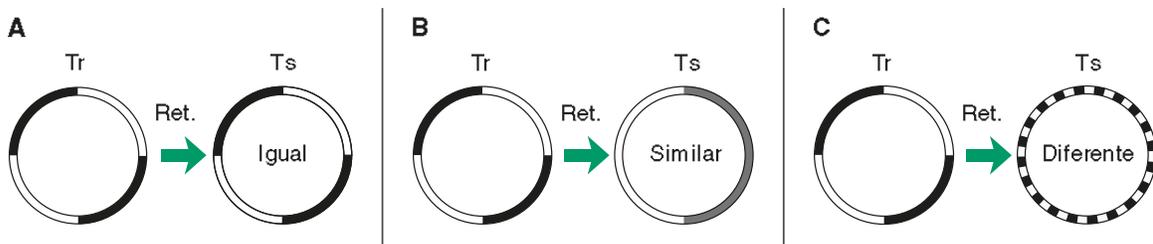


Figura 9. Representación gráfica del ensayo de reconocimiento con cambio de contexto. Ensayo con entrenamiento (Tr) y testeo (Ts) realizado en el mismo contexto (A), un contexto similar (B), o un contexto diferente (C).

Ensayo con inducción térmica

Para bloquear la transmisión sináptica de neuronas dopaminérgicas se dirigió la expresión del transgén *UAS-shi^{ts1}* a distintos subgrupos de neuronas por medio de distintas líneas GAL4 (Tabla I). Para incrementar la excitabilidad de neuronas dopaminérgicas se utilizó el transgén

UAS-TrpA1 con las mismas líneas GAL4 (Tabla I). En la etapa de manipulación térmica, los animales doble-transgénicos GAL4-UAS fueron expuestos a 30 °C durante 10 min y luego se realizó el ensayo de reconocimiento con el protocolo 1 (Tr 10’ + Ret. 1’ + Ts 2’), manteniendo a los animales a 30 °C durante todo el ensayo. En paralelo, animales del mismo genotipo fueron sometidos al mismo ensayo a 23 °C (Figura 10).

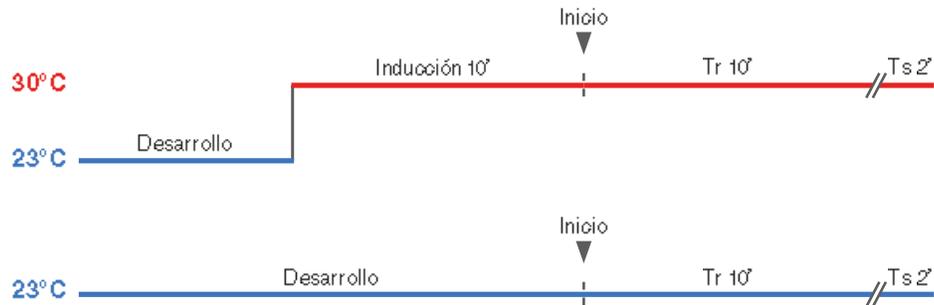


Figura 10. Representación esquemática del ensayo con inducción térmica. Arriba: Ensayo con inducción térmica. Los animales se desarrollan a 23 °C. Previo al entrenamiento, se realiza una inducción térmica a 30 °C durante 10 minutos. Luego los animales se entrenan y se testean manteniendo la temperatura a 30 °C. Abajo: Ensayo sin inducción térmica. Los animales se desarrollan a 23 °C. El entrenamiento y el testeo se realizan también a 23 °C.

Equipamiento y condiciones experimentales

Los ensayos se llevaron a cabo en un cuarto oscuro, con luz roja (LED 625 nm) en condiciones ambientales constantes: 23 °C de temperatura y 70 % de humedad.

Como arenas se utilizaron cajas de Petri plásticas circulares de 58 mm de diámetro y 10 mm de alto, que se cubrieron con una tapa plástica circular de 88 mm de diámetro con una perforación de 10 mm de diámetro en unos de sus bordes para el ingreso de los animales.

Para registrar el comportamiento de los animales se utilizaron dos cajas de PVC espumado (espesor 3 mm) de color negro, construidas en el laboratorio con las siguientes dimensiones: 300 x 100 x 100 mm de alto, ancho y profundidad, respectivamente (Figura 11). En el interior de cada caja de comportamiento se colocaron dos estantes de acrílico blanco translúcido a una altura de 100 y de 200 mm, de forma que quedara dividida en tres compartimientos: superior, medio e inferior. En el estante inferior se realizó una muesca semicircular que permitió colocar la arena siempre en la misma posición. En el estante superior se hizo una ventana de 20 x 20 mm, donde se ubicó una cámara de video de alta definición

(Logitech® HD Pro webcam C910) con la que se registró el comportamiento de los animales con una frecuencia de adquisición de 30 Hz. En los compartimientos superior e inferior se instalaron fuentes de luz blanca para iluminar la arena desde arriba (240 luxes) y desde abajo (80 luxes). Sobre las paredes del compartimiento medio se colocaron tres resistencias eléctricas y un sensor de temperatura conectado a un termostato digital que mantiene la temperatura constante a 30 C (Figura 11). Utilizando dichos dispositivos se generaron videos sobre los que se analizó posteriormente el comportamiento.

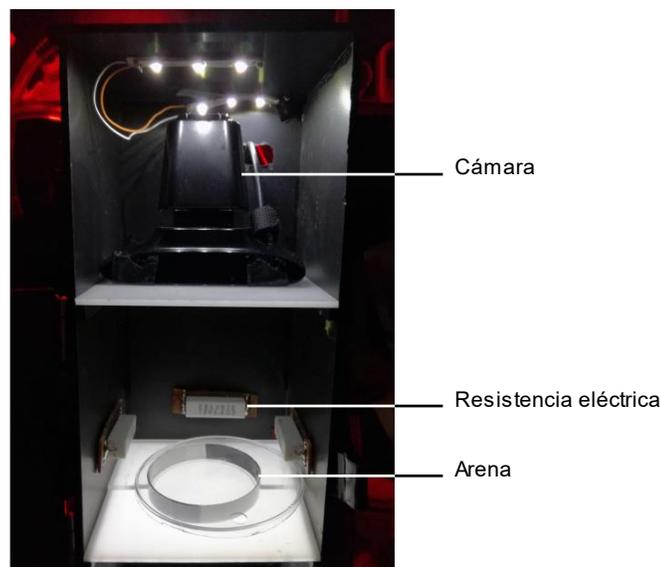


Figura 11. Dispositivo para registrar el comportamiento. Compartimiento medio con resistencias eléctricas que permiten manipular la temperatura. En este sector se coloca la arena. En el compartimiento superior se ubica la cámara para registrar el comportamiento. Tanto el compartimiento superior como en el inferior (no mostrado en la imagen) tienen fuentes de luz.

Análisis del comportamiento

Los videos generados se analizaron con el software ANY-Maze® Video Tracking System v4.98. Para el análisis de la conducta se cuantificó la distancia recorrida y se dividió en segmentos de 30 segundos.

A partir de los datos de distancia recorrida se crearon mapas de trayectoria (Figura 12) que permitieron controlar que el software realizara un seguimiento adecuado del animal.

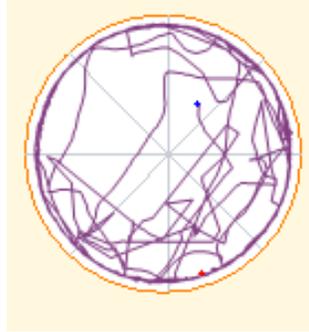


Figura 12. Análisis de la conducta. Imagen representativa del rastreo de la actividad de un animal en la arena. El punto azul indica el inicio del registro, el punto rojo indica el final.

Normalización de los datos

La actividad en cada segmento de 30 segundos, medida como distancia recorrida, se normalizó a la actividad inicial (la actividad registrada en el primer segmento de 30 segundos). Este procedimiento se llevó a cabo con los valores de actividad obtenidos durante todo el ensayo, a fin de eliminar las diferencias de comportamiento entre individuos. Todos los análisis posteriores se realizaron con los valores normalizados a la actividad inicial.

Habitación al contexto

La habitación al contexto se calculó como la proporción entre la actividad exploratoria al final (F) y al inicio (I) del entrenamiento.

$$\mathbf{H = F / I} \quad (1)$$

Valores menores a 1 indican que la actividad es más baja en el final que en el inicio del entrenamiento, compatible con un comportamiento de habitación. Valores mayores o indistinguibles de 1 indicarían ausencia de habitación.

Memoria de reconocimiento de contexto

La memoria de reconocimiento de contexto se calculó como la proporción entre la actividad al inicio del testeo (Post) y al inicio del entrenamiento (Pre).

$$\mathbf{M = Post / Pre} \quad (2)$$

Valores menores a 1 indican que la actividad es más baja en el inicio del testeo que en el inicio del entrenamiento, compatible con una memoria de habituación. Valores mayores a 1 indican que la actividad es más alta en el inicio del testeo que en el inicio del entrenamiento, compatible con una memoria de sensibilización. Valores que no difieren estadísticamente de 1 indicarían ausencia de memoria.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism versión 6.01 (GraphPad) y G*Power 3.1. Se usó la prueba de D'Agostino & Pearson para evaluar normalidad de los datos y la prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas. Para el análisis tanto de habituación como de memoria se usaron las siguientes pruebas no paramétricas:

- Prueba de Friedman de comparaciones múltiples, seguida de corrección de Dunn para comparar los segmentos de actividad durante la etapa de entrenamiento o de re-exposición al contexto.
- Prueba de Wilcoxon unidireccional para comparar datos pareados (actividad inicial contra actividad final y actividad pre-entrenamiento contra actividad post-entrenamiento).
- Prueba de Mann Whitney para comparar habituación o memoria entre dos condiciones diferentes.
- Prueba de Kruskal-Wallis, seguida de prueba de comparaciones múltiples de Dunn, para comparar habituación o memoria entre más de dos grupos.

Se determinó que era necesario un $n=12$ para obtener una potencia estadística de 0.80, calculada con el programa G*Power. Se utilizó este n para todos los experimentos con genotipo silvestre, excepto cuando se comparó habituación, memoria inmediata y memoria a 24 hs entre los genotipos silvestre y *dnc^l*, ya que en estos ensayos *dnc^l* mostró una variabilidad mayor, requiriéndose un $n=21$ para mantener la potencia estadística de 0.80. Los experimentos con animales doble-transgénicos se realizaron con la cantidad de réplicas que se había definido para el genotipo silvestre ($n=12$), pero luego de terminar la fase experimental de esta tesis se identificó que este tamaño muestral mostraba una potencia de 0.23.

Para comparar coeficientes de variación se utilizó el programa MedCalc (comparación de coeficientes de variación según Forkman 2009).

RESULTADOS

A continuación, se presentan estudios de animal único, donde se exploraron y caracterizaron distintos aspectos de la conducta animal en las fases de entrenamiento y testeo de la memoria al contexto.

Sección A. Ensayo conductual y caracterización del comportamiento del animal de genotipo silvestre

El ensayo de reconocimiento de contexto consistió en tres fases: el entrenamiento, el período de retención de la memoria y el testeo de la memoria. En el entrenamiento el animal se expuso a un contexto (arena vacía) durante 10 o 20 minutos. Luego se retiró de la arena y se colocó en un vial apartado de la luz por un período de retención de duración variable según el protocolo experimental. Finalmente, se volvió a ubicar en la arena durante 2 minutos para evaluar la memoria (ver Materiales y Métodos).

Habitación de la actividad exploratoria durante el entrenamiento

El objetivo de este análisis fue identificar uno o más protocolos de utilidad para investigar la habitación de la actividad exploratoria y la memoria de reconocimiento de contexto. En esta etapa se utilizaron animales de genotipo silvestre de la línea *Canton-S (CS)*.

Durante la fase de entrenamiento, la actividad exploratoria de los animales parecía reducirse en función del tiempo de duración del ensayo. Para analizar este comportamiento se cuantificó la actividad exploratoria como distancia recorrida en cm durante todo el ensayo en segmentos de 30 segundos. La habitación, una caída significativa en la actividad exploratoria al final del ensayo respecto al segmento inicial del registro, se observó tanto en el protocolo de 10 como en el de 20 minutos (Figura 13). Esta caída en la actividad locomotora no corresponde a fatiga ya que ante una manipulación de deshabitación el animal vuelve a tener una alta actividad. Este comportamiento es consistente con la habitación observada en vertebrados e invertebrados (Liu, Davis, et al. 2007; Typlt, Mirkowski, et al. 2013).

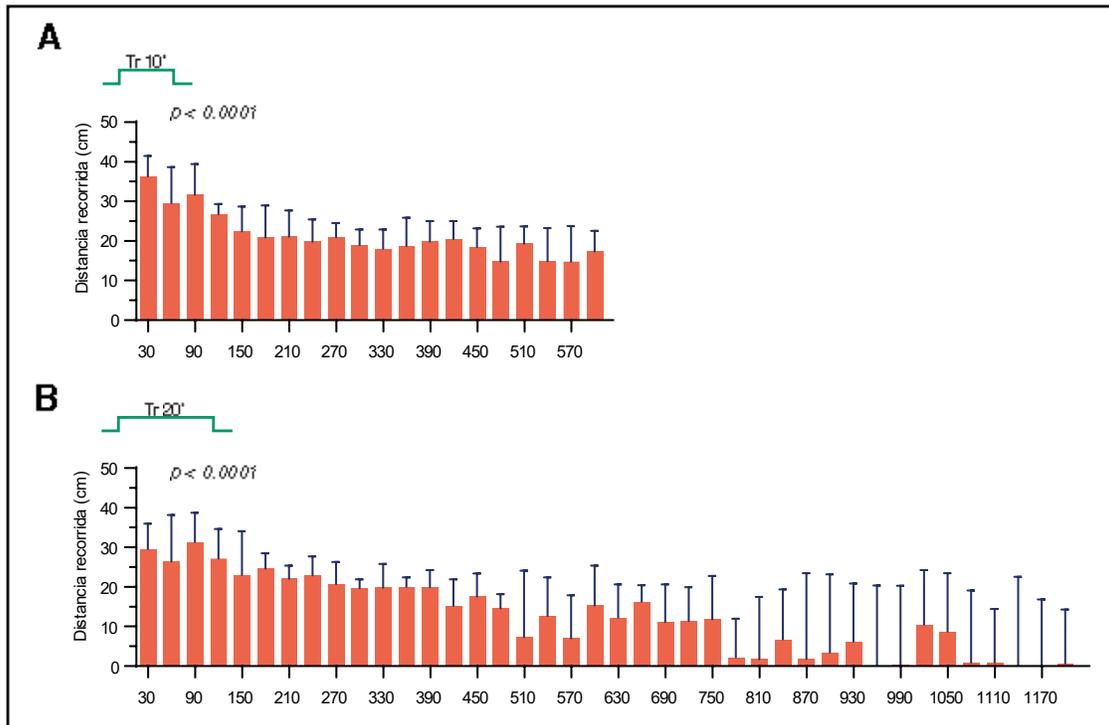


Figura 13. Caída de la actividad exploratoria durante una sesión de entrenamiento. Arriba: Representación esquemática del protocolo de entrenamiento. Abajo: Distancia recorrida absoluta para cada segmento de 30 segundos durante una sesión de entrenamiento de 10 minutos (A) o 20 minutos (B). En cada columna se muestra un segmento de 30 segundos, indicando la mediana y el rango intercuartil. P-valor, prueba de Friedman de comparaciones múltiples, seguida de corrección de Dunn, n=12.

Para el estudio del decaimiento de la actividad, los valores de cada punto de tiempo fueron normalizados al valor inicial, a fin de eliminar la variación entre los individuos, como en estudios previos (Typlt, Mirkowski, et al. 2013). Esta operación se aplicó para analizar los resultados de todos los ensayos posteriores.

Utilizando los valores de distancia recorrida normalizados, se detectó habituación en los protocolos de 10 y 20 minutos de entrenamiento, llegando a valores cercanos a cero luego 13 minutos (Figura 14).

