



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE LOS CAMBIOS NEUROBIOLÓGICOS
ASOCIADOS A PROCESOS COGNITIVOS EN *OCTOPUS MAYA***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSÉ FABIÁN VERGARA OVALLE

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FRUCTUOSO AYALA GUERRERO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, MARZO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE LOS CAMBIOS NEUROBIOLÓGICOS
ASOCIADOS A PROCESOS COGNITIVOS EN *OCTOPUS MAYA***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSÉ FABIÁN VERGARA OVALLE

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FRUCTUOSO AYALA GUERRERO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, MARZO 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/117/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité de Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de noviembre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **VERGARA OVALLE JOSÉ FABIÁN** con número de cuenta **305558206** con la tesis titulada: **“Caracterización de los cambios neurobiológicos asociados a procesos cognitivos en *Octopus maya*”**, realizada bajo la dirección del **DR. FRUCTUOSO AYALA GUERRERO**:

Presidente:	DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALÁ
Vocal:	DRA. MAITE MASCARÓ MIQUELAJAUREGUI
Vocal:	DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
Vocal:	DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
Secretario:	DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de febrero de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por brindarme la oportunidad de seguir preparándome académica y profesionalmente.

Al apoyo económico recibido por el CONACyT, número de becario: 578894

Al apoyo económico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA) de la UNAM con el proyecto IN208722

A los miembros de mi Comité Tutor:

Dr. Fructuoso Ayala Guerrero
Facultad de Psicología, UNAM

Dr. Hugo Sánchez Castillo
Facultad de Psicología, UNAM

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Agradecimientos a título personal

Al Dr. Hugo Sánchez Castillo quien aceptó embarcarse en una línea de investigación novedosa, depositando una gran confianza en mi y el proyecto. Siempre apoyándome y respaldando los resultados. Sin ello, este trabajo nunca se habría logrado.

A todos los miembros del laboratorio de Neuropsicofarmacología por permitirme trabajar con ustedes y aceptarme siempre con los brazos abiertos.

Al Dr. Carlos Rosas Vázquez por todo el apoyo brindado y sus imprescindibles enseñanzas y recomendaciones sobre la investigación con pulpos y discusión de los resultados, pero también sobre la vida del investigador y los caminos a seguir en la investigación.

A la Mtra. Claudia Patricia Caamal Monsreal y a todos los miembros del Laboratorio de Ecofisiología Aplicada por su colaboración y disposición para el envío de los ejemplares y su guía para poderlos mantener en condiciones de laboratorio.

Al Mtro. Ignacio Andrés Morales Salas y a todos los miembros del Acuario de la Facultad de Ciencias por su apoyo en la instalación de la infraestructura necesaria y mantenimiento de los ejemplares utilizados en este proyecto, así como por su conocimiento y experiencia.

A mis pupilos, Alejandro González Navarrete y Paulette García Andaluz quienes con su incansable dedicación y esfuerzos fuera de lo común permitieron el avance de la línea de investigación. Espero haberles retribuido al menos una parte de todo lo que ustedes me aportaron.

A mi mamá, por todo su apoyo y disposición a aprender conmigo, a mantener una mente abierta. Pero sobretodo, porque su amor siempre ha sido una fuente de fortaleza para afrontar todo en la vida.

A Cynthia Alejandra Paz Trejo, el pilar de mi vida, mi amorsí, pues solo ella sabe el enorme esfuerzo, los miedos que tuvieron que ser vencidos, la dedicación, tenacidad y sacrificios que debieron hacerse para lograr este trabajo. Su fortaleza, inteligencia y amor por el mundo son algo que siempre admiraré. Esta es solo una pequeña parte de nuestra vida. Gracias por estar a mi lado en todo momento.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
<i>Octopus maya</i>	5
Memoria	7
¿Cómo se clasifica la memoria?	8
¿Cuáles son los pasos para la formación de la memoria?	9
Reconocimiento de objeto novedoso	10
Reconocimiento de objeto novedoso en cefalópodos	11
Efecto de la inhibición de síntesis de proteínas sobre la memoria	12
Inhibición de síntesis de proteínas en cefalópodos	14
Planteamiento del problema	15
Hipótesis	16
Objetivos	16
Métodos	17
Declaración ética	17
Sujetos	17
Tarea de reconocimiento de objeto novedoso	17
Histología	20
Administración cicloheximida.	21
Análisis estadístico	22
Resultados	
Cerebro de <i>O. maya</i> .	23
El cerebro joven continúa su desarrollo 4 semanas después de la eclosión.	26
Los jóvenes y adultos de <i>O. maya</i> exploran diferencialmente un objeto familiar y uno nuevo.	26
A las 4 semanas <i>O. maya</i> no se comporta diferencialmente con respecto al objeto novedoso y al familiar.	29
La inhibición de síntesis de proteínas interrumpe la formación de la memoria a largo plazo en RON.	30
Discusión	
Caracterización del cerebro de <i>O. maya</i> .	32
RON en <i>O. maya</i>	35

Efecto de la cicloheximida en la memoria de reconocimiento de <i>O. maya</i> .	37
Estructuras del cerebro posiblemente relacionadas con la memoria de reconocimiento.	37
Conclusiones	39
Referencias	40
Anexo	
Tabla 1	50

Resumen

Los pulpos muestran un amplio abanico de conductas, que podrían ser indicador de diferentes capacidades cognitivas, producto de su compleja organización cerebral, incluyendo memoria. La tarea de reconocimiento de objeto novedoso (RON) es abundantemente utilizada para el estudio de la memoria en vertebrados y se ha propuesto como un sólido candidato para evaluar la memoria en diferentes grupos taxonómicos, permitiendo evaluaciones similares y comparables entre ellos. Si bien, en cefalópodos, varios reportes de investigación podrían indicar que reconocen objetos en su entorno, sin embargo, hasta el momento no ha sido estandarizado como un paradigma experimental, que permita evaluar diferentes fases de la memoria, utilizando inhibidores de síntesis de proteínas. En este trabajo se utilizaron técnicas histológicas para caracterizar la organización cerebral de *Octopus maya*; así como paradigmas conductuales y manipulación farmacológica. Se encontró que *O. maya* posee la capacidad para reconocer objetos novedosos. Además, la memoria de reconocimiento a largo plazo es susceptible a la inhibición de síntesis de proteínas. Se observó que para lograr el reconocimiento de objetos, los pulpos utilizan la visión y la exploración táctil en objetos nuevos, mientras que los objetos familiares solo necesitan ser explorados de forma táctil; lo que podría indicar la presencia de una representación multi-modal de los objetos en el animal. La interrupción de la memoria a largo plazo por la inhibición de síntesis de proteínas indica la existencia de una fase de consolidación durante la formación del recuerdo. Esta es la primera vez que se muestra a un invertebrado realizando la tarea RON, de manera similar al paradigma que se utiliza con vertebrados. Estos resultados plantean la oportunidad de utilizar una tarea simple y rápida para evaluar la memoria en pulpos y facilitar la comparación entre otros grupos taxonómicos, en los que esta tarea es ampliamente utilizada.

Palabras clave:

Organización cerebral, Exploración; Memoria; Objeto novedoso; Pulpo; Reconocimiento, Comportamiento.

Abstract

Octopuses display a wide range of behaviors, which could be indicative of different cognitive skills, including memory. The novel object recognition (NOR) task is widely used to study memory in vertebrates and has been proposed as a strong candidate to assess memory in different taxonomic groups, allowing similar and comparable assessments between them. Although, in cephalopods, several research reports could indicate that they recognize objects in their environment, until now, it has not been evaluated as an experimental paradigm, which allows evaluating different phases of memory, using protein synthesis inhibitors. In this study, it is shown that *Octopus maya* can differentiate between a new and a familiar object and that in this paradigm, long-term memory is susceptible to protein synthesis inhibition. To achieve object recognition, octopuses use vision and tactile exploration of new objects, while familiar objects only need to be explored by touch, which could indicate the presence of a multi-modal representation of the objects. Interference of long-term memory by inhibition of protein synthesis indicates the presence of a consolidation phase during memory formation. To my knowledge, this is the first time an invertebrate has been shown performing the NOR task, similar to how it is performed in vertebrates. These results raise the opportunity to use a simple, fast task to assess memory in octopuses and facilitate comparison between other taxonomic groups, in which this task is widely used.

Keywords:

Exploration, Memory, Novel object, Octopus, Recognition, Behavior.

Introducción

La memoria, igual que las otras capacidades cognitivas, surge como resultado de la organización estructural y temporal de los diferentes componentes del sistema nervioso, es decir, la memoria es una propiedad emergente de un sistema nervioso (SN). Por tanto, comparar la fisiología y organización anatómica y temporal de diferentes SN es una oportunidad para comprender cuales son los requerimientos necesarios y suficientes para que surja esta propiedad emergente. Sabemos que existen diferentes tipos de memoria y cada una de ellas dependerá de diferentes componentes, siendo que las condiciones necesarias para que surja la propiedad emergente serán distintas y no comparables entre sí. Por ejemplo, durante el aprendizaje por sensibilización del sifón en *Aplysia californica*, se requiere de un tipo de memoria motora, no declarativa. Esta memoria depende de la conectividad entre tres neuronas (motora-sensitiva y moduladora), así como de la plasticidad sináptica, modulada por los neurotransmisores: serotonina, glutamato y acetilcolina (Kandel et al. 2014), mientras que en ratas la memoria de condicionamiento al miedo requiere de la conectividad de miles de neuronas entre la corteza prefrontal, amígdala basolateral, amígdala central y el núcleo paraventricular del tálamo (Penzo et al. 2015). Como se entiende de los ejemplos anteriores, no es posible comparar tareas o capacidades cognitivas entre distintos grupos, a menos que se cuente con una tarea conductualmente similar.