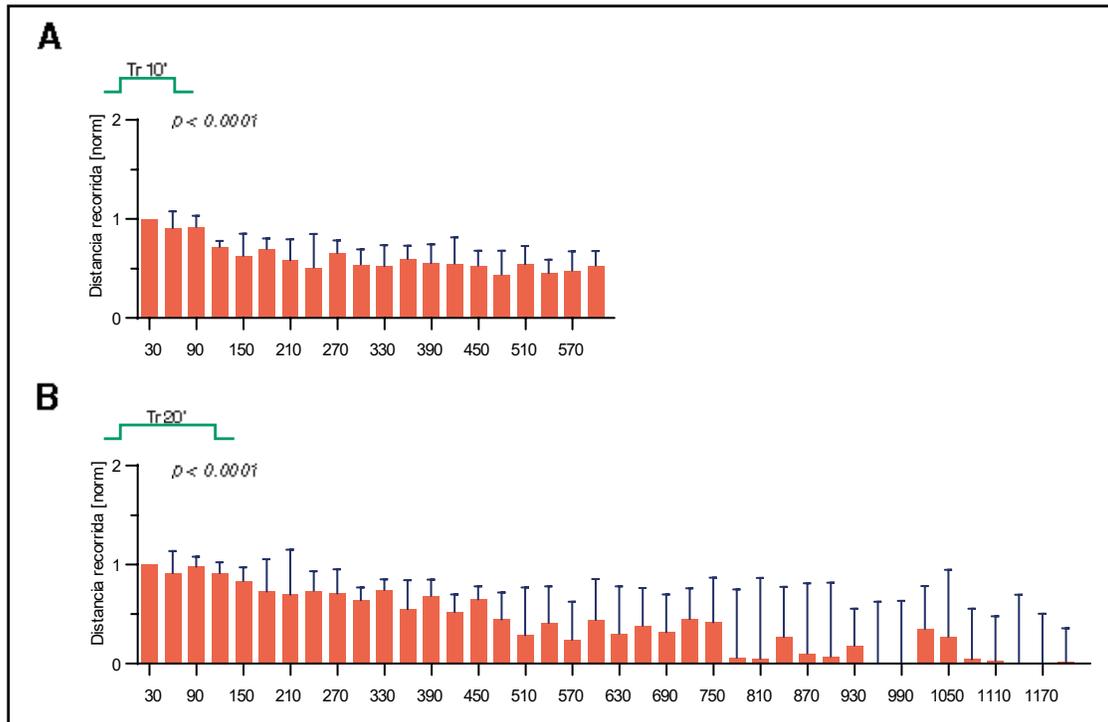


Figura 14. Caída de la actividad exploratoria normalizada en protocolos de una sesión de entrenamiento. Arriba: Representación esquemática del protocolo de entrenamiento. Abajo: Distancia recorrida normalizada en cada segmento de 30 segundos durante una sesión de entrenamiento de 10 minutos (A) o 20 minutos (B). En cada columna se muestra un segmento de 30 segundos, indicando la mediana y el rango intercuartil. P-valor, prueba de Friedman de comparaciones múltiples, seguida de corrección de Dunn, n=12.

Para simplificar el análisis de habituación y permitir una comparación equivalente entre los ensayos de distinta duración, sólo se comparó el segmento inicial y final de la curva. Esto se llevó a cabo mediante un análisis de diferencias pareadas (Figura 15). Con estos valores normalizados se calculó la habituación (H) (ver Ecuación 1).

Se observó una diferencia significativa entre la actividad al inicio y la actividad al final del entrenamiento de cada animal en el protocolo de 10 y 20 minutos, indicando que en ambos casos hubo habituación (Figura 15) y validando el uso de este tipo de comparación.

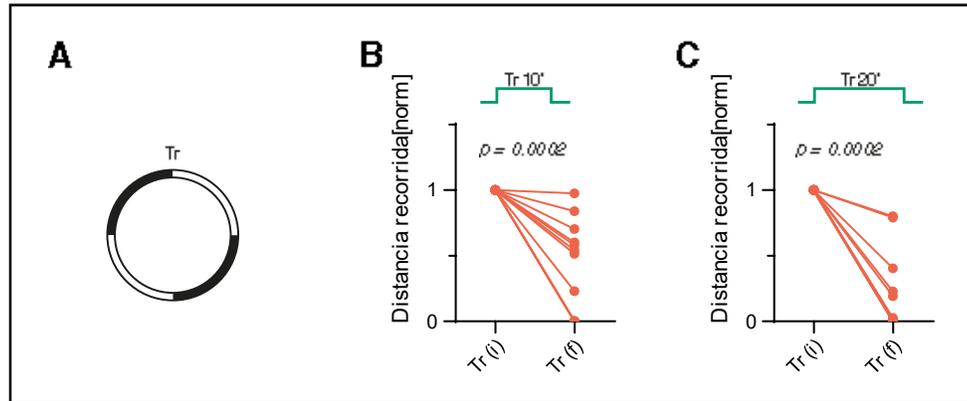


Figura 15. Caída de la actividad exploratoria durante el entrenamiento en protocolos de una sesión. (A) Representación esquemática de la etapa de entrenamiento. (B-C) Arriba: Representación esquemática del protocolo de entrenamiento. Abajo: Diferencias pareadas entre la distancia recorrida al inicio (Tr(i)) y al final (Tr(f)) de una sesión de entrenamiento de 10 minutos (B) o 20 minutos (C). Cada punto representa un individuo. P-valor, prueba de Wilcoxon para datos pareados, n=12.

Si bien el protocolo de 20 minutos de entrenamiento parece generar una habituación más fuerte, no se detectaron diferencias significativas entre 10 y 20 minutos de entrenamiento (Figura 16).

La mediana de la habituación en el protocolo de 20 minutos fue cercana a 0, y la mayor parte de los individuos se situaron alrededor de este valor, mostrando que tuvieron una fuerte habituación. Los animales entrenados con el protocolo de 10 minutos tuvieron mayor dispersión en sus valores de habituación, con una mediana cercana a 0,5. Estos resultados muestran que los dos protocolos pueden ser utilizados, ya que en ambos hubo habituación.

dependiente de re-entrenamiento (ADR) (Figura 17). Dadas estas dos fases, la memoria al contexto no debería ser testeada durante un período arbitrario, sino durante la fase de ADM.

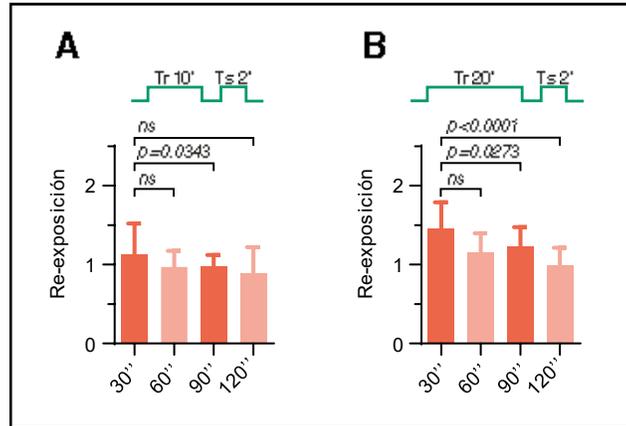


Figura 17. Una segunda exposición al contexto desencadena actividad dependiente de memoria, seguida de actividad dependiente de re-entrenamiento. Arriba: Representación esquemática del protocolo de entrenamiento. Abajo: Histogramas, en segmentos de 30 segundos, de la memoria durante el testeo, mostrando la reducción de actividad en el tiempo. Las barras muestran la mediana y el rango intercuartil luego de una sesión de entrenamiento de 10 minutos (A) o 20 minutos (B). P-valor, prueba de Friedman de comparaciones múltiples, seguida de corrección de Dunn, n=12.

Para determinar cuándo y por cuánto tiempo sería adecuado testear la memoria, se analizó la respuesta de los animales durante el testeo de memoria en segmentos de 30 segundos. La mayoría de los animales mostró la mayor actividad en los primeros 30 segundos del testeo y sólo algunos pocos en el segundo segmento.

El porcentaje de animales que respondió con mayor actividad durante los primeros 30 segundos fue del 67% en moscas naive (sin previa exposición al contexto), y de 75% o 92% luego de 10 o 20 minutos de entrenamiento respectivamente (Figura 18). Este aumento progresivo sugiere que la proporción de animales que respondieron con mayor actividad en el primer segmento aumenta con la fuerza del entrenamiento.

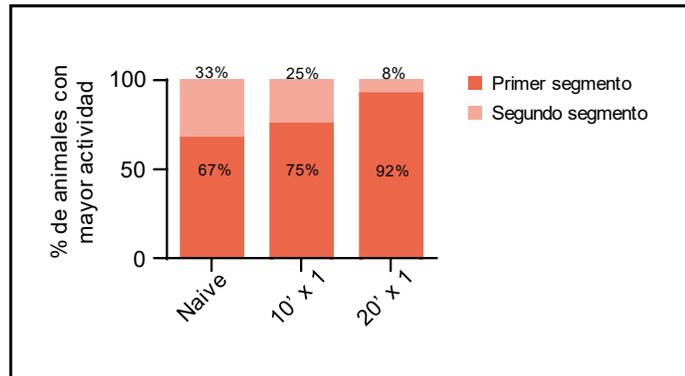


Figura 18. Porcentaje de animales con mayor actividad en el primer o el segundo segmento de testeo. Gráfico de barras apiladas mostrando el porcentaje de animales con mayor actividad en el primer o el segundo segmento de 30 segundos de testeo, para animales sin entrenar (Naive), o entrenados con una sesión de 10 minutos (10'x1) o de 20 minutos (20'x1). n= 12.

En función de estos resultados, se decidió evaluar la memoria como la distancia recorrida durante los primeros 30 segundos de testeo, a fin de evitar el decaimiento de la actividad, presumiblemente como respuesta a un re-entrenamiento.

Tanto el protocolo de 10 minutos de entrenamiento como el de 20 mostraron un aumento significativo de actividad del segmento inicial del testeo respecto al segmento inicial del entrenamiento (Figura 19). Esto indica que ambos protocolos son viables para estudiar la memoria de contexto.

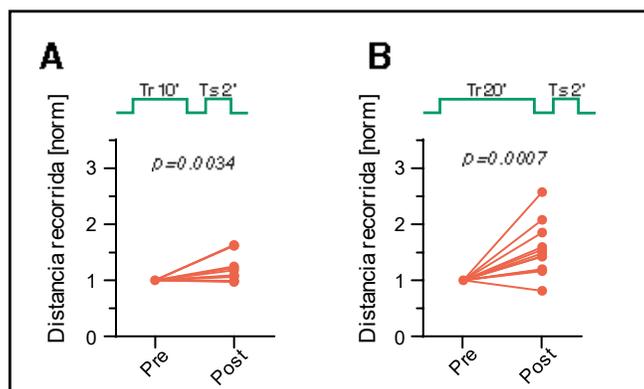


Figura 19. La memoria de contexto en moscas silvestres se revela como una mayor actividad exploratoria. Arriba: Representación esquemática del protocolo de entrenamiento. Abajo: Diferencias pareadas entre la distancia recorrida al inicio del entrenamiento (Pre) y un minuto después del entrenamiento (Post). Los entrenamientos consistieron en una sesión de 10

minutos **(A)** o 20 minutos **(B)**. Cada punto representa un animal. P-valor, prueba de Wilcoxon para datos pareados, $n=12$.

Aunque los animales entrenados bajo ambos protocolos mostraron memoria de contexto, para comprender mejor el impacto de la duración del entrenamiento en la memoria generada, se comparó la memoria inmediata en ambos casos. Se observó una memoria levemente superior en los animales entrenados con el protocolo de 20 minutos, con una mediana superior a 1,5 (Figura 20). Sin embargo, dado que el protocolo de 10 min también generó resultados robustos y una memoria significativa, se decidió utilizar este protocolo, que es más corto, en los ensayos posteriores.

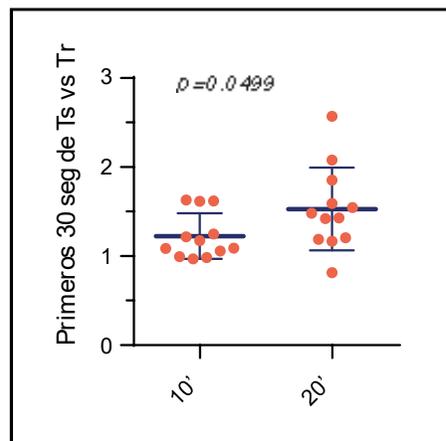


Figura 20. Memoria de contexto en moscas entrenadas con una sesión. Diagrama de dispersión, cada punto representa un individuo, barras gruesas indicando medianas y barras finas indicando rango intercuartil. El protocolo de entrenamiento fue de 10 minutos (10') o 20 minutos (20'). P-valor, prueba de Mann-Whitney, $n= 12$.

Protocolos de dos sesiones de entrenamiento

Está bien establecido que la repetición del entrenamiento mejora el nivel de memoria. El nivel de memoria se incrementa aún más cuando las sesiones se presentan espaciadas en el tiempo (Ebbinghaus 1885; Pagani, Oishi, et al. 2009).

Para determinar si esta propiedad también es válida para memoria de contexto y comprobar si un protocolo de dos sesiones genera mayor memoria que uno de única sesión, se diseñaron dos protocolos de dos sesiones de entrenamiento: uno masivo, compuesto por dos sesiones de 10 minutos cada una, separadas por un intervalo inter-sesión (ITI) de 1 minuto; y

uno espaciado, conformado por las mismas sesiones de entrenamiento, pero separadas por un intervalo de 20 minutos.

La habituación se midió comparando la actividad al inicio de la primera sesión de entrenamiento con la actividad al final de la segunda sesión. Con ambos protocolos los animales mostraron una habituación significativa (Figura 21), pero se observaron diferencias en la distribución de los datos de actividad. Los individuos entrenados con el protocolo masivo tuvieron una distribución considerablemente homogénea en todo el rango de datos. En contraste, los animales entrenados con el protocolo espaciado se dividieron claramente en dos grupos: uno con alta habituación (actividad final cercana a 0) y uno con baja habituación (actividad final cercana a 1). A partir de estos resultados nos preguntamos si el nivel de habituación y el nivel de memoria podrían estar relacionados, es decir que una habituación alta podría generar una mayor memoria inmediata al contexto. Esta hipótesis se analiza más adelante.

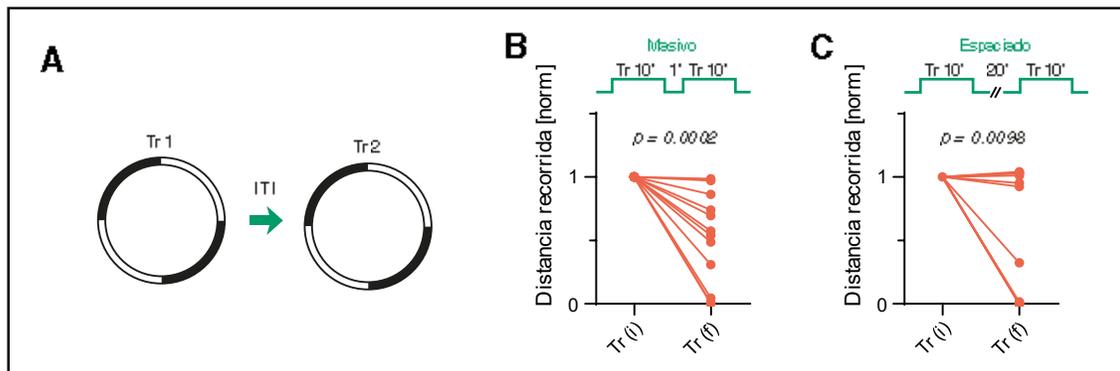


Figura 21. Caída de la actividad exploratoria durante un entrenamiento masivo o espaciado. (A) Representación esquemática de la etapa de entrenamiento. (B-C) Arriba: Representación esquemática del protocolo de entrenamiento. Abajo: Diferencias pareadas entre la distancia recorrida al inicio ($Tr(i)$) y al final ($Tr(f)$) del entrenamiento en protocolos de dos sesiones de 10 minutos espaciadas por 1 minuto (B) o 20 minutos (C). Cada punto representa un individuo. P-valor, prueba de Wilcoxon para datos pareados, $n=12$.

No se observó diferencia al comparar la habituación generada por los protocolos de dos sesiones masivo y espaciado (Figura 22), sugiriendo que el espaciamiento de las sesiones de entrenamiento no produce un efecto en la memoria de habituación.

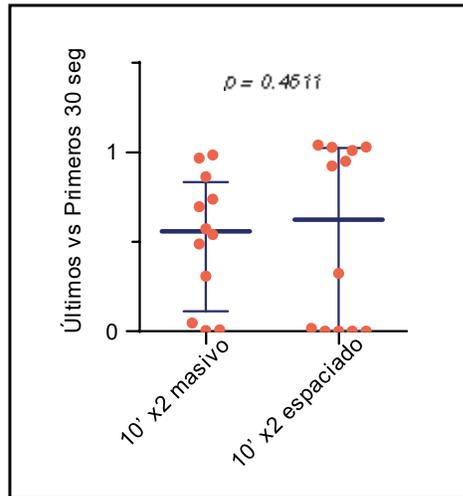


Figura 22. Habitación en moscas entrenadas con dos sesiones. Diagrama de dispersión con puntos indicando individuos, barras gruesas indicando medianas y barras finas rango intercuartil. El protocolo de entrenamiento fue de dos sesiones de 10 minutos cada una, separadas por 1 minuto (10'x2 masivo) o 20 minutos (10'x2 espaciado). P-valor, prueba de Mann-Whitney, n= 12.

Al analizar la memoria al contexto (diferencia entre la actividad al inicio del entrenamiento respecto al inicio del testeo), se observó que los dos protocolos generaron memoria inmediata comparable (Figura 23).