Encontrar tareas que nos permitan esta comparación nos ayudaría a contestarnos ¿cuál es la organización espacial y temporal necesaria para lograr los distintos tipos de memoria, en diferentes animales? Esta pregunta es crucial para el avance de las neurociencias pues nos ayudaría a comprender las bases físicas de la memoria y las leyes físicas y fisiológicas que la rigen. Una posible aproximación para contestar esta pregunta es el método comparativo y los modelos animales que se comparen dependerán del tipo de memoria que nos interese investigar. Un buen comienzo es comparar la memoria en mamíferos con otro taxón sumamente alejado, filogenéticamente hablando, pero que es capaz de mostrar aprendizajes similares y, por tanto, memorias muy parecidas a las de mamíferos. Un grupo que cumple con esta particularidad es, por ejemplo, el de los cefalópodos.

Los cefalópodos como modelo de estudio no son ajenos a la investigación neurobiológica. Los fisiólogos Alan Hodgkin y Andrew Huxley (1952) recibieron el Premio Nobel de

Fisiología o Medicina de 1963 gracias al calamar y sus axones gigantes, que ayudaron al dúo a establecer los conceptos básicos de los canales iónicos y cómo el sistema nervioso conduce las corrientes eléctricas. Durante las siguientes dos décadas surgió un auge por el estudio de los cefalópodos y sus sistemas nerviosos; no obstante, éste perdió su impulso durante un tiempo, principalmente debido a la dificultad para trabajar con estos organismos, así como al auge en los estudios en otros modelos, principalmente mamíferos (Nakajima et al. 2018). Sin embargo, a partir del inicio de este siglo se ha retomado el estudio en cefalópodos. El uso de los cefalópodos como modelo de laboratorio para investigación de diversos procesos cognitivos se amplía cada vez más, sin embargo, este se ha enfocado principalmente en los mecanismos celulares que subyacen. Para poder interpretar adecuadamente los resultados observados, es necesario trabajar arduamente por conocer la conducta y los cambios que esta presenta en respuesta a las diversas condiciones y estímulos. Una manera de estudiar la conducta animal es a través de paradigmas conductuales, es decir, tareas estandarizadas en las que se evalúa la respuesta del sujeto a algunos estímulos, contextos o a las características de los mismos, utilizando unidades cuantificables como segundos, número de cruces, número de palanqueos, etc. El problema de no conocer la conducta y sus cambios de los cefalópodos ha sido puesto en evidencia en diversas ocasiones, dejando en claro que aún falta por estandarizar cómo evaluar una conducta de estrés, sino es mediante la experiencia y anécdotas propias del investigador (Fiorito et al. 2015; Di Cosmo et al. 2021). Aun así, diversos investigadores se han dado a la tarea de caracterizar algunas conductas, e incluso estandarizar tareas para el estudio del aprendizaje y la memoria, dada la relevancia que supone para el área (Fiorito y Scotto 1992; Boal et al. 1996; Tomita y Aoki 2014; Tokida et al. 2014; Bublitz et al. 2017; Jamar et al. 2017). Dentro de los cefalópodos, los pulpos sobresalen por su amplia diversidad de conductas (Mather y Alupay 2016) lo que los postula como ideales para estudios de conducta. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones en pulpo se han realizado con organismos capturados, pues su cría en cautiverio ha resultado prácticamente imposible para especies que poseen estadios de paralarvas en su ciclo de vida. Trabajar con organismos capturados con paradigmas de conducta resulta sumamente complicado, pues existe un sinnúmero de variables que desconocemos en la vida del animal, que podrían interferir con los resultados observados en el laboratorio. Afortunadamente, desde hace más de diez años se ha logrado reproducir en cautiverio al pulpo maya rojo en las

instalaciones de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) de la UNAM en Sisal, Yucatán (Rosas et al. 2014). Esto permite trabajar con ejemplares de pulpo de manera más controlada, conociendo las condiciones de vida del animal desde su eclosión y asegurando un riguroso control de las variables experimentales, ambientales. Es por ello que esta especie se escogió para el presente trabajo.

Octopus maya

O. maya es un animal invertebrado, perteneciente al clado de los lophotrochozoa.

Clasificación:

Reino: Animalia

Phyllum: Mollusca

Clase: Cephalopoda

Orden: Octopoda

Familia: Octopodidae

Género: *Octopus*

Especie: *Octopus maya* (Voss y Solís-Ramírez 1966).