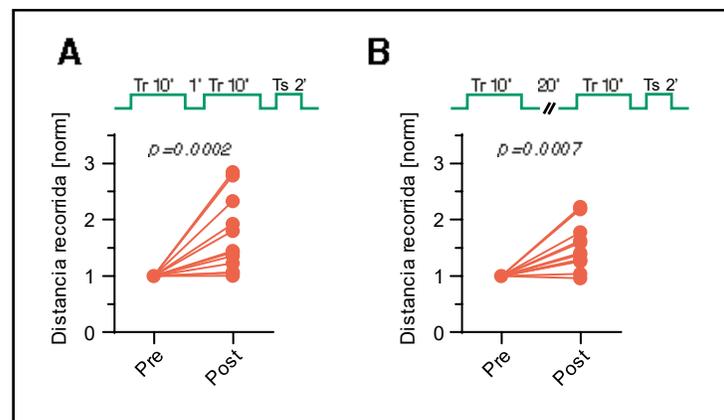


Figura 23. Aumento de actividad exploratoria luego de dos sesiones de entrenamiento. Arriba: Representación esquemática del protocolo de entrenamiento. Abajo: Distancia recorrida al inicio del entrenamiento (Pre) y un minuto después del entrenamiento (Post). Los entrenamientos consistieron en dos sesiones separadas por (A) 1 minuto (masivo) o (B) 20 minutos (espaciado). P-valor, prueba de Wilcoxon para datos pareados, n=12.

Para definir si la memoria observada era diferente entre ambos protocolos, se comparó memoria luego de cada uno y, contrario a lo reportado para memoria de largo término, el espaciamiento de los entrenamientos no produjo diferencias en la memoria inmediata (Figura 24), de forma consistente con estudios previos (Cattaneo, San Martin, et al. 2020).

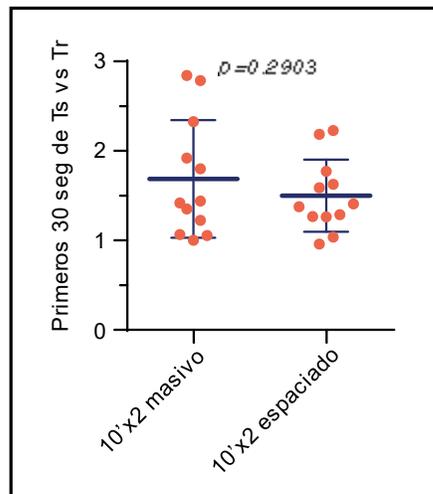


Figura 24. Memoria al contexto luego de entrenamiento masivo o espaciado. Diagrama de dispersión con puntos indicando individuos, barras gruesas indicando medianas y barras finas rango intercuartil. P-valor, prueba de Mann-Whitney, n= 12.

Como en todos los protocolos probados se observó memoria, se decidió utilizar el protocolo de una sesión de 10 minutos para el resto de los experimentos, dado que es más corto y sencillo.

Relación entre la habituación y la memoria al contexto

Como se vio anteriormente, con el protocolo de dos sesiones de entrenamiento espaciadas, la actividad de los animales se dividió en dos grupos, uno con alta habituación y uno con baja habituación (Figura 21). Para comprobar si el nivel de habituación tiene impacto en el nivel de memoria al contexto se realizó un análisis de correlación. Este análisis mostró que no hay una correlación significativa ($\rho = 0.078$), indicando ausencia de una relación directa entre el grado de habituación y la memoria al contexto. Por otro lado, se comparó la memoria

al contexto en los animales con alto o bajo nivel de habituación, mostrando que no hay diferencia entre estos grupos (Figura 25).

Estos resultados indican que el nivel de habituación no tiene una relación directa con el nivel de memoria, y no debería esperarse que un animal que habitúa bien luego muestre una memoria significativa.

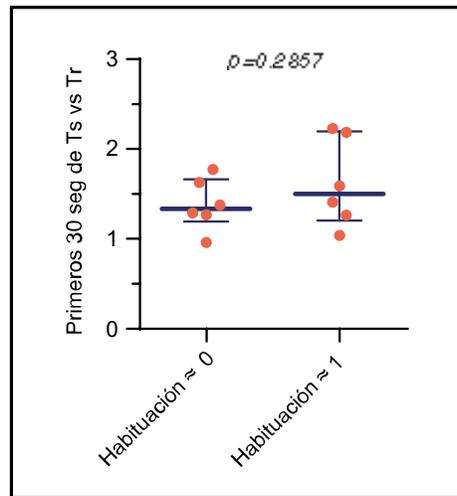


Figura 25. Memoria al contexto en animales con alto o bajo nivel de habituación. Se separó a los individuos en dos grupos: uno con bajo nivel de habituación (H cercano a 1) y otro con alta habituación (H cercano a 0) y se calculó la memoria para cada grupo. Diagrama de dispersión con puntos indicando individuos, barras gruesas indicando medianas y barras finas indicando rango intercuartil. P-valor, prueba de Mann-Whitney, n= 12.

Especificidad de la memoria de contexto

Previamente se identificó un aumento en la actividad al inicio del testeo respecto a la actividad al inicio del entrenamiento. Esta respuesta fue interpretada como memoria. A fin de determinar si dicha memoria es específica de contexto, se diseñó un experimento con un solo contexto de entrenamiento y contextos variables para el testeo. Se definieron 3 grupos: el primero fue entrenado y testeado en el mismo contexto; el segundo, entrenado en un contexto y testeado en otro similar; y el tercero, entrenado en un contexto y testeado en otro muy diferente.

Se observó memoria tanto en los animales testeados en el mismo contexto como en los testeados en un contexto similar, pero no en aquellos testeados en un contexto diferente (Figura

26). Esto sugiere que la memoria generada a partir de este paradigma es específica de contexto. Si bien los animales testeados en un contexto similar también mostraron memoria, esta respuesta se basa en un fenómeno conocido como generalización del aprendizaje, que es la habilidad de generalizar el aprendizaje de estímulos o eventos pasados a situaciones similares. Se trata de un comportamiento adaptativo que suele estar reducido en algunas patologías como la esquizofrenia (Shohamy, Mihalakos, et al. 2010).

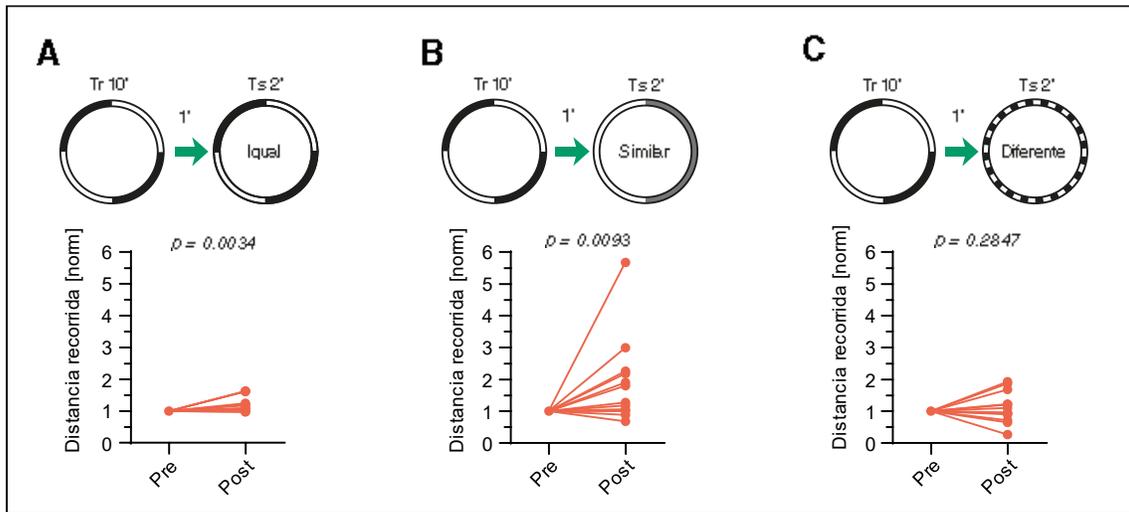


Figura 26. La memoria al contexto en moscas silvestres se generaliza ante un contexto similar, pero no ante uno diferente. (A-C) Arriba: Representación esquemática del entrenamiento y el testeo en el mismo contexto (A), en un contexto similar (B) o en un contexto diferente (C). Abajo: Diferencias pareadas entre la actividad exploratoria al inicio del entrenamiento (Pre) y al inicio del testeo de memoria (Post). Nótese que las moscas mostraron un aumento significativo en la actividad locomotora cuando fueron testeadas en el mismo contexto o en uno similar, pero no en un contexto diferente. P-valor, prueba de Wilcoxon para datos pareados, $n = 12$.

Los resultados de este experimento también permiten confirmar que el aumento de actividad observado en el inicio del testeo respecto del inicio del entrenamiento efectivamente era el resultado de una memoria de reconocimiento de contexto, ya que sólo ocurrió en un contexto en el que los animales habían sido expuestos previamente o en uno similar, pero no en uno distinto. De esta forma se descarta la posibilidad de que el aumento de actividad se debiera a algún otro motivo, por ejemplo, al estrés generado por la manipulación del animal entre las etapas de entrenamiento y testeo.

Comparación con mutante clásico de memoria: *dnc¹*

El gen *dunce* (*dnc*) codifica una fosfodiesterasa específica para adenosín monofosfato cíclico (AMPC), responsable de la degradación del AMPC. La fosfodiesterasa *dnc* juega un rol esencial en la plasticidad neuronal y conductual, incluyendo el desarrollo y la función sináptica, el comportamiento aprendido, la respuesta a estímulos o el cortejo (Nighorn, Healy, et al. 1991; Duerr, J. y Quinn 1982; Dudai, Jan, et al. 1976; Koemans, Oppitz, et al. 2017).

El mutante clásico de memoria *dnc¹* muestra un aprendizaje deficiente en experimentos de condicionamiento clásico y en habituación refleja (Asztalos, Arora, et al. 2007; Duerr, J. y Quinn 1982; Dudai, Jan, et al. 1976). El objetivo de los siguientes experimentos fue determinar si *dnc¹* también muestra una deficiencia en la habituación y la memoria al contexto.

Como se mencionó anteriormente, se decidió utilizar el protocolo de una única sesión de entrenamiento de 10 minutos para todos los experimentos. Se analizó la habituación en el genotipo silvestre y en el mutante *dnc¹*. Contrario a lo que se esperaba, *dnc¹* mostró una mayor memoria de habituación y un comportamiento menos variable que el genotipo silvestre (Figura 27).

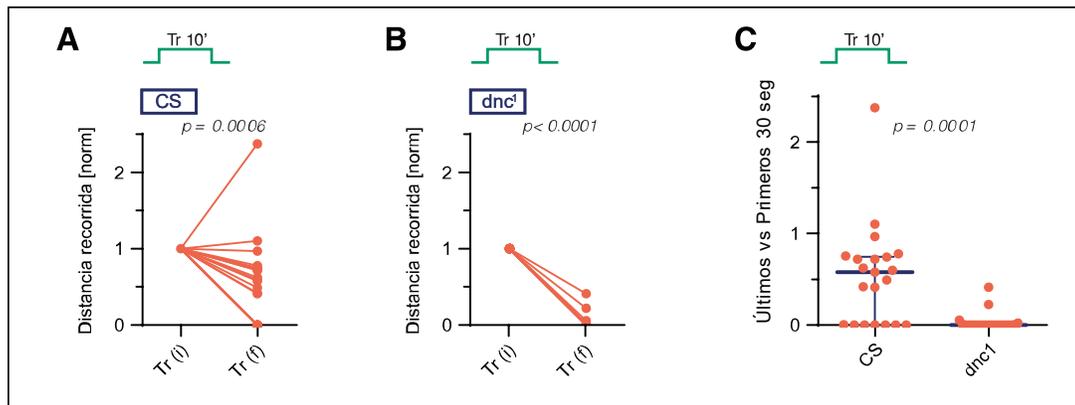


Figura 27. El mutante clásico de memoria *dnc¹* mostró una memoria de habituación mayor. Arriba: Representación esquemática del protocolo de entrenamiento. Abajo: Diferencias pareadas entre la distancia recorrida al inicio (Tr(i)) y al final (Tr(f)) del entrenamiento en moscas de genotipo silvestre (A) o *dnc¹* (B). Cada punto representa un individuo. P-valor, prueba de Wilcoxon para datos pareados. (C) Habitación: diagrama de dispersión con puntos indicando individuos, barras gruesas indicando medianas y barras finas indicando rango intercuartil. P-valor, prueba de Mann-Whitney, n= 21.

Se analizó también la memoria inmediata de ambos grupos y nuevamente se observaron resultados contrarios a lo esperado, ya que tanto el grupo silvestre como el grupo *dnc¹* mostraron memoria, y no hubo diferencias entre ambos (Figura 28).

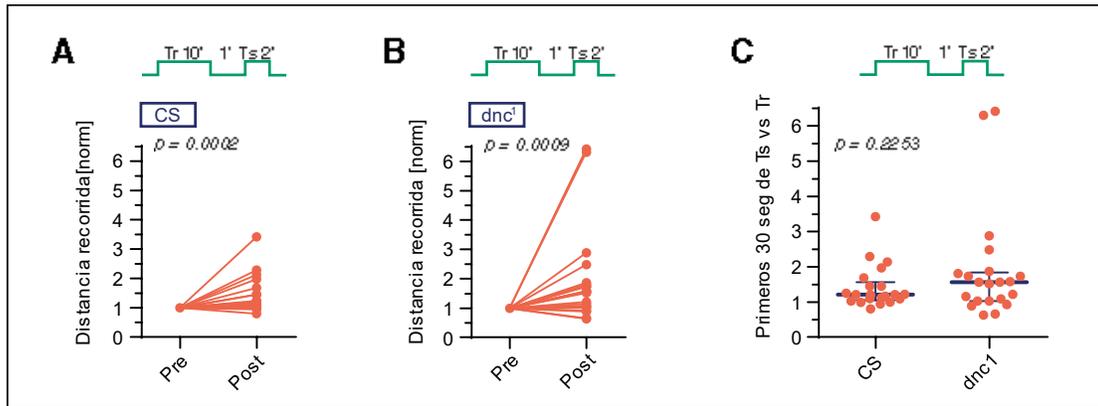


Figura 28. El mutante clásico *dnc¹* no tiene un defecto en memoria de contexto inmediata. Arriba: Representación esquemática del protocolo de entrenamiento. Abajo: Diferencias pareadas entre la distancia recorrida al inicio del entrenamiento (Pre) y un minuto después del entrenamiento (Post) en moscas de genotipo silvestre (A) o *dnc¹* (B). Cada punto representa un individuo. P-valor, prueba de Wilcoxon para datos pareados. (C) Memoria de contexto inmediata: diagrama de dispersión con puntos indicando individuos, barras gruesas indicando medianas y barras finas indicando rango intercuartil. P-valor, prueba de Mann-Whitney, n= 21.

La memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo tienen mecanismos moleculares subyacentes distintos (Izquierdo, Medina, et al. 1999). Dado que no hubo diferencias en la memoria inmediata, se decidió estudiar la memoria a largo plazo para evaluar si en esta etapa *dnc¹* presentaba algún tipo de deficiencia. Se entrenó a los animales con una sesión única de 10 minutos, pero en lugar de realizar el testeo luego de un minuto de finalizado el entrenamiento, se dejaron pasar 24 horas antes de testear la memoria. Como en el caso anterior, tampoco se encontró diferencia en la memoria a largo plazo (Figura 29), lo que indica que *dnc¹* no presenta deficiencias de aprendizaje en un paradigma de reconocimiento de contexto.

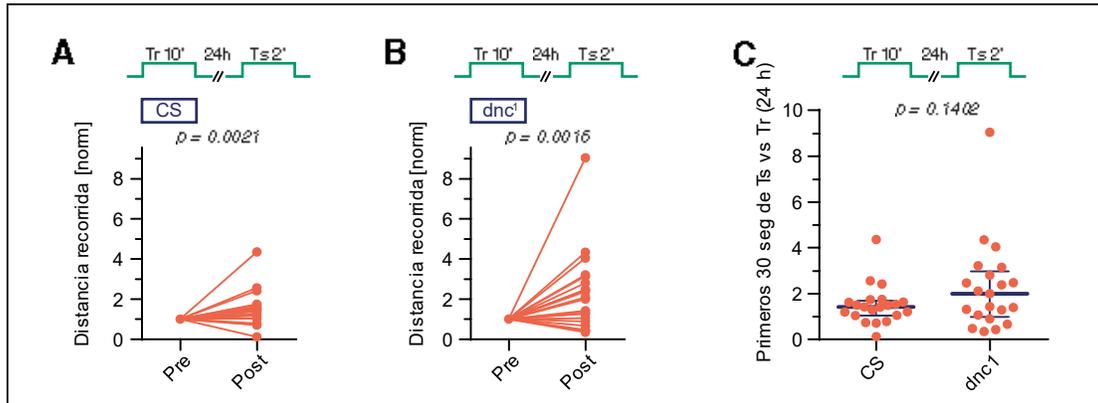


Figura 29. El mutante clásico de memoria *dnc1* tiene memoria normal a las 24 horas. Arriba: Representación esquemática del protocolo de entrenamiento. Abajo: Diferencias pareadas entre la distancia recorrida al inicio del entrenamiento (Pre) y 24 horas después del entrenamiento (Post) en moscas de genotipo silvestre (A) o *dnc1* (B). Cada punto representa un individuo. P-valor, prueba de Wilcoxon para datos pareados. (C) Memoria de contexto a las 24 horas: diagrama de dispersión con puntos indicando individuos, barras gruesas indicando medianas y barras finas indicando rango intercuartil. P-valor, prueba de Mann-Whitney, n= 21.

Habiendo comprobado que *dnc1* tiene un aprendizaje normal con este paradigma, se decidió estudiar si mostraba diferencias en el comportamiento de generalización. Para probarlo, se volvió a realizar el ensayo con cambio de contexto utilizado anteriormente para evaluar la especificidad de la memoria. En este caso los animales fueron entrenados en un contexto y testados en el mismo contexto o en uno diferente. En ambos casos *dnc1* mostró memoria (Figura 30).

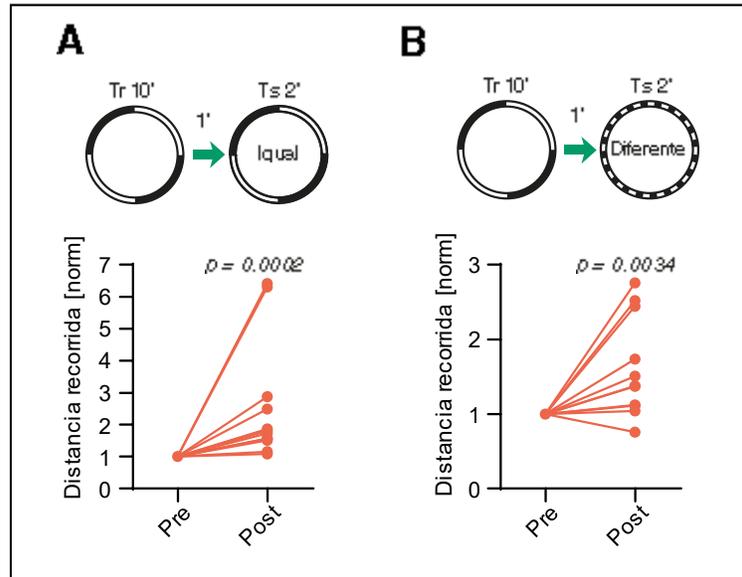


Figura 30. La fosfodiesterasa *dnc* controla la generalización de la memoria de contexto. Arriba: Representación esquemática del entrenamiento en un contexto y la prueba de memoria en el mismo contexto o en un contexto diferente. Abajo: Diferencias pareadas entre la actividad exploratoria al inicio del entrenamiento (Pre) y al inicio del testeo de memoria (Post) en moscas mutantes *dnc¹* testeadas en el mismo contexto (**A**) o en un contexto diferente (**B**). P-valor, prueba de Wilcoxon unidireccional para diferencias pareadas, n=12.

Se comparó la memoria de *dnc¹* con la del genotipo silvestre. *Dnc¹* mostró una memoria más alta, tanto cuando los animales se entrenaron y testearon en el mismo contexto como cuando se testearon en un contexto distinto (Figura 31). Cabe destacar que el genotipo silvestre no mostró memoria cuando se lo testeó en un contexto diferente al del entrenamiento ($p=0.2847$) (ver Figura 26) pero *dnc¹* sí ($p=0.0034$). Este análisis sugiere que la fosfodiesterasa *dnc* participa en el proceso de generalización de la memoria de contexto.

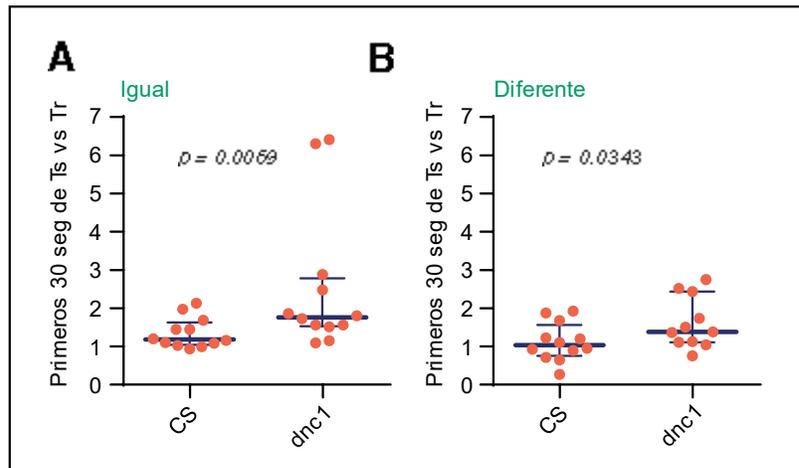


Figura 31. Memoria de moscas silvestres o *dnc¹* entrenadas y testeadas en el mismo contexto o en uno diferente. Diagrama de puntos de dispersión mostrando medianas y rango intercuartil de moscas silvestres (CS) vs mutantes *dnc¹* testeadas en el mismo contexto (A) o en uno diferente (B). P-valor, prueba de Mann-Whitney, n=12.

Sección B. Efecto de la manipulación de la actividad neuronal sobre la actividad locomotora y los niveles de aprendizaje y memoria

Esta segunda etapa consistió en la manipulación por inducción térmica de distintos grupos de neuronas para evaluar su participación sobre la actividad locomotora y los niveles de aprendizaje y memoria. Se utilizó el sistema GAL4-UAS para dirigir los transgenes a grupos neuronales específicos y manipular la transmisión sináptica o excitabilidad neuronal. Para los experimentos se utilizó el ensayo de reconocimiento de contexto presentado en las secciones previas utilizando el protocolo de entrenamiento 1 (Tr 10' + Ret. 1' + Ts 2') (ver Materiales y Métodos).

Prueba de inducción térmica bajo control regulatorio del sistema GAL4/UAS

Antes de comenzar con los ensayos con inducción térmica sobre poblaciones de neuronas dopaminérgicas específicas, se realizó una prueba del sistema de expresión a utilizar. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que el bloqueo de la transmisión sináptica por medio de *UAS-shi^{ts1}* en el patrón *TH-GAL4* (todas las neuronas dopaminérgicas, excepto el grupo PAM) producía una parálisis casi completa. Por lo tanto, se usó esta estrategia para confirmar que el sistema GAL4/UAS funcionara correctamente. Se hizo una inducción térmica

a 30 °C durante 10 minutos en el genotipo *TH-GAL4;UAS-shi^{ts1}*. Luego se los expuso al contexto por otros 10 minutos manteniendo la temperatura de 30 °C. La distancia recorrida fue prácticamente nula durante todo el ensayo (Figura 32B). En contraste, en animales entrenados a 23 °C sin inducción térmica, se observó un nivel de actividad relativamente normal (Figura 32A). Estos resultados mostraron una clara diferencia de comportamiento al modificar la temperatura, indicando que el sistema GAL4/UAS y las condiciones de inducción térmica funcionaban adecuadamente.

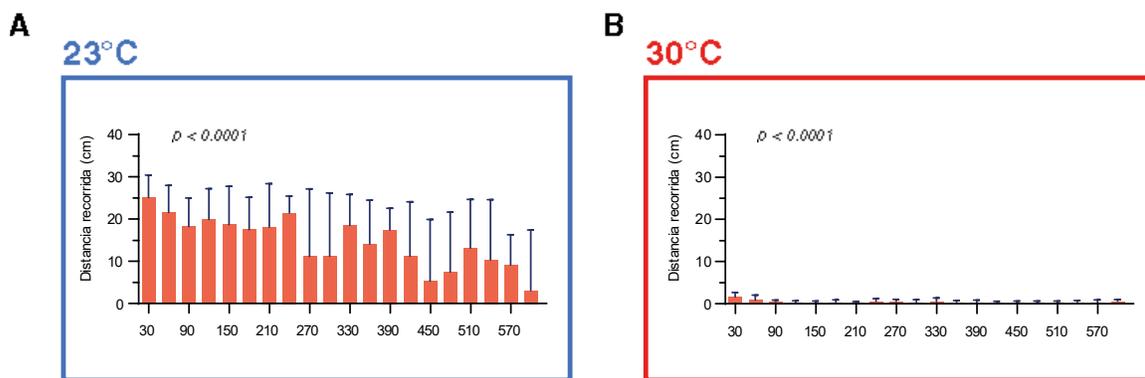


Figura 32. Actividad exploratoria en moscas *TH-GAL4;UAS-shi^{ts1}* durante una sesión de entrenamiento de 10 minutos. Distancia absoluta recorrida en función del tiempo en segmentos de 30 segundos a 23 °C (A) o a 30 °C (B). Cada barra representa un segmento de 30 segundos, indicando la mediana y el rango intercuartil. P-valor, prueba de Friedman de comparaciones múltiples, seguida de corrección de Dunn, n=12.

Neuromodulación dopaminérgica sobre MB

Nuestros análisis de comportamiento previos implicaron a la fosfodiesterasa *dnc* en la habituación y la generalización de la memoria de contexto. Por otro lado, ya que *dnc* se encuentra enriquecida en neuronas de MBs (Nighorn, Healy, et al. 1991), éste podrían ser el sitio de la neuromodulación dopaminérgica en aprendizaje contextual. Para testear esta hipótesis se estudiaron dos grupos de neuronas dopaminérgicas que modulan la actividad de MB ((Liu, Plaçais, et al. 2012).

Bloqueo de la transmisión sináptica en las neuronas del grupo PAM

Las neuronas dopaminérgicas del grupo PAM inervan los lóbulos horizontales de MB y han sido asociadas con aprendizaje y memoria olfatoria, y también con el procesamiento de

información contradictoria durante la toma de decisión y la integración entre el estado motivacional de hambre y la formación de memoria apetitiva (Krashes, DasGupta, et al. 2009; Aso, Herb, et al. 2012; Liu, Plaçais, et al. 2012; Yamagata, Ichinose, et al. 2015; Lewis, Siju, et al. 2015).

Habitación

Para manipular la actividad de estas neuronas se utilizó la línea *R58E02-GAL4* (Liu, Plaçais, et al. 2012). En este patrón, se expresó *UAS-shi^{ts1}*, para bloquear la transmisión sináptica por medio de inducción térmica. Los animales *R58E02-GAL4;UAS-shi^{ts1}* no mostraron habituación a 23 °C (Figura 33A), indicando que este genotipo, aun con neurotransmisión normal, no logra habituarse. En contraste, cuando se bloqueó la transmisión sináptica del grupo PAM (30 °C) sí se observó una caída en la actividad exploratoria (Figura 33B). Estos resultados sugieren que el grupo PAM participa en un mecanismo que naturalmente previene la habituación.

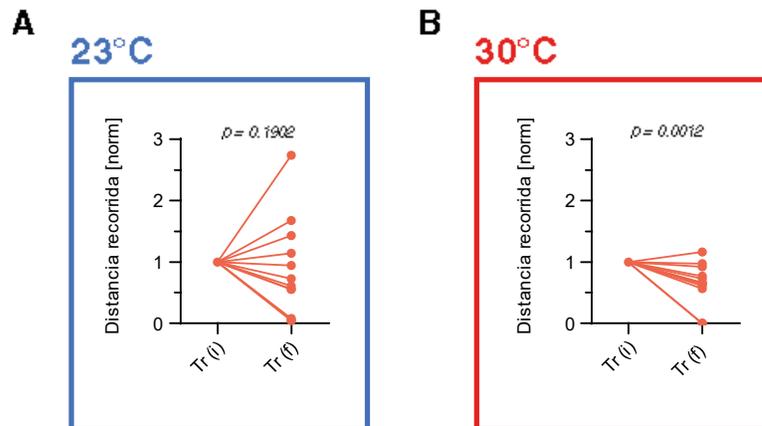


Figura 33. Efecto del bloqueo sináptico de neuronas del grupo PAM sobre la caída en la actividad exploratoria. Diferencias pareadas entre la distancia recorrida al inicio (Tr(i)) y al final (Tr(f)) del entrenamiento a 23 °C (A) o 30 °C (B) en el genotipo *R58E02-GAL4;UAS-shi^{ts1}*. Cada punto representa un individuo. P-valor, prueba de Wilcoxon para datos pareados, n= 12.

A fin de evaluar si los transgenes individuales generaban un efecto por sí mismos, se analizó el comportamiento del doble transgénico en comparación con sus líneas parentales (*R58E02-GAL4;+ y +;UAS-shi^{ts1}*). Como se esperaba, a 23 °C no se observaron diferencias en la habituación entre los distintos genotipos, ya que en estas condiciones la transmisión sináptica

debería ser normal. Por otro lado, contrario a lo esperado, a 30 °C no hubo diferencias entre la habituación del doble transgénico y sus parentales (Figura 34). Al analizar la distribución de los datos, a 23 °C se vio una gran variabilidad en el comportamiento de los dobles transgénicos (CV 89.47 %), pero cuando se bloqueó la transmisión sináptica a 30 °C la heterogeneidad de la muestra se redujo (CV 53.87 %). A simple vista, este resultado parecería indicar que el bloqueo sináptico de las neuronas del grupo PAM acota la variabilidad del comportamiento. Para testear esta idea se realizó una comparación de coeficientes de variación que mostró que la diferencia observada no fue significativa $p= 0,2610$; (Forkman 2009). De este análisis entonces debe concluirse que el bloqueo sináptico de PAM no afecta la variabilidad del comportamiento.

Por otro lado, en los genotipos parentales el comportamiento se volvió más variable al aumentar la temperatura (en *R58E02-GAL4*;+ el CV pasó de 27.40 % a 82.04 % y en +;*UAS-shi^{ts1}* el CV pasó de 23.02 % a 51.48 %). Al comparar los coeficientes de variación, en estos casos la diferencia fue significativa ($p= 0.0064$ para *R58E02-GAL4*;+ y $p= 0.0247$ para +;*UAS-shi^{ts1}*), sugiriendo un efecto resultante de la interacción entre los transgenes y la temperatura.

Estos resultados en conjunto muestran que el grupo PAM no está involucrado en la habituación.

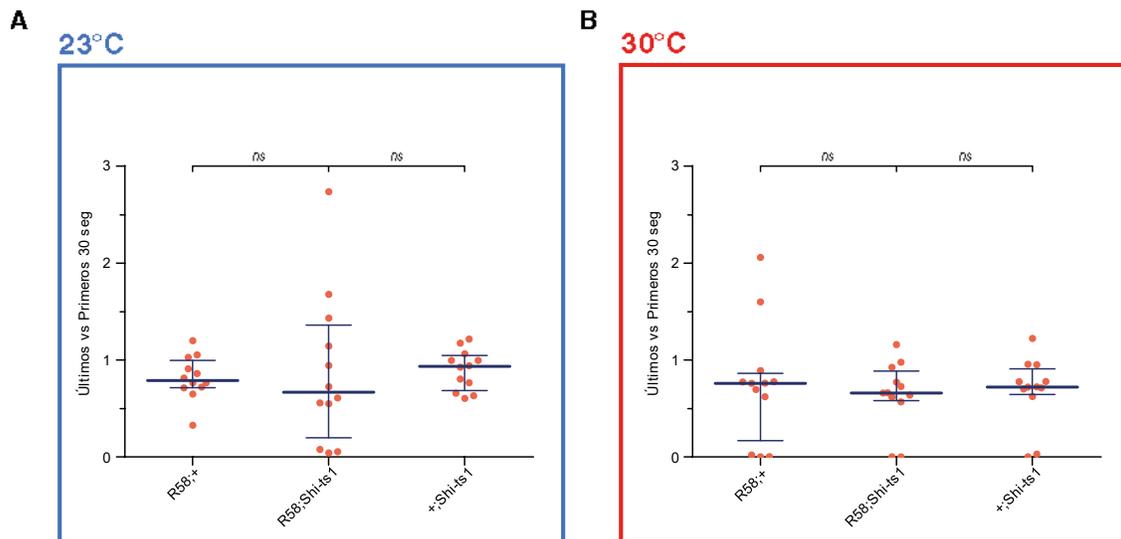


Figura 34. Efecto del bloqueo sináptico de neuronas del grupo PAM sobre la habituación. Habitación a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en *R58E02-GAL4*; *UAS-shi^{ts1}* (*R58*; *shi-ts1*) y sus líneas parentales *R58E02-GAL4*;+ (*R58*;+) y +;*UAS-shi^{ts1}* (+;*shi-ts1*) durante el entrenamiento de 10 minutos. Diagrama de dispersión con puntos representando individuos, mostrando la mediana

(línea gruesa) y el rango intercuartil. P-valor, prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn para comparaciones múltiples, n= 12.