Descripción Anatómica

O. maya (Fig. 1), posee una composición anatómica muy similar a las casi 300 especies descritas de pulpos: en la parte inferior se encuentran ocho extremidades conocidas como brazos, los cuales poseen alrededor de 250 ventosas en cada uno de ellos, estos están conectados a la cabeza del organismo en donde se encuentran los ojos, el pico y el cerebro y, por último en la parte superior, se ubica el manto en donde están almacenados los órganos internos del pulpo (O'Brien et al. 2018).

Voss y Solís-Ramírez (1966) mencionan que el manto de esta especie se caracteriza por ser grande y ovalado, pero también bastante estrecho en la base, con una longitud muy similar entre sexos: la longitud del manto de las hembras va desde 48,0 a 116,0 mm y en los machos va desde 77,0 a 119,0 mm, llegando a crecer hasta 1 metro de largo (Rosas et al. 2006).

Además, en comparación con otras especies, los huevos de *O. maya* son grandes, demostrando un promedio de 17mm de longitud y 4.5mm de ancho (Voss y Solís-Ramírez 1966), los cuales se sujetan en racimos en la parte inferior de las rocas en donde habitan y cuando eclosionan lo hacen como una larva holobentónica con un desarrollo directo y sin fases paralarvarias (Van Heukelem 1976; Rosas et.al. 2014), permitiendo que las crías presenten conductas de alimentación, arrastre, nado, expulsión de tinta y cambios de coloración al igual que como se presentan en un ejemplar adulto (Hanlon y Forsythe 1985).

En cuestión de coloración, esta especie de pulpo se caracteriza por presentar usualmente un tono marrón oscuro, ya sea en un tono más claro o bien en un tono rojizo en presencia de un estímulo aversivo, aunado a esto, otra característica distinta de la especie es la presencia de un punto oscuro (también llamado ocelo) localizado debajo de cada ojo y en medio de la base del segundo y tercer brazo presente tanto en hembras como en machos (Voss y Solís-Ramírez, 1966). *O. maya* también es conocido como pulpo rojo o pulpo de cuatro ojos debido a su color característico y grandes ocelos de doble anillo debajo de cada ojo (Fig. 1). Esto lo distingue de la otra especie que se distribuye en la península de Yucatán, *O. vulgaris* Cuvier 1797. Además, *O. maya* tiene un tamaño de huevo más grande (promedio de 17 mm de longitud) y menor cantidad de huevos (1500-2000 huevos por nidada) (Voss 1966; Walker 1970; Van Heukelem 1976; Rosas et al. 2014). Las larvas que nacen de estos huevos son holobentónicas, parecidas a un adulto y mucho más desarrolladas que las de *O. vulgaris*.



Figura 1. *Octopus maya*. Se pueden observar sus característicos ocelos (flecha negra), que le dan el nombre común de “pulpo de cuatro ojos”.

Memoria

La memoria es una capacidad cognitiva que permite una mejor adaptación al entorno, pues posibilita el modificar la conducta dependiendo de las experiencias del individuo. Por ejemplo, a través de almacenar la información de lo ocurrido durante la vida del animal, este podrá tomar decisiones que sean más eficaces en su entorno o establecer un mapa del contexto y su propia ubicación en el mismo, lo que le permitirá moverse más eficientemente en su ambiente. Incluso permite reconocer a otros individuos de otras o de su propia especie para distinguir entre quienes son una posible amenaza y quienes no lo son. Por esto, comprender las estructuras y los procesos que la componen a nivel psicológico y neurobiológico ha sido uno de las cuestiones más intrigantes a lo largo de la historia de la humanidad. Y que ha dado como resultado grandes hallazgos, pero también ha formado nuevas preguntas por responder.

La memoria ha demostrado ser un concepto difícil de precisar, provocando que existan varias definiciones, dependiendo principalmente del enfoque de las distintas áreas de investigación. Por ejemplo Kandel define a la memoria como el proceso de retener y reconstruir el conocimiento adquirido por aprendizaje a través del tiempo (Kandel et al. 2014), mientras que Sheena et al. (2015) la definen como la capacidad de un organismo de adquirir, almacenar y recuperar información basada en la experiencia. Varias de estas definiciones coinciden en que la memoria involucra el almacenamiento de la información, así como la recuperación posterior de esta información. El almacenamiento de la información se refiere al proceso sistemático de coleccionar y catalogar datos de modo que puedan ser evocados cuando se necesiten. Una de las mayores conceptualizaciones de la representación neuronal de la información almacenada en la memoria fue desarrollada por Richard Semon hace más de 100 años quien concibió la teoría del Engrama o trazo de la memoria (Schacter et al. 1978). De acuerdo con esta teoría, cada vez más aceptada, el aprendizaje activa un pequeño conjunto de células del cerebro, lo que induce en estas células cambios físicos y/o químicos persistentes. Además la reactivación de estas células generada a través de pistas relevantes resulta en la evocación de la memoria específica. Es decir, el engrama es el sustrato físico en el que se almacena la memoria (Sheena 2015; Pooh 2016).