Memoria inmediata

Una vez analizada la habituación, se evaluó la memoria inmediata al bloquear la transmisión sináptica del grupo PAM. A 23 °C los animales *R58E02-GAL4;UAS-shi^{ts1}* no mostraron memoria (Figura 35A). La falta de memoria podría indicar que la sola presencia de los transgenes produce un efecto en el aprendizaje. En este caso también debe tenerse en cuenta que hubo una variabilidad alta entre individuos (CV 63.60%) por lo que un entrenamiento más fuerte o un mayor tamaño muestral podría llevar a resultados más concluyentes. A 30 °C tampoco se observó memoria inmediata (Figura 35B). Considerando que el comportamiento no fue distinto al aumentar temperatura, se debe concluir que la actividad del grupo PAM no es necesaria para la memoria de contexto. Los resultados observados parecen estar más relacionados con la presencia de los transgenes en sí mismos que con la manipulación de la actividad neuronal.

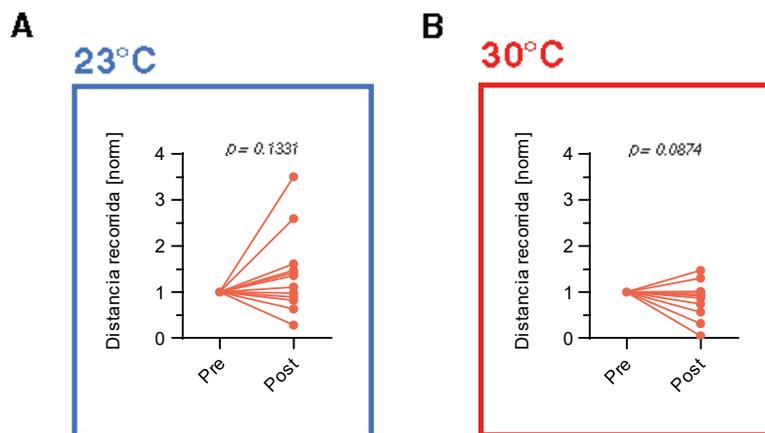


Figura 35. Efecto del bloqueo sináptico de las neuronas del grupo PAM sobre la actividad exploratoria post entrenamiento. Diferencias pareadas entre la distancia recorrida al inicio del entrenamiento (Pre) y al inicio del testeo (Post) a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en el genotipo *R58E02-GAL4;UAS-shi^{ts1}*. Cada punto representa un individuo. P-valor, prueba de Wilcoxon para datos pareados, n= 12.

Al comparar la memoria de *R58E02-GAL4;UAS-shi^{ts1}* con sus genotipos parentales (*R58E02-GAL4;+* y *++;UAS-shi^{ts1}*), no se vieron diferencias ni a 23 ni a 30 °C, apoyando la interpretación de que las neuronas del grupo PAM no participan de la memoria de contexto (Figura 36). Al igual que para habituación, en memoria inmediata se observó una reducción no significativa de la variabilidad en el comportamiento de los animales dobles transgénicos al aumentar la temperatura (el CV pasó de 63.30% a 46.07%; $p=0,4133$; (Forkman 2009).

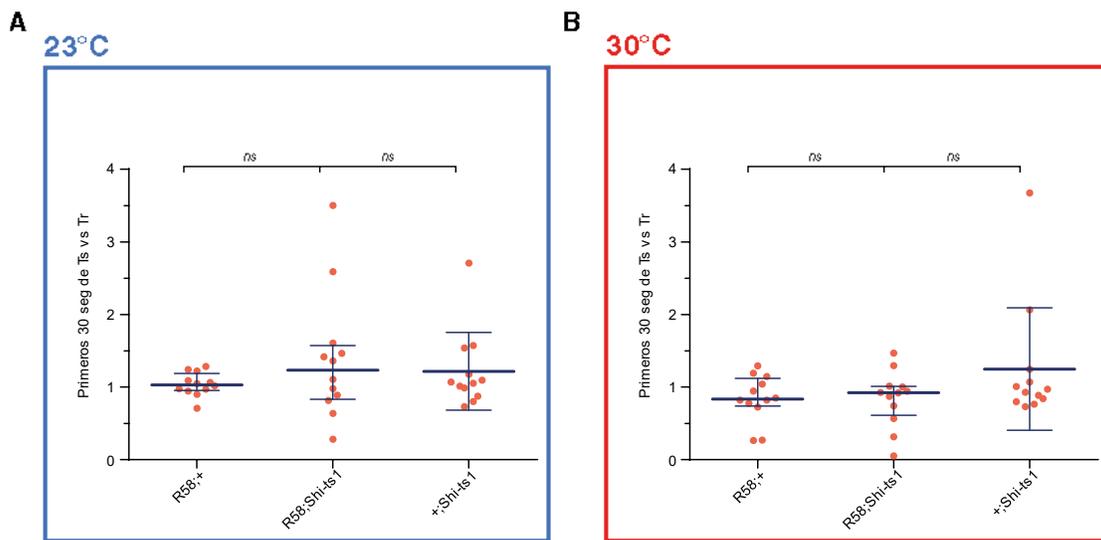


Figura 36. Efecto del bloqueo sináptico de neuronas del grupo PAM sobre la memoria inmediata. Memoria de contexto a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en *R58E02-GAL4;UAS-shi^{ts1}* (*R58;shi-ts1*) y sus genotipos parentales *R58E02-GAL4;+* (*R58;+*) y *++;UAS-shi^{ts1}* (*++;shi-ts1*) luego de un entrenamiento de 10 minutos. Diagrama de dispersión con puntos representando individuos, mostrando la mediana (línea gruesa) y el rango intercuartil. P-valor, prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn para comparaciones múltiples, $n=12$.

Aumento de la transmisión sináptica en las neuronas del grupo PAM

Para confirmar la interpretación del fenotipo conductual observado con *R58E02-GAL4;UAS-shi^{ts1}*, se realizaron experimentos con inducción térmica para aumentar la transmisión sináptica de las DANs del grupo PAM. Estas manipulaciones se hicieron expresando el canal catiónico *TrpA1* en el patrón *R58E02-GAL4* por medio del sistema GAL4/UAS.

Habitación

Los animales *R58E02-GAL4;UAS-TrpA1* mostraron habitación a 23 °C, pero no a 30 °C, sugiriendo que las neuronas del grupo PAM regulan la habitación (Figura 37).

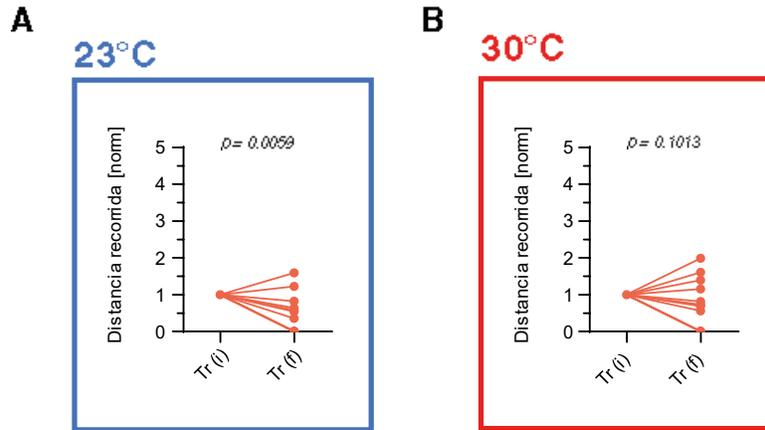


Figura 37. Efecto del aumento de la excitabilidad en neuronas del grupo PAM sobre la caída de la actividad exploratoria. Diferencias pareadas entre la distancia recorrida al inicio (Tr(i)) y al final (Tr(f)) del entrenamiento a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en el genotipo *R58E02-GAL4;UAS-TrpA1*. Cada punto representa un individuo. P-valor, prueba de Wilcoxon para datos pareados, n= 12.

Sin embargo, al comparar la habitación de *R58E02-GAL4;UAS-TrpA1* con sus líneas parentales (*R58E02-GAL4;+ +;UAS-TrpA1*) no se vieron diferencias con o sin inducción térmica (Figura 38). Este resultado, junto con los experimentos de bloqueo sináptico (Figura 34), confirmaría la interpretación de que el grupo PAM no participa en la habitación.

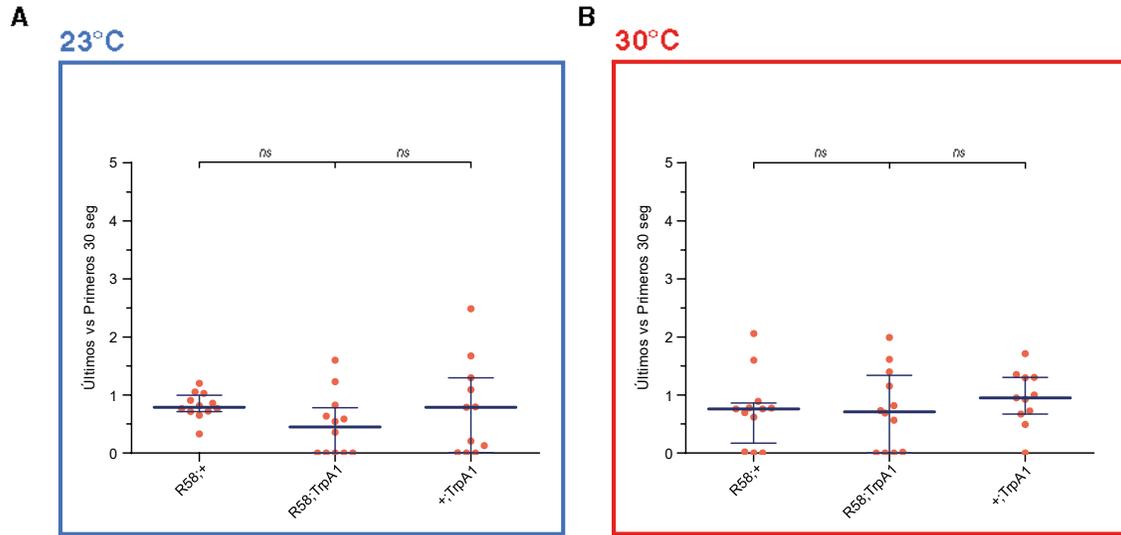


Figura 38. Efecto del aumento de la excitabilidad en neuronas del grupo PAM sobre la habituación. Habitación a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en *R58E02-GAL4;UAS-TrpA1* (*R58;TrpA1*) y sus líneas parentales *R58E02-GAL4;+* (*R58;+*) y *+*; *UAS-TrpA1* (*+;TrpA1*) luego de un entrenamiento de 10 minutos. Diagrama de dispersión con puntos representando individuos, mostrando la mediana (línea gruesa) y el rango intercuartil. P-valor, prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn para comparaciones múltiples, n= 12.

Memoria inmediata

Se evaluó luego el efecto de aumentar la excitabilidad en neuronas del grupo PAM sobre la memoria inmediata. El genotipo *R58E02-GAL4;UAS-TrpA1* mostró memoria inmediata a 23 °C, pero no a 30 °C (Figura 39), sugiriendo que las neuronas del grupo PAM regulan la memoria de contexto.

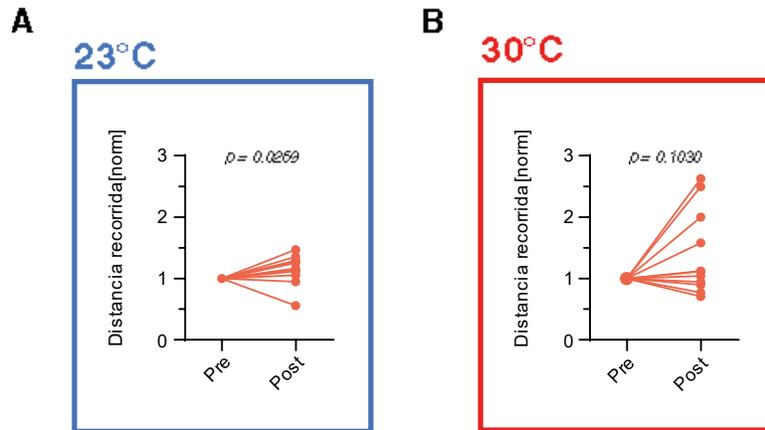


Figura 39. Efecto del aumento de la excitabilidad en neuronas del grupo PAM sobre la actividad exploratoria post entrenamiento. Diferencias pareadas entre la distancia recorrida al inicio del entrenamiento (Pre) y al inicio del testeo (Post) a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en el genotipo *R58E02-GAL4;UAS-TrpA1*. Cada punto representa un individuo. P-valor, prueba de Wilcoxon para datos pareados, n=12.

Sin embargo, cuando se comparó la memoria de *R58E02-GAL4;UAS-TrpA1* con sus genotipos parentales (*R58E02-GAL4;+ y +;UAS-TrpA1*) no se vieron diferencias a 23 ni a 30 °C (Figura 40). Estos resultados sugieren que el grupo PAM no participa en la memoria de contexto o que sus efectos son muy pequeños para ser detectados con el tamaño muestral y el protocolo utilizados. Cabe destacar que con el aumento de la excitabilidad neuronal en el patrón *R58E02-GAL4* se vio incrementada la variabilidad de la memoria (Figura 41; el coeficiente de variación de *R58E02-GAL4;UAS-TrpA1* pasó de 21,17% a 49,49%; $p = 0.0171$ con prueba realizada según Forkman 2009). A su vez, el bloqueo sináptico en estas neuronas había mostrado una reducción no significativa de la variabilidad (Figura 37). Estas observaciones sugieren que las DANs del grupo PAM no impactan en la mediana de memoria de contexto, pero sí podrían influir en una tendencia a modificar la heterogeneidad del comportamiento entre individuos.

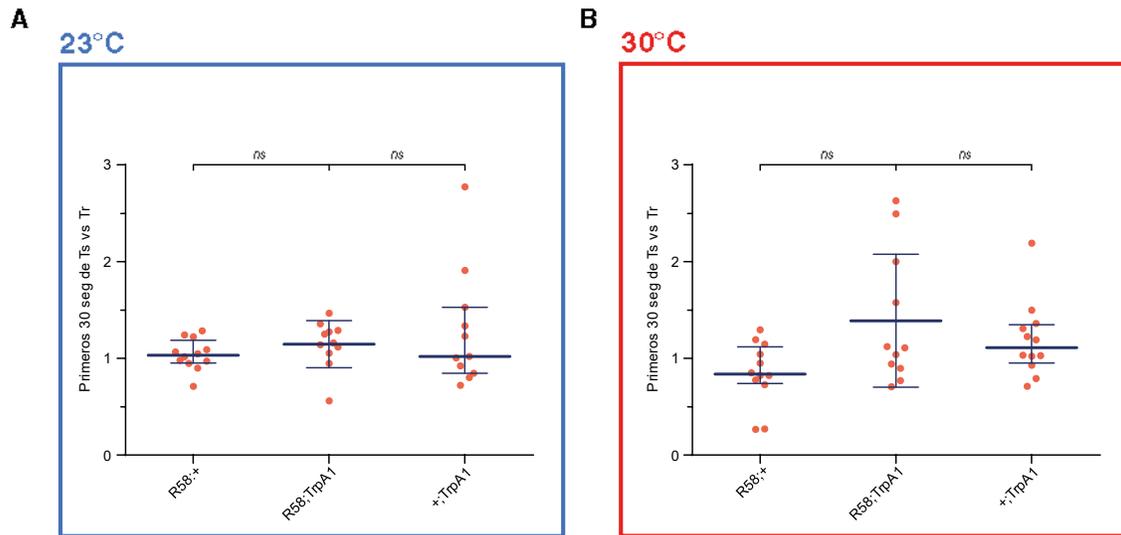


Figura 40. Efecto del aumento de la en neuronas del grupo PAM sobre la memoria inmediata. Memoria de contexto a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en *R58E02-GAL4;UAS-TrpA1* (*R58;TrpA1*) y sus líneas parentales *R58E02-GAL4;+* (*R58;+*) y *+;UAS-TrpA1* (*+;TrpA1*) luego de un entrenamiento de 10 minutos. Diagrama de dispersión con puntos representando individuos, mostrando la mediana (línea gruesa) y el rango intercuartil. P-valor, prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn para comparaciones múltiples, n= 12.

Bloqueo de la transmisión sináptica en las neuronas del grupo PPL1

Las neuronas protocerebrales posteriores laterales (PPL1) inervan los lóbulos verticales de MB (Mao y Davis 2009) y han sido relacionadas con la transmisión del refuerzo negativo en condicionamiento olfatorio (Aso, Herb, et al. 2012).

Habitación

Para manipular la actividad de estas neuronas se utilizó la línea *TH-D4-GAL4*, expresando *UAS-shi^{ts1}* en este patrón para bloquear la transmisión sináptica por medio de inducción térmica.

Los animales *TH-D4-GAL4;UAS-shi^{ts1}* no mostraron habitación a 23 °C (Figura 41A), evidenciando dificultad de este genotipo para habituar a pesar de que la neurotransmisión era normal. En cambio, al bloquear la transmisión sináptica del grupo PPL1 (30 °C), sí se observó una caída significativa en la actividad exploratoria (Figura 41B), sugiriendo que la actividad del grupo PPL1 previene la habitación.

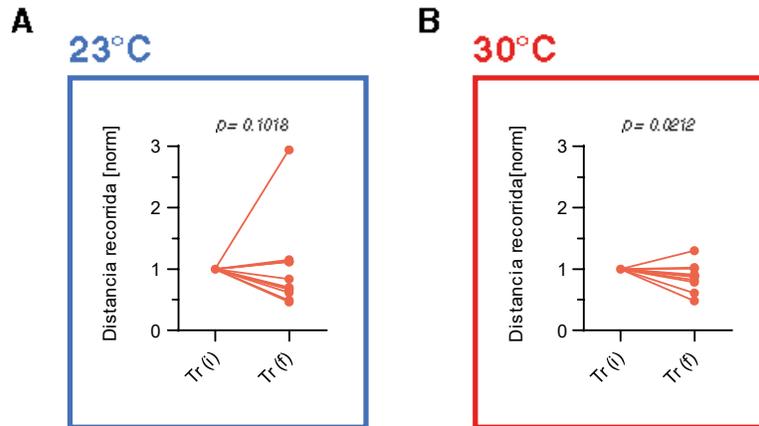


Figura 41. Efecto del bloqueo sináptico de neuronas del grupo PPL1 sobre la caída en la actividad exploratoria. Diferencias pareadas entre la distancia recorrida al inicio (Tr(i)) y al final (Tr(f)) del entrenamiento a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en el genotipo *TH-D4-GAL4;UAS-shi^{ts1}*. Cada punto representa un individuo. P-valor, prueba de Wilcoxon para datos pareados, n= 12.

Para evaluar si los transgenes individuales generan un efecto por sí mismos, se comparó la habituación del doble transgénico *TH-D4-GAL4;UAS-shi^{ts1}* con sus respectivos parentales (*TH-D4-GAL4;+* y *+/UAS-shi^{ts1}*). Conforme a lo esperado, en condiciones de transmisión sináptica normal (23 °C) no hubo diferencias de habituación entre los distintos genotipos (Figura 42A). Por otro lado, al bloquear la transmisión sináptica a 30 °C tampoco se observaron diferencias entre la habituación del doble transgénico y sus parentales, contrario a lo esperado (Figura 42B). Al analizar la distribución de los datos, a 23 °C se vio una variación alta entre individuos dobles transgénicos (CV 66.96%) pero a 30 °C esta variación se redujo (CV 23.33%; $p = 0.0056$), sugiriendo que el bloqueo sináptico de las neuronas del grupo PPL1 acota la variabilidad de la habituación.

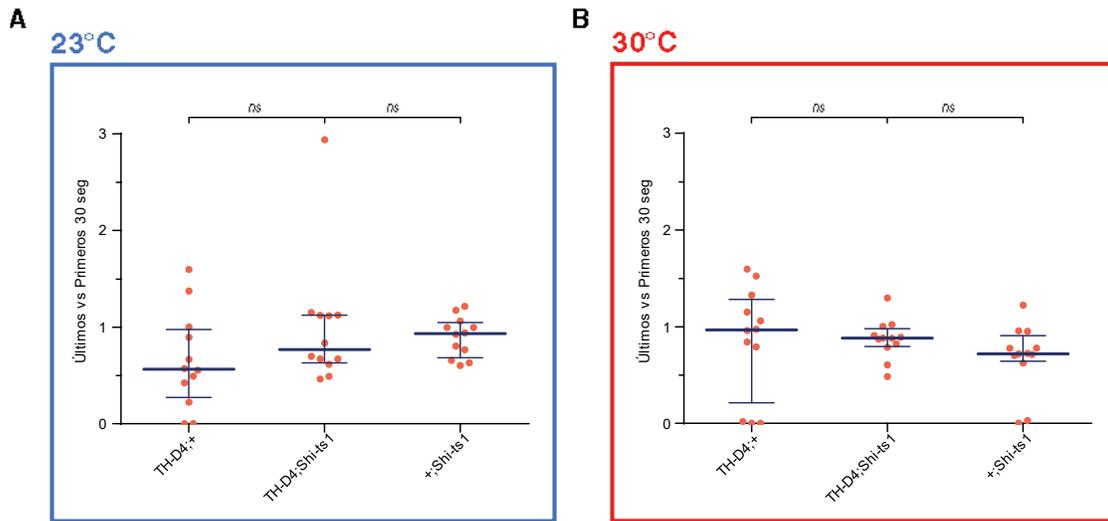


Figura 42. Efecto del bloqueo sináptico de neuronas del grupo PPL1 sobre la habituación. Habitación a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en *TH-D4-GAL4;UAS-shi^{ts1}* (*TH-D4;shi-ts1*) y sus líneas parentales *TH-D4-GAL4;+* (*TH-D4;+*) y *+;UAS-shi^{ts1}* (*+;shi-ts1*) luego de un entrenamiento de 10 minutos. Diagrama de dispersión con puntos representando individuos, mostrando la mediana (línea gruesa) y el rango intercuartil. P-valor, prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn para comparaciones múltiples, n= 12.

Memoria inmediata

Luego se evaluó la memoria inmediata al bloquear la transmisión sináptica del grupo PPL1. *TH-D4-GAL4;UAS-shi^{ts1}* mostró memoria a 23 °C tal como se esperaba (Figura 43A). En cambio, a 30 °C no se observó memoria, sugiriendo que la actividad de PPL1 es necesaria para la memoria inmediata (Figura 43B).

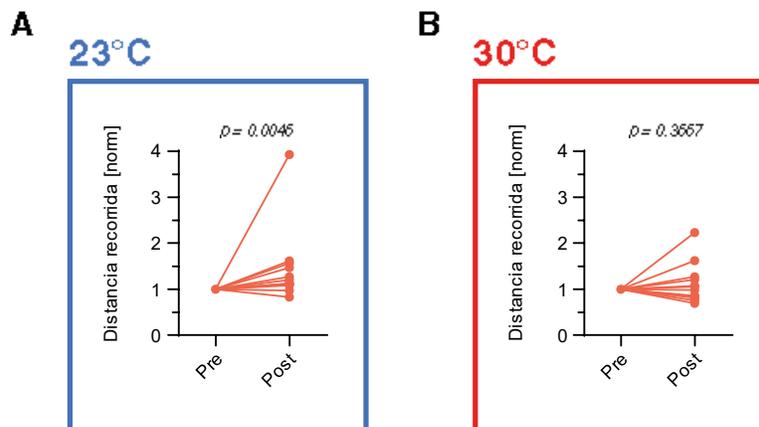


Figura 43. Efecto del bloqueo sináptico de las neuronas del grupo PPL1 sobre la actividad exploratoria post entrenamiento. Diferencias pareadas entre la distancia recorrida al inicio

del entrenamiento (Pre) y al inicio del testeo (Post) a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en el genotipo *TH-D4-GAL4;UAS-shi^{ts1}*. Cada punto representa un individuo. P-valor, Prueba de Wilcoxon para datos pareados, n= 12.

Sin embargo, al comparar la memoria de *TH-D4-GAL4;UAS-shi^{ts1}* con sus parentales (*TH-D4-GAL4;+ y +;UAS-shi^{ts1}*) no se observaron diferencias ni a 23 °C ni a 30 °C, sugiriendo que las DANs del patrón *TH-D4-GAL4* no participan en dicho comportamiento (Figura 44).

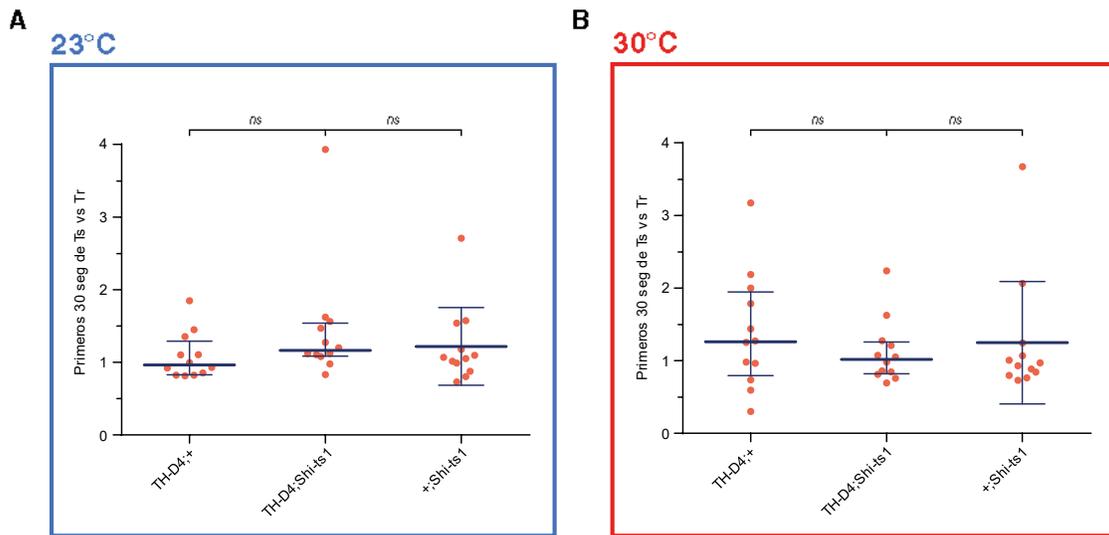


Figura 44. Efecto del bloqueo sináptico de neuronas del grupo PPL1 la memoria inmediata. Memoria de contexto a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en *TH-D4-GAL4;UAS-shi^{ts1}* (*TH-D4;shi-ts1*) y sus líneas parentales *TH-D4-GAL4;+* (*TH-D4;+*) y *+;UAS-shi^{ts1}* (*+;shi-ts1*) luego de un entrenamiento de 10 minutos. Diagrama de dispersión con puntos representando individuos, mostrando la mediana (línea gruesa) y el rango intercuartil. P-valor, prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn para comparaciones múltiples, n= 12.

Aumento de la transmisión sináptica en las neuronas del grupo PPL1

Los experimentos anteriores sugirieron que PPL1 no participa en la habituación al contexto o en el reconocimiento de contexto. A fin de confirmar estos resultados, se realizaron ensayos con inducción térmica para aumentar la excitabilidad de las neuronas de PPL1 por medio de la expresión de *UAS-TrpA1* en el patrón *TH-D4-GAL4*.

Habitación

Los animales *TH-D4-GAL4;UAS-TrpA1* mostraron habitación a 23 °C, pero no a 30 °C, apoyando la hipótesis de que las neuronas del grupo PPL1 regulan la habitación (Figura 45).

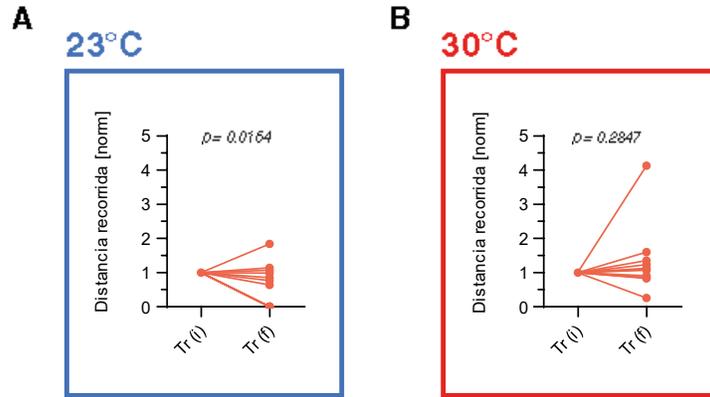


Figura 45. Efecto del aumento de la transmisión sináptica en neuronas del grupo PPL1 sobre la caída de la actividad exploratoria. Diferencias pareadas entre la distancia recorrida al inicio (Tr(i)) y al final (Tr(f)) del entrenamiento a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en el genotipo *TH-D4-GAL4;UAS-TrpA1*. Cada punto representa un individuo. P-valor, Prueba de Wilcoxon para datos pareados, n= 12.

Pero al comparar la habitación de *TH-D4-GAL4;UAS-TrpA1* con sus líneas parentales (*TH-D4-GAL4;+ y +;UAS-TrpA1*) no se observaron diferencias significativas, indicando que estas neuronas no participan en la habitación (Figura 46).

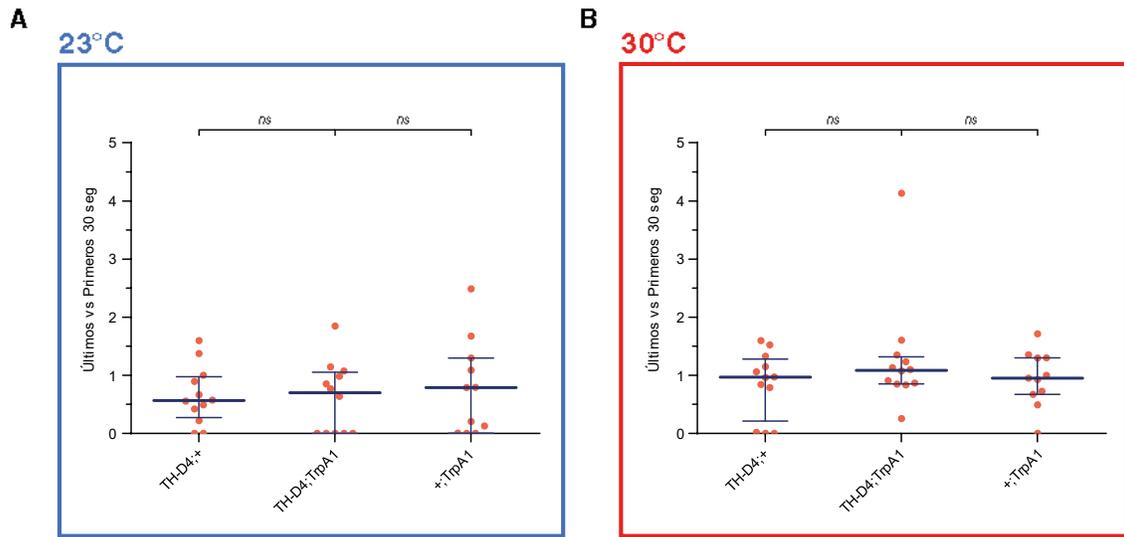


Figura 46. Efecto del aumento de la transmisión sináptica en neuronas del grupo PPL1 sobre la habituación. Habitación a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en *TH-D4-GAL4;UAS-TrpA1* (*TH-D4;TrpA1*) y sus líneas parentales *TH-D4-GAL4;+* (*TH-D4;+*) y *+*; *UAS-TrpA1* (*+;TrpA1*) luego de un entrenamiento de 10 minutos. Diagrama de dispersión con puntos representando individuos, mostrando la mediana (línea gruesa) y el rango intercuartil. P-valor, prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn para comparaciones múltiples, n= 12.

Memoria inmediata

Posteriormente se evaluó el efecto de aumentar la excitabilidad en neuronas del grupo PPL1 sobre la memoria inmediata. El genotipo *TH-D4-GAL4;UAS-TrpA1* mostró memoria inmediata a 23 °C (Figura 47A), pero no a 30 °C, sugiriendo que las neuronas del grupo PPL1 regulan la memoria de contexto (Figura 47B).

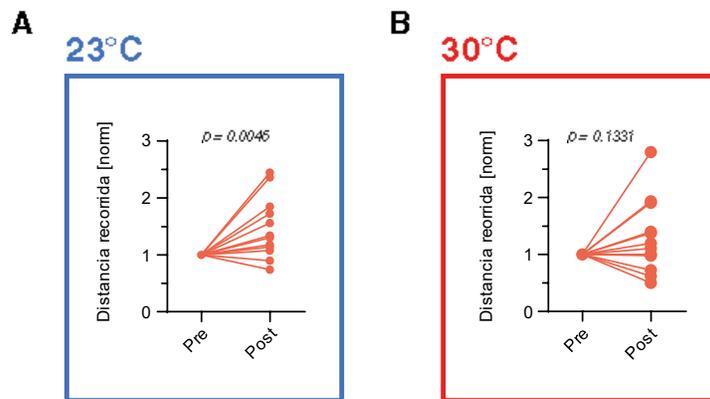


Figura 47. Efecto del aumento de la transmisión sináptica en neuronas del grupo PPL1 sobre la actividad exploratoria post entrenamiento. Diferencias pareadas entre la distancia

recorrida al inicio del entrenamiento (Pre) y al inicio del testeo (Post) a 23 °C (A) o a 30 °C (B) en el genotipo *TH-D4-GAL4;UAS-TrpA1*. Cada punto representa un individuo. P-valor, Prueba de Wilcoxon para datos pareados, n= 12.