Por otro lado, el aprendizaje es la base de la memoria, si no hay aprendizaje, no puede haber memoria. Esto ocurre tanto a nivel psicológico como a nivel molecular (Johansen, et

al. 2011). Con la definición de aprendizaje ocurre lo mismo que sucedía con la definición de memoria. Sin embargo, en general se considera que el aprendizaje es el proceso de adquirir información y que se observa como el producto que incluye cambios en el comportamiento animal, debido a la experiencia (Korte 2013; De Houwer et al. 2013). El aprendizaje se clasifica en tres grandes categorías:

1. **No asociativo.** Incluye aprendizaje por habituación y sensibilización.
2. **Asociativo.** Incluye condicionamiento clásico, condicionamiento operante, condicionamiento aversivo y extinción.
3. **Formas de aprendizaje complejo.** Imprinting, aprendizaje por observación, insight y priming.

Cómo clasificamos hoy en día la memoria? Milner y el paciente H. M.

En 1953 el Dr. W. Scoville decide extirpar parcialmente el lóbulo temporal del paciente Henry Gustav Molaison (H.M.) como parte de un tratamiento experimental, luego de que en 1935 H. M. había sufrido un traumatismo craneal debido a una colisión con un automóvil, lo que le provocó crisis epilépticas crónicas. Como resultado de esta cirugía H. M. sufre de amnesia anterógrada profunda, es decir, es incapaz de formar nuevos recuerdos. La Dra. Brenda Milner del Instituto Tecnológico de Montreal toma el caso de este paciente y se dedica a estudiarlo con detalle por los siguientes 55 años. En una serie de ensayos, la doctora Milner había entrenado a Henry Molaison a trazar una línea entre dos contornos concéntricos con forma de estrella de cinco puntas, mirando a través de un espejo. Cada vez que H.M. realizaba la tarea, le parecía una experiencia totalmente nueva. No tenía memoria de haberlo hecho antes. Sin embargo, con la práctica se volvió hábil. «Un día, después de muchos de estos ensayos, me dijo: ¡eh, esto era más fácil de lo que pensaba!» comentó la doctora Milner. Es decir, el paciente no podía recordar episodios de su vida y no era consciente de haber vivido experiencias posteriores a su cirugía, sin embargo, si era capaz de mejorar en tareas motrices, aunque no recordara haber practicado (Pattanayak 2014). Este caso ayudó a retomar la idea de la localización de la memoria en sitios específicos del cerebro y además, se convirtió en el estandarte para una clasificación de la memoria “moderna”.

Según esta clasificación existe un tipo de memoria que puede evocarse de manera consciente, declarativa o explícita y otra que no requiere de dicha evocación consciente, no declarativa o implícita.

Una subclasificación de estas memorias nos indica que la memoria declarativa se divide en memoria episódica (relacionada con vivencias propias) y semántica (relacionada con ideas y conceptos no autobiográficos); mientras que la memoria no declarativa se divide en memoria procedimental o motora, priming y la memoria que subyace aprendizajes simples como el condicionamiento clásico, habituación y sensibilización. Por otro lado, todas estas memorias pueden ser subclasificadas, dependiendo de su duración, en memorias a corto plazo y memorias a largo plazo. La memoria a corto plazo tiene una duración que va de algunos segundos a minutos u horas; mientras que la memoria a largo plazo posee una duración de días, meses o años (Kandel et al., 2014). La memoria de reconocimiento

Esta clasificación se basa en los tipos de recuerdos que se forman, sin embargo quizá no represente una realidad en cuanto a los procesos que se utilizan para su formación, es decir, la memoria en sí. Quizá sería mejor considerar otras propiedades de la memoria como el número de repeticiones que se requiere para su formación, la flexibilidad que esta puede mostrar, así como el número de módulos que utiliza (Henke 2010). También podría utilizarse la organización de la red neuronal que la conforma, más allá del nombre de la estructura, sobretodo, cuando se trata de comparar memoria entre distintos phyla.

¿Cuáles son los pasos de formación de la memoria?

De manera muy general, sabemos que una vez que se percibe una información del medio, esta se almacena transitoriamente en memoria a corto plazo. Si esta información es relevante, pasará a memoria a largo plazo. Una memoria en etapa de **adquisición** o recién formada es inicialmente lábil y puede ser interrumpida por diferentes agentes de interferencia, por ejemplo la inhibición de síntesis de proteínas o de expresión génica, o la inactivación de algunas regiones del cerebro. Con el tiempo esta memoria se volverá resistente a la interrupción, mediante un proceso conocido como **consolidación**. Esta consolidación se asocia con la plasticidad neuronal, principalmente con la potenciación a

largo plazo, la cual requiere de síntesis de proteínas (McGaugh et al. 2000; Korte 2013; Menzel 2022). Esta plasticidad neuronal se asocia con la consolidación, gracias al postulado de Hebb, el cual establece que la actividad sináptica puede fortalecerse cuando la actividad en la neurona presináptica co-ocurre con la actividad de la neurona postsináptica (principalmente despolarizaciones de membrana que producen potenciales de acción) (Inda et al. 2011). La visión tradicional de la memoria establecía que cada vez que recordamos alguna experiencia, el trazo (engrama) de la memoria original es reactivado y después regresaba a su estado latente, de manera estable. Esta visión ha sido remplazada por las observaciones de que memorias que son reactivadas son susceptibles a modificarse, de modo que las próximas evocaciones contengan la información modificada. Uno de los modelos que trata de explicar esto es el que plantea que existe una etapa de **reconsolidación**. La reconsolidación es un proceso en el cual una memoria a largo plazo reactivada es transitoriamente sensible a agentes amnésicos que son eficientes durante la consolidación. De manera que durante la reconsolidación se puede inducir la pérdida de un recuerdo al ser evocado (Tronson y Taylor 2007; Inda et al. 2011; Alberini y Ledoux 2013). Si se asocia esta teoría con la del engrama, resulta que durante la formación del engrama hay un incremento en la fuerza de conectividad entre un grupo o ensamble de neuronas que son activadas durante un evento. La consolidación entonces fortalece las conexiones entre estas neuronas, lo que incrementa la probabilidad de que el mismo patrón de actividad pueda ser recreado en momentos posteriores, permitiendo una evocación exitosa. Durante la consolidación, el engrama permanece en un estado latente. Y es la evocación de la memoria quien regresa al engrama a un estado activo y que transitoriamente desestabiliza el patrón de conexiones. El engrama puede re estabilizarse por medio de la reconsolidación y regresar a su estado latente (Tronson y Taylor 2007; Sheena et al. 2015).

Reconocimiento de objeto novedoso

Para lograr comparar la memoria entre diferentes grupos de animales es necesario establecer una tarea que puedan realizar distintos taxa, y que puedan ser evaluados de manera similar en cada uno de ellos. Un buen candidato para esto es la tarea de reconocimiento de objetos novedosos (RON) (Ennaceur and Delacour 1988). Esta tarea se basa en el comportamiento

innato de los animales al encontrarse con un objeto nuevo en un entorno familiar; la respuesta puede ser exploración o aversión. La tarea RON consiste en evaluar indirectamente el recuerdo a través de la discriminación basada en la familiarización, es decir, al observar un comportamiento diferencial entre la presentación de un objeto nuevo y uno familiar, podríamos inferir que existe un recuerdo del último. También tiene varias características importantes a evaluar en los procesos de memoria, por ejemplo, no requiere condicionamiento, tiene alta validez ecológica, se realiza rápidamente, se puede dividir en fases (adquisición, consolidación y recuperación), así como la temporalidad (memoria a corto y largo plazo) y finalmente se ha observado que es una tarea compartida por todos los grupos de vertebrados donde ha sido estudiada y quizás algunos invertebrados (Blaser y Heyser 2015). Además, RON puede ser modificada fácilmente para evaluar memoria de lugar, presentando los mismos objetos en la fase de prueba, pero modificando su posición en el campo (Barker y Warburton 2008); memoria temporal, al usar dos fases de familiarización en momentos distintos y un objeto de cada fase durante la prueba (Michelle y Laiacona 1998); y memoria episódica al utilizar dos presentaciones de cuatro objetos familiares cada una y modificando la posición de algunos de esos objetos durante la fase de prueba (Kart-Teke et al. 2006). Esta tarea ha sido ampliamente estudiada en vertebrados, por ejemplo en peces como tiburones y pez cebra (Toms y Echeverria 2014; Fuss et al. 2014); aves como palomas (Spetch et al. 2006), cuervos (Stöwe et al. 2006) y mamíferos como monos Rhesus (Rajalingham et al. 2015), ratones (Leger et al. 2013) y ratas (Mathiasen y DiCamillo 2010). Por el contrario, RON ha sido poco estudiado en invertebrados; se han realizado algunas pruebas similares en sepias e insectos, como discriminación de objetos y discriminación de contexto (Kelman et al. 2008; Billard et al. 2020; Solvi et al. 2020), pero no de la misma manera que la tarea RON en vertebrados, por lo que aún queda mucha investigación por hacer en este campo.

Reconocimiento de objeto novedoso en cefalópodos.

Blaser y Heyser plantean en su revisión (2015) que la tarea de reconocimiento de objeto novedoso (RON) es una tarea adecuada para comparar el proceso de memoria en los diferentes grupos animales, puesto que parece estar sumamente conservada en el reino

animal. Incluso mencionan a los cefalópodos como sujetos particularmente interesantes para esta tarea, debido a su desarrollado sistema táctil y visual. Aun así, hasta donde sabemos no existe en la literatura un reporte científico que haya utilizado el paradigma de RON en algún cefalópodo. Sin embargo, existen reportes de tareas o paradigmas aplicados en cefalópodos que nos demuestran las capacidades exploratorias y de aprendizaje espacial de los pulpos y nos permiten considerar la aplicación del paradigma de RON en los mismos. Por ejemplo, Borrelli et al. (2020) presentan una batería para la evaluación del rendimiento de *Octopus vulgaris* y entre diversos paradigmas proponen el uso de un objeto novedoso presentado en conjunto con el alimento, lo que permitiría cuantificar la latencia al ataque. De este paradigma se concluye que el animal puede identificar la presencia de un objeto desconocido, lo que modifica su comportamiento. Un poco más alejados, pero aun relacionados, son los experimentos de Mather (1991) y Boal et al. (2000) en los cuales se demuestra que tanto *O. vulgaris* como *O. bimaculoides*, respectivamente, utilizan objetos en su entorno para ubicar su guarida principal. Si bien estas observaciones no nos hablan de un reconocimiento de objeto novedoso, ciertamente nos indican la relevancia de la exploración de los objetos y el recuerdo de su ubicación espacial por parte de los pulpos.

Efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas sobre la memoria.

Por más de 50 años cientos de publicaciones han reportado que en varias especies y decenas de paradigmas de aprendizaje, la administración de inhibidores de síntesis de proteínas antes o hasta unas horas después del entrenamiento produce amnesia. De manera importante, el mismo tratamiento mucho tiempo después no tiene efecto, lo que sugiere que la formación de la memoria depende de una fase inicial y temporalmente limitada de síntesis de proteínas (Alberini 2008). Para este trabajo es especialmente relevante mencionar que en el paradigma de reconocimiento de objeto novedoso, la inhibición de síntesis de proteínas en el hipocampo durante las primeras horas después de la fase de familiarización, provoca que los animales no puedan discriminar el objeto familiar durante la fase de prueba (Jarome y Helmstetter 2014). Los principales inhibidores que se utilizan son la anisomicina, cicloheximida, emetina y puromicina. La mayoría de estos actúan mediante la unión con el ribosoma, impidiendo la traducción. El inhibidor más utilizado es anisomicina; sin embargo, también es el que posee la mayor cantidad de efectos secundarios, incluidos la inhibición

parcial de la síntesis del ADN, fosforilación de la vía de MAPK y disminución de los niveles de catecolaminas (Macias-Silva et al. 2010). La cicloheximida ha sido planteada como una alternativa adecuada a la anisomicina, pues sus efectos secundarios son menores (Alberini 2008).

La cicloheximida es un antibiótico obtenido de la bacteria *Streptomyces griseus*, es un inhibidor reversible de la fase de elongación, durante la traducción de las células eucariotas. Esto lo logra a través de su interacción con el sitio E de la subunidad grande del ribosoma, lo que impide la formación del enlace peptídico (Schneider-Potesch et al. 2010). La cicloheximida ha sido utilizada en invertebrados para observar los efectos sobre la memoria a largo plazo en diversos paradigmas de aprendizaje, por ejemplo: en artrópodos como *Apis mellifera* (Wittstock et al. 1993; Villar et al. 2020) y *Drosophila melanogaster* (Krashes y Waddell 2008; Lagase et al. 2009; Wu et al. 2017), *Neohelice granulata* (Pedreira et al. 1995; Merlo et al. 2020) y en moluscos como *Helix pomatia* (Nikitin et al. 2019). En estos experimentos se han observado memorias a largo plazo dependientes de síntesis de proteínas y otras independientes de síntesis de proteínas, además se ha observado que el número de ensayos durante el entrenamiento puede alterar el efecto de la cicloheximida sobre la memoria. Debido al menor número de efectos secundarios que presenta la cicloheximida, comparado con la anisomicina, así como su amplio uso en paradigmas de aprendizaje aplicados a invertebrados, se decidió utilizar este inhibidor de síntesis de proteínas en el presente trabajo.

Queda claro que la síntesis de proteínas en diversas estructuras del cerebro es un fenómeno crucial para la formación de algunos tipos de aprendizaje, sin embargo, su inhibición puede alterar prácticamente todos los procesos celulares. Es por ello que, aunque es una gran herramienta para aproximarse a conocer cómo ocurre el proceso de memoria, se han utilizado inhibidores más específicos que han arrojado luz sobre cuáles serían las moléculas más relevantes para el proceso de consolidación de la memoria. Por ejemplo, la inhibición individual del *arn* mensajero de CREB, C/EBP, ZIF268, c-fos, *nur77*, NR1, BDNF, APP, SNAP-25 es suficiente para inhibir total o parcialmente la memoria a largo plazo (Lynch 2004; Alberini y Kandel 2014). De igual manera, la inhibición de mTOR por rapamicina,

NMDAR, PKA, CAMKII también interfiere con la memoria a largo plazo en una tarea de evitación pasiva (Chen et al. 2012; Schwabe et al. 2012)

Inhibición de síntesis de proteínas en cefalópodos.

Turchetti-Maia et. al (2018) prueban los efectos de un inhibidor de síntesis de proteínas, anisomicina, en el cerebro de pulpo *ex vivo* sobre un tipo de plasticidad neuronal la potenciación a largo plazo (PLP). Durante esta PLP ocurre un incremento duradero y sostenido en la transmisión del potencial eléctrico entre dos neuronas, algo que se ha correlacionado con la consolidación de la memoria (Kania et al. 2017). Ellos observaron que esta inhibición de síntesis de proteínas no tiene efecto en la PLP, lo que los lleva a proponer que en cefalópodos la PLP no es dependiente de síntesis de proteínas, algo extremadamente raro en el reino animal. Por otro lado, se ha observado que la saturación de la PLP o la eliminación de la conectividad entre las neuronas del lóbulo vertical y el lóbulo superior frontal provoca un efecto inhibitorio en la memoria a largo plazo del pulpo (Shomrat et al. 2008).

Considerando lo anterior sería interesante conocer los efectos de la inhibición de síntesis de proteínas sobre la memoria de los cefalópodos. Hasta donde sabemos, existe un solo artículo que ha investigado tal pregunta. Agin et al. 2003, investigaron el efecto de la cicloheximida sobre la memoria de *Sepia officinalis* durante una tarea de inhibición latente. Los autores presentaron a las sepias con presas inaccesibles, dentro de un tubo transparente y se cuantificó el número de ataques hacia las presas. Al no poder conseguirlas, la sepias aprenden rápidamente a inhibir el ataque; sin embargo, al ser inyectadas en la región entre la cabeza y el manto, “cuello”, con cicloheximida, este aprendizaje se ve inhibido a las 24 h. Es decir, la cicloheximida presentó un efecto en el aprendizaje a largo plazo de las sepias, aunque los resultados de Turchetti-Maia (2018) indican que no tiene un efecto sobre la potenciación a largo plazo. La cicloheximida parece afectar el aprendizaje a largo plazo, sin embargo no a la potenciación a largo plazo, que se ha correlacionado con algunos tipos de memoria y aprendizaje, por lo que hasta el momento estos resultados parecerían contradictorios.

Planteamiento del problema

Aunque en los pulpos se ha descrito anecdóticamente y experimentalmente la posibilidad de recordar objetos o lugares (Mather 1991; Borrelli et al. 2020), hasta el momento no se han estandarizado tareas experimentales que permitan la evaluación de tarea de reconocimiento en el pulpo, como la tarea RON. Es por ello que en este estudio nuestro objetivo principal fue estandarizar esta tarea en *O. maya* (Voss y Solis 1966), y secundariamente analizar su organización cerebral. Cumplir estos objetivos permitiría describir un método para la evaluación completa de la memoria en esta especie de pulpo y, al mismo tiempo, ofrecer una tarea estandarizada que permita aplicar RON en otras especies de cefalópodos.

Por otra parte, RON permite observar memoria de reconocimiento de largo plazo, cuando es evaluado 24 horas después de la familiarización. Como ya se mencionó previamente, esta memoria a largo plazo requiere de nuevas proteínas que permitan la modificación de las neuronas y por tanto de la plasticidad sináptica y neuronal, lo que se conoce como consolidación de la memoria. Es por ello que la inhibición de la síntesis de proteínas puede impedir la formación de memorias de largo plazo y cabría preguntarse: ¿Existe una fase de consolidación en la memoria de reconocimiento de objetos de *O. maya*, susceptible a la inhibición por cicloheximida?

Hipótesis

La administración de cicloheximida posterior a la familiarización con un objeto, inhibirá la formación de la memoria a largo plazo en la tarea de reconocimiento de objeto novedoso en *Octopus maya*.

Objetivo principal

Estandarizar un paradigma que permita evaluar memoria de reconocimiento de objeto novedoso a largo plazo en *O. maya*.

Objetivos secundarios

- Caracterizar el sistema nervioso de *O. maya* en diferentes etapas de vida.
- Evaluar los resultados de la tarea RON en diferentes etapas de vida de *O. maya*.
- Evaluar el efecto de un inhibidor de síntesis de proteínas sobre la memoria a largo plazo durante el paradigma de RON en *O. maya*.

Métodos

- Declaración ética

Todos los experimentos y manejos se realizaron bajo la aprobación del comité de bioética de la Facultad de Psicología de la UNAM y de conformidad con la directiva 2010/63/EU (parlamento europeo), considerando las recomendaciones de Fiorito et al. 2015.

- Sujetos

Los especímenes fueron obtenidos del Laboratorio de Ecofisiología Aplicada de la UMDI, Sisal, Yucatán. Se utilizaron