Cuando se comparó la memoria de *TH-D4-GAL4;UAS-TrpA1* con sus genotipos parentales (*TH-D4-GAL4;+* y *+,UAS-TrpA1*) no se vieron diferencias a 23 °C, así como tampoco a 30 °C (Figura 48).

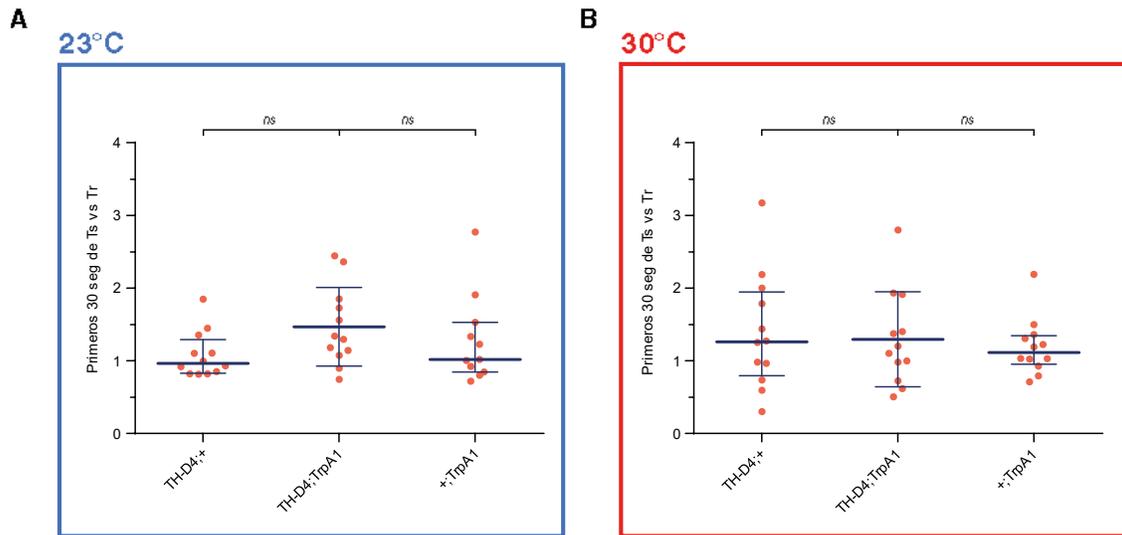


Figura 48. Efecto del aumento de la transmisión sináptica en neuronas del grupo PPL1 sobre la memoria inmediata. Memoria de contexto a 23 °C (A) o 30 °C (B) en *TH-D4-GAL4;UAS-TrpA1* (*TH-D4;TrpA1*) y sus líneas parentales *TH-D4-GAL4;+* (*TH-D4;+*) y *+,UAS-TrpA1* (*+,TrpA1*) luego de un entrenamiento de 10 minutos. Diagrama de dispersión con puntos representando individuos, mostrando la mediana (línea gruesa) y el rango intercuartil. P-valor, prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn para comparaciones múltiples, n= 12.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Sección A. Ensayo conductual y caracterización del comportamiento del animal de genotipo silvestre

En este trabajo, el primer paso fue caracterizar un ensayo que permitiera estudiar el aprendizaje y la memoria en un comportamiento que involucraba el reconocimiento de contexto. En base a estudios previos sobre comportamiento exploratorio en arenas abiertas (Soibam, Mann, et al. 2012), diseñamos un ensayo que consistió en exponer a un animal a un contexto previamente desconocido, con claves visuales que le permitieran identificarlo. Los animales entrenados con este paradigma mostraron una alta actividad locomotora inicial, seguida por una reducción estable de la misma, coincidente con lo observado por Soibam y coherente con un proceso de habituación. Asimismo, al exponer a los animales al contexto por segunda vez luego de un intervalo, se observó un aumento de actividad locomotora respecto al nivel de actividad al inicio del entrenamiento, sugiriendo una memoria de sensibilización. En conjunto, estos resultados indican que el paradigma de entrenamiento propuesto resulta un abordaje adecuado para estudiar aprendizaje y memoria de reconocimiento de contexto.

Este tipo de ensayo no se había utilizado para estudiar memoria, por lo que cabe preguntarse si el momento del testeo elegido para evaluar la memoria es el más apropiado. Se decidió cuantificar la memoria como la diferencia de actividad en los primeros 30 segundos (Pre vs Post) para evitar el decaimiento de la actividad, presumiblemente como respuesta a un reentrenamiento. Otros modos de cuantificar la memoria deberían considerarse en futuros estudios.

A diferencia del condicionamiento olfatorio clásico, uno de los paradigmas más utilizados (Tully y Quinn 1985), el ensayo de reconocimiento de contexto permite analizar aprendizaje y memoria en animales que se comportan libremente. Además, es relativamente rápido y sencillo de realizar. Debe considerarse también que el paradigma de condicionamiento olfatorio sólo permite observar a los animales al inicio y al final del ensayo, pero no es posible conocer lo que ocurre durante el transcurso del experimento. Este paradigma de reconocimiento de contexto resuelve esa limitación al permitir estudiar el comportamiento del animal durante la totalidad del ensayo.

En este nuevo paradigma, el mutante clásico de memoria *dnc^l*, tradicionalmente caracterizado como deficiente en aprendizaje asociativo y no asociativo, no mostró ningún tipo de déficit. Por el contrario, *dnc^l* tuvo mayor habituación que el genotipo silvestre y no mostró diferencias en la memoria al contexto evaluada inmediatamente o a las 24 horas. Estos resultados sugieren que estos tipos de aprendizaje dependerían de mecanismos moleculares diferentes (Dudai, Jan, et al. 1976; Duerr, J. S. y Quinn 1982; Tully y Quinn 1985; Typlt, Mirkowski, et al. 2013).

Aunque el mutante *dnc^l* no mostró niveles reducidos en la habituación o en la memoria al contexto, al realizar el ensayo entrenando y testeando a los animales en contextos diferentes, *dnc^l* mostró una generalización mayor respecto al genotipo silvestre, sugiriendo que la fosfodiesterasa *dnc* participa en el proceso de generalización del aprendizaje de contexto. Experimentos en ratones mostraron que la generalización aumenta con el paso del tiempo luego del entrenamiento. Se cree que la pérdida de especificidad en la memoria se debe a que inicialmente la memoria contextual requiere del hipocampo, pero luego los rasgos comunes entre experiencias se almacenan en distintas regiones de la corteza. Durante este proceso de consolidación, la memoria se vuelve menos específica. Aún está en discusión si los detalles contextuales se pierden durante la consolidación de la memoria, o si pueden ser recuperados con un reentrenamiento que vuelva a activar el hipocampo (Wiltgen y Silva 2007). Nuestros experimentos con *dnc^l* no mostraron una reducción de la memoria con el tiempo, sugiriendo que la generalización depende de mecanismos específicos, y no se debe a una pérdida de información.

Sección B. Efecto de la manipulación de la actividad neuronal sobre la actividad locomotora y los niveles de aprendizaje y memoria

Como se explica en la sección Antecedentes, los niveles de AMPc en la célula son regulados por fosfodiesterasas, de las cuales *dunce* (*dnc*) es la principal asociada a memoria. La actividad de *dnc* está basada en inputs sinápticos dopaminérgicos río arriba, pero también es necesaria para la posterior actividad dopaminérgica, ya que el AMPc incrementa la excitabilidad presináptica y la liberación de neurotransmisor (Gervasi, Tchénio, et al. 2010; Lee 2015).

Los análisis de comportamiento realizados en la primera parte de este trabajo mostraron que *dnc* participa en habituación y memoria de reconocimiento de contexto. Dado que *dnc* está enriquecida en los MBs (Nighorn, Healy, et al. 1991), estas estructuras podrían estar involucradas en la neuromodulación dopaminérgica necesaria para aprendizaje contextual, por lo cual se decidió estudiar dos grupos de neuronas dopaminérgicas que inervan a MB, las neuronas del grupo PAM y PPL1. La segunda etapa de este trabajo consistió en la manipulación por inducción térmica de estos grupos para evaluar sus efectos sobre la actividad locomotora y los niveles de aprendizaje y memoria.

Nuestros resultados sugirieron que ninguno de los grupos neuronales evaluados participa en habituación o en memoria de reconocimiento de contexto.

Las manipulaciones térmicas sobre el grupo PAM, en principio mostraron que estas neuronas dopaminérgicas podrían regular la habituación. Sin embargo, al comparar la habituación de los animales sujetos a bloqueo o inducción térmica contra sus respectivos genotipos parentales, no se observaron diferencias, por lo que no se puede concluir que PAM sea necesario para este comportamiento. Por otro lado, PAM tampoco parecería estar involucrado en la memoria inmediata de reconocimiento de contexto. No obstante, se observaron diferencias en la variabilidad de la memoria al aumentar la excitabilidad sináptica de las neuronas de PAM, sugiriendo que, si bien este grupo no afecta los valores en la mediana de memoria, sí podría tender a modificar la heterogeneidad del comportamiento entre individuos.

Una situación similar se observó al manipular térmicamente la actividad de PPL1. Los resultados iniciales mostraron que este grupo podría estar implicado en habituación, pero al comparar la habituación de los animales que sufrieron manipulación contra sus genotipos parentales, tampoco en este caso hubo diferencias significativas, indicando que PPL1 en realidad no regula la habituación al contexto. Aunque manipular PPL1 no llevó a cambios en la mediana de habituación, sí pudo observarse una disminución de la variabilidad al bloquear estas neuronas. Por otra parte, los primeros experimentos de bloqueo o aumento de transmisión sináptica en PPL1 sugirieron que estas neuronas son necesarias para la memoria de reconocimiento de contexto. Sin embargo, al comparar la memoria de los animales expuestos a

manipulación contra sus parentales, tampoco en este caso se observaron diferencias, por lo que no se puede concluir que PPL1 participe en memoria de reconocimiento de contexto.

Estos resultados en conjunto sugieren que podría haber otros grupos de neuronas dopaminérgicas relacionadas a los MBs que sí participan en habituación y memoria de contexto. Pero, además de esta posibilidad, es importante destacar que todos los experimentos de inducción térmica se realizaron con un $n=12$. La cantidad de réplicas había sido definida previamente en base al genotipo silvestre, pero una vez realizados los experimentos con los animales transgénicos, se observó que estos tenían un comportamiento mucho más variable. En consecuencia, necesitaban un número de réplicas mayor. Se calculó que la potencia estadística de nuestros experimentos con inducción térmica fue de 0.23. Habría sido necesario un $n \approx 150$ para mantener la potencia de 0.80 que se obtuvo con animales de genotipo silvestre. La baja potencia estadística puede haber llevado a no ver diferencias significativas, por lo que determinar si los grupos neuronales estudiados están involucrados en habituación y memoria de reconocimiento de contexto requiere de experimentos y análisis adicionales.

Para continuar con este estudio, se sugiere trabajar con un mayor tamaño muestral. También es posible que los animales transgénicos requieran un protocolo de entrenamiento más fuerte (de mayor duración). Una vez definidos los grupos neuronales involucrados en habituación y memoria de contexto, la perspectiva a futuro es investigar los mecanismos subyacentes. Distintos análisis a nivel molecular, por ejemplo, cuantificación de PKA fosforilada vs PKA sin fosforilar, son necesarios para entender de qué forma estos grupos de neuronas dopaminérgicas contribuyen a estos procesos. La comprensión de estos mecanismos podría permitir identificar targets para la aplicación de tratamientos a modelos de patologías en las que la habituación y la memoria de contexto se encuentren afectadas.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ, P., [sin fecha]. *Memoria de reconocimiento de objetos novedosos en Drosophila melanogaster (Tesis de licenciatura)*. S.l.: s.n.
- ASO, Y., HERB, A., OGUETA, M., SIWANOWICZ, I., TEMPLIER, T., FRIEDRICH, A., ITO, K., SCHOLZ, H. y TANIMOTO, H., 2012. *Three Dopamine Pathways Induce Aversive Odor Memories with Different Stability* [en línea]. 2012. S.l.: s.n.
- ASZTALOS, Z., ARORA, N. y TULLY, T., 2007. *Olfactory jump reflex habituation in Drosophila and effects of classical conditioning mutations* [en línea]. enero 2007. S.l.: J Neurogenet.
- ATTRILL, H., FALLS, K., GOODMAN, J., MILLBURN, G., ANTONAZZO, G., REY, A. y MARYGOLD, S., 2016. *Flybase: Establishing a gene group resource for Drosophila melanogaster* [en línea]. 2016. S.l.: Oxford University Press.
- BENZER, S., 1967. *Behavioral mutants of Drosophila isolated by countercurrent distribution* [en línea]. 1 septiembre 1967. S.l.: Proceedings of the National Academy of Sciences.
- BENZER, S., 1971. *From the gene to behavior* [en línea]. 1971. S.l.: JAMA.
- BERRY, J., CERVANTES-SANDOVAL, I., CHAKRABORTY, M. y DAVIS, R., 2015. *Sleep facilitates memory by blocking dopamine neuron-mediated forgetting* [en línea]. 2015. S.l.: s.n.
- BERRY, J., CERVANTES-SANDOVAL, I., NICHOLAS, E. y DAVIS, R., 2012. *Dopamine Is Required for Learning and Forgetting in Drosophila* [en línea]. 2012. S.l.: s.n. ISBN 6176321972.
- BESSON, M. y MARTIN, J., 2005. *Centrophobism/thigmotaxis, a new role for the mushroom bodies in Drosophila* [en línea]. 15 febrero 2005. S.l.: J Neurobiol.
- BOZORGMEHR, T., ARDIEL, E., MCEWAN, A. y RANKIN, C., 2013. *Mechanisms of plasticity in a Caenorhabditis elegans mechanosensory circuit* [en línea]. 2013. S.l.: Front Physiol.
- BRAND, A. y PERRIMON, N., 1993. *Targeted gene expression as a means of altering cell*

fates and generating dominant phenotypes [en línea]. 1993. S.l.: s.n.

BROWN, M. y AGGLETON, J., 2001. *Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus?* [en línea]. 2001. S.l.: Nature Publishing Group.

BURKE, C., HUETTEROTH, W., OWALD, D., PERISSE, E., KRASHES, M., DAS, G., GOHL, D., SILIES, M., CERTEL, S. y WADDELL, S., 2012. *Layered reward signalling through octopamine and dopamine in Drosophila* [en línea]. 2012. S.l.: Nature Publishing Group.

BURKE, Christopher J., HUETTEROTH, W., OWALD, D., PERISSE, E., KRASHES, M.J., DAS, G., GOHL, D., SILIES, M., CERTEL, S., WADDELL, S., LIU, C., PLAÇAIS, P.-Y., YAMAGATA, N., PFEIFFER, B.D., ASO, Y., FRIEDRICH, A.B., SIWANOWICZ, I., RUBIN, G.M., PREAT, T., TANIMOTO, H., ORSINI & MAREN, A., OWALD, D., FELSENBURG, J., TALBOT, C.B., DAS, G., PERISSE, E., HUETTEROTH, W., WADDELL, S., BURKE, C.J., HUETTEROTH, W., QUIRK, G.J., MUELLER, D., WADDELL, S., BECK, C.D., SCHROEDER, B., DAVIS, R.L., IN, F.H.S. y SCIENCES, B., 2012. Europe PMC Funders Group Reinforcement signaling in Drosophila ; dopamine does it all after all. *Nature* [en línea], vol. 23, no. 3, pp. 1-11. ISSN 0028-0836.

BUSCH, S., SELCHO, M., ITO, K. y TANIMOTO, H., 2009. *A map of octopaminergic neurons in the Drosophila brain* [en línea]. 20 abril 2009. S.l.: Wiley-Liss Inc.

CANDLAND, D. y NAGY, Z., 1969. *The open field: Some comparative data* [en línea]. 1 julio 1969. S.l.: John Wiley & Sons, Ltd.

CARDENAS, F., LAMPREA, M. y MORATO, S., 2001. *Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze*. 1 octubre 2001. S.l.: Elsevier.

CATTANEO, V., SAN MARTIN, A., LEW, S., GELB, B. y PAGANI, M., 2020. *Repeating or spacing learning sessions are strategies for memory improvement with shared molecular and neuronal components* [en línea]. 2020. S.l.: Elsevier.

CHOLERIS, E., THOMAS, A., KAVALIERS, M. y PRATO, F., 2001. *A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field*. 1 mayo 2001. S.l.: Pergamon.

- CLARIDGE-CHANG, A., ROORDA, R., VRONTOU, E., SJULSON, L., LI, H., HIRSH, J. y MIESENBÖCK, G., 2009. *Writing Memories with Light-Addressable Reinforcement Circuitry* [en línea]. 16 octubre 2009. S.l.: Cell Press.
- COHN, R., MORANTTE, I. y RUTA, V., 2015. *Coordinated and Compartmentalized Neuromodulation Shapes Sensory Processing in Drosophila* [en línea]. 17 diciembre 2015. S.l.: Cell Press.
- CONNOLLY, K., 1967. *Locomotor activity in Drosophila III. A distinction between activity and reactivity* [en línea]. 1967. S.l.: Anim Behav.
- CONTI, M. y BEAVO, J., 2007. *Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: Essential components in cyclic nucleotide signaling* [en línea]. 2007. S.l.: Annu Rev Biochem. ISBN 9780123456786.
- CREED, R. y MILLER, J., 1990. *Interpreting animal wall-following behavior* [en línea]. julio 1990. S.l.: Birkhäuser-Verlag.
- CRUSIO, W. y VAN ABELEN, J., 1986. *The genetic architecture of behavioural responses to novelty in mice* [en línea]. 1986. S.l.: Nature Publishing Group.
- CYBULSKA-KŁOSOWICZ, A., 2016. *Behavioral verification of associative learning in whisker-related fear conditioning in mice* [en línea]. 2016. S.l.: Nencki Institute of Experimental Biology.
- DAVIS, R., 2004. *Olfactory learning* [en línea]. 30 septiembre 2004. S.l.: Neuron.
- DAVIS, R., 2011. *Traces of Drosophila Memory* [en línea]. 14 abril 2011. S.l.: Neuron.
- DUDAI, Y., JAN, Y., BYERS, D., QUINN, W. y BENZER, S., 1976. *Dunce, a mutant of Drosophila deficient in learning*. 1976. S.l.: s.n.
- DUERR, J. y QUINN, W., 1982. *Three Drosophila mutations that block associative learning also affect habituation and sensitization* [en línea]. 1982. S.l.: Proc Natl Acad Sci U S A.
- DUERR, J. S. y QUINN, W.G., 1982. Three Drosophila mutations that block associative learning also affect habituation and sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en línea], vol. 79, no. 11 I, pp. 3646-3650. ISSN

00278424.

- EBBINGHAUS, H., 1885. *Memory: A Contribution to Experimental Psychology* [en línea]. 1 octubre 1885. S.l.: s.n.
- FERNANDES, A.S.D., BUCKLEY, C.L. y NIVEN, J.E., 2018. Visual associative learning in wood ants. *Journal of Experimental Biology* [en línea], vol. 221, no. 3. ISSN 00220949.
- FORKMAN, J., 2009. *Estimator and tests for common coefficients of variation in normal distributions*. enero 2009. S.l.: s.n.
- FORTINI, M. y BONINI, N., 2000. *Modeling human neurodegenerative diseases in Drosophila: On a wing and a prayer* [en línea]. 1 abril 2000. S.l.: Trends Genet.
- GAINETDINOV, R., JONES, S.R. y CARON, M.G., 1999. *Functional hyperdopaminergia in dopamine transporter knock-out mice*. 1 agosto 1999. S.l.: Elsevier.
- GERVASI, N., TCHÉNIO, P. y PREAT, T., 2010. *PKA Dynamics in a Drosophila Learning Center : Coincidence Detection by Rutabaga Adenylyl Cyclase and Spatial Regulation by Dunce Phosphodiesterase*. 2010. S.l.: s.n.
- GEYER, M. y BRAFF, D., 1982. Habituation of the Blink Reflex in Normals and Schizophrenic Patients. *Psychophysiology* [en línea]. S.l.
- GLICKMAN, S. y HARTZ, K., 1964. *Exploratory behavior in several species of rodents* [en línea]. agosto 1964. S.l.: s.n.
- HAMADA, F., ROSENZWEIG, M., KANG, K., PULVER, S., GHEZZI, A., JEGLA, T. y GARRITY, P., 2008. *An internal thermal sensor controlling temperature preference in Drosophila*. 2008. S.l.: s.n. ISBN 6176321972.
- HEISENBERG, M., 2003. *Mushroom body memoir: From maps to models* [en línea]. 2003. S.l.: Nature Publishing Group.
- INLOW, J. y RESTIFO, L., 2004. *Molecular and Comparative Genetics of Mental Retardation* [en línea]. febrero 2004. S.l.: Genetics.
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J., VIANNA, M., IZQUIERDO, L. y BARROS, D., 1999. *Separate mechanisms for short- and long-term memory* [en línea]. 1999. S.l.: Elsevier.

- KITAMOTO, T., 2001. *Conditional modification of behavior in drosophila by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons* [en línea]. 2001. S.l.: J Neurobiol.
- KOEMANS, T.S., OPPITZ, C., DONDEERS, R.A., VAN BOKHOVEN, H., SCHENCK, A., KELEMAN, K. y KRAMER, J.M., 2017. *Drosophila Courtship Conditioning As a Measure of Learning and Memory. J. Vis. Exp* [en línea], no. 124, pp. 55808.
- KONOPKA, R. y BENZER, S., 1971. *Clock mutants of Drosophila melanogaster* [en línea]. 1971. S.l.: Proc Natl Acad Sci U S A.
- KRASHES, M.J., DASGUPTA, S., VREEDE, A., WHITE, B., ARMSTRONG, J.D. y WADDELL, S., 2009. *A Neural Circuit Mechanism Integrating Motivational State with Memory Expression in Drosophila. Cell* [en línea], vol. 139, no. 2, pp. 416-427. ISSN 00928674.
- LEE, D., 2015. *Global and local missions of cAMP signaling in neural plasticity, learning, and memory*. 2015. S.l.: s.n.
- LEWIS, L.P.C., SIJU, K.P., ASO, Y., FRIEDRICH, A.B., BULTEEL, A.J.B., RUBIN, G.M. y GRUNWALD KADOW, I.C., 2015. *A Higher Brain Circuit for Immediate Integration of Conflicting Sensory Information in Drosophila. Current Biology* [en línea], vol. 25, no. 17, pp. 2203-2214. ISSN 09609822.
- LIN, S., OWALD, D., CHANDRA, V., TALBOT, C., HUETTEROTH, W. y WADDELL, S., 2014. *Neural correlates of water reward in thirsty Drosophila. Nature Neuroscience* [en línea], vol. 17, no. 11, pp. 1536-1542. ISSN 15461726.
- LIU, C., PLAÇAIS, P., YAMAGATA, N., PFEIFFER, B., ASO, Y., FRIEDRICH, A., SIWANOWICZ, I., RUBIN, G., PREAT, T. y TANIMOTO, H., 2012. *A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in Drosophila* [en línea]. 2012. S.l.: Nature Publishing Group.
- LIU, L., DAVIS, R. y ROMAN, G., 2007. *Exploratory activity in Drosophila requires the kurtz nonvisual arrestin* [en línea]. 2007. S.l.: s.n.
- LIU, L., WOLF, R., ERNST, R. y HEISENBERG, M., 1999. *Context generalization in*

- Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies [en línea]. 19 agosto 1999. S.l.: Macmillan Magazines Ltd.
- LIU, Q., LIU, S., KODAMA, L., DRISCOLL, M. y WU, M., 2012. *Two dopaminergic neurons signal to the dorsal fan-shaped body to promote wakefulness in Drosophila* [en línea]. 2012. S.l.: Elsevier Ltd.
- LIU, X. y DAVIS, R., 2009. *The GABAergic anterior paired lateral neuron suppresses and is suppressed by olfactory learning* [en línea]. enero 2009. S.l.: NIH Public Access.
- LIVINGSTONE, M., 1985. *Genetic dissection of Drosophila adenylate cyclase* [en línea]. 1985. S.l.: Proc Natl Acad Sci U S A.
- LIVINGSTONE, M., SZIBER, P. y QUINN, W., 1984. *Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a Drosophila learning mutant* [en línea]. 1984. S.l.: Cell.
- LUDEWIG, K., GEYER, M. y VOLLENWEIDER, F., 2003. *Deficits in prepulse inhibition and habituation in never-medicated, first-episode schizophrenia* [en línea]. 15 julio 2003. S.l.: Elsevier Inc.
- MANDLER, G., 1980. *Recognizing: The judgment of previous occurrence* [en línea]. 1980. S.l.: s.n.
- MAO, Z. y DAVIS, R.L., 2009. Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: Anatomical and physiological heterogeneity. *Frontiers in Neural Circuits* [en línea], vol. 3, no. JUL. ISSN 16625110.
- MARGULIES, C., TULLY, T. y DUBNAU, J., 2005. *Deconstructing memory in Drosophila* [en línea]. 6 septiembre 2005. S.l.: NIH Public Access.
- MARTIN, J.R., ERNST, R. y HEISENBERG, M., 1998. Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Learning and Memory* [en línea], vol. 5, no. 1-2, pp. 179-191. ISSN 10720502.
- MCGUIRE, S., LE, P., OSBORN, A., MATSUMOTO, K. y DAVIS, R., 2003. *Spatiotemporal Rescue of Memory Dysfunction in Drosophila* [en línea]. 6 diciembre 2003. S.l.: Science.

- MENZEL, R., 2012. *The honeybee as a model for understanding the basis of cognition* [en línea]. noviembre 2012. S.l.: Nat Rev Neurosci.
- MORATO, S. y CASTRECHINI, P., 1989. *Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze* [en línea]. 1989. S.l.: s.n.
- NÄSSEL, D. y ELEKES, K., 1992. *Aminergic neurons in the brain of blowflies and Drosophila: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons* [en línea]. enero 1992. S.l.: Springer-Verlag.
- NIGHORN, A., HEALY, M.J. y DAVIS, R.L., 1991. The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the drosophila dunce gene is concentrated in the mushroom body neuropil. *Neuron*, vol. 6, no. 3, pp. 455-467. ISSN 08966273.
- ORNITZ, E., LANE, S., SUGIYAMA, T. y DE TRAVERSAY, J., 1993. *Startle modulation studies in autism* [en línea]. diciembre 1993. S.l.: Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers.
- PAGANI, M., OISHI, K., GELB, B. y ZHONG, Y., 2009. *The Phosphatase SHP2 Regulates the Spacing Effect for Long-Term Memory Induction* [en línea]. 2009. S.l.: Elsevier Ltd.
- PENG, Y., XI, W., ZHANG, W., ZHANG, K. y GUO, A., 2007. *Experience improves feature extraction in Drosophila* [en línea]. 9 mayo 2007. S.l.: J Neurosci.
- PERRY, W., MINASSIAN, A., LOPEZ, B., MARON, L. y LINCOLN, A., 2007. *Sensorimotor Gating Deficits in Adults with Autism* [en línea]. 15 febrero 2007. S.l.: Biol Psychiatry.
- POON, C. y YOUNG, D., 2006. *Nonassociative learning as gated neural integrator and differentiator in stimulus-response pathways* [en línea]. 8 agosto 2006. S.l.: Behav Brain Funct.
- RANKIN, C., ABRAMS, T., BARRY, R., BHATNAGAR, S., CLAYTON, D., COLOMBO, J., COPPOLA, G., GEYER, M., GLANZMAN, D., MARSLAND, S., MCSWEENEY, F., WILSON, D., WU, C. y THOMPSON, R., 2009. *Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation* [en línea]. septiembre 2009. S.l.: Neurobiol Learn Mem.

- RIEMENSPERGER, T., ISSA, A.R., PECH, U., COULOM, H., NGUYỄN, M.V., CASSAR, M., JACQUET, M., FIALA, A. y BIRMAN, S., 2013. A Single Dopamine Pathway Underlies Progressive Locomotor Deficits in a *Drosophila* Model of Parkinson Disease. *Cell Reports* [en línea], vol. 5, no. 4, pp. 952-960. ISSN 22111247.
- RIEMENSPERGER, T., VÖLLER, T., STOCK, P., BUCHNER, E. y FIALA, A., 2005. *Punishment prediction by dopaminergic neurons in Drosophila* [en línea]. 8 noviembre 2005. S.I.: Cell Press.
- ROMAN, G., ENDO, K., ZONG, L. y DAVIS, R., 2001. *P{switch}, a system for spatial and temporal control of gene expression in drosophila melanogaster* [en línea]. 23 octubre 2001. S.I.: National Academy of Sciences.
- SCHROLL, C., RIEMENSPERGER, T., BUCHER, D., EHMER, J., VÖLLER, T., ERBGUTH, K., GERBER, B., HENDEL, T., NAGEL, G., BUCHNER, E. y FIALA, A., 2006. *Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in Drosophila larvae* [en línea]. 2006. S.I.: Curr Biol.
- SCHWAERZEL, M., MONASTIRIOTI, M., SCHOLZ, H., FRIGGI-GRELIN, F., BIRMAN, S. y HEISENBERG, M., 2003. *Dopamine and Octopamine Differentiate between Aversive and Appetitive Olfactory Memories in Drosophila* [en línea]. 19 noviembre 2003. S.I.: Society for Neuroscience.
- SHOHAMY, D., MIHALAKOS, P., CHIN, R., THOMAS, B., WAGNER, A. y TAMMINGA, C., 2010. *Learning and Generalization in Schizophrenia: Effects of Disease and Antipsychotic Drug Treatment* [en línea]. 15 mayo 2010. S.I.: Biol Psychiatry.
- SILVA, B., GOLES, N.I., VARAS, R. y CAMPUSANO, J.M., 2014. Serotonin Receptors Expressed in *Drosophila* Mushroom Bodies Differentially Modulate Larval Locomotion. En: B.A. HASSAN (ed.), *PLoS ONE* [en línea], vol. 9, no. 2, pp. e89641. ISSN 1932-6203.
- SINAKEVITCH, I. y STRAUSFELD, N., 2006. *Comparison of octopamine-like immunoreactivity in the brains of the fruit fly and blow fly* [en línea]. 20 enero 2006. S.I.: J Comp Neurol.
- SOIBAM, B., MANN, M., LIU, L., TRAN, J., LOBAINA, M., KANG, Y., GUNARATNE,

- G., PLETCHER, S. y ROMAN, G., 2012. *Open-field arena boundary is a primary object of exploration for Drosophila* [en línea]. 15 marzo 2012. S.l.: John Wiley & Sons, Ltd.
- TANG, S. y GUO, A., 2001. *Choice behavior of Drosophila facing contradictory visual cues* [en línea]. 16 noviembre 2001. S.l.: Science.
- THOMPSON, R. y SPENCER, W., 1966. *Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior* [en línea]. enero 1966. S.l.: Psychol Rev.
- TREIT, D. y FUNDYTUS, M., 1989. *Thigmotaxis as a Test for Anxiolytic Activity in Rats* [en línea]. 1989. S.l.: s.n.
- TULLY, T. y QUINN, W., 1985. *Classical conditioning and retention in normal and mutant Drosophila melanogaster*. 1985. S.l.: s.n.
- TYPLT, M., MIRKOWSKI, M., AZZOPARDI, E., RUTH, P., PILZ, P. y SCHMID, S., 2013. *Habituation of reflexive and motivated behavior in mice with deficient BK channel function* [en línea]. 2013. S.l.: s.n.
- WALSH, R. y CUMMINS, R., 1976. *The open-field test: A critical review* [en línea]. mayo 1976. S.l.: s.n.
- WILLIAMS, J., HAMILTON, L. y CARLTON, P., 1975. *Ontogenetic dissociation of two classes of habituation* [en línea]. septiembre 1975. S.l.: J Comp Physiol Psychol.
- WILLIAMS, J., HAMILTON, L. y CARLTON, P.L., 1974. *Pharmacological and anatomical dissociation of two types of habituation* [en línea]. octubre 1974. S.l.: s.n.
- WILTGEN, B.J. y SILVA, A.J., 2007. Memory for context becomes less specific with time. *Learning and Memory*, vol. 14, no. 4, pp. 313-317. ISSN 10720502.
- WOLF, R., WITTIG, T., LIU, L., WUSTMANN, G., EYDING, D. y HEISENBERG, M., 1998. *Drosophila mushroom bodies are dispensable for visual, tactile, and motor learning* [en línea]. 1998. S.l.: s.n.
- YAMAGATA, N., ICHINOSE, T., ASO, Y., PLAÇAIS, P.Y., FRIEDRICH, A.B., SIMA, R.J., PREAT, T., RUBIN, G.M. y TANIMOTO, H., 2015. Distinct dopamine neurons mediate reward signals for short- and long-term memories. *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America [en línea], vol. 112, no. 2, pp. 578-583. ISSN 10916490.

YANG, Y., GEHRKE, S., IMAI, Y., HUANG, Z., OUYANG, Y., WANG, J.W., YANG, L., BEAL, M.F., VOGEL, H. y LU, B., 2006. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en línea], vol. 103, no. 28, pp. 10793-10798. ISSN 00278424.

YONELINAS, A., KROLL, N., QUAMME, J., LAZZARA, M., SAUVÉ, M., WIDAMAN, K. y KNIGHT, R., 2002. *Effects of extensive temporal lobe damage or mild hypoxia on recollection and familiarity* [en línea]. 1 noviembre 2002. S.l.: Nat Neurosci.

ZHANG, K., GUO, J., PENG, Y., XI, W. y GUO, A., 2007. *Dopamine-mushroom body circuit regulates saliency-based decision-making in *Drosophila** [en línea]. 29 junio 2007. S.l.: Science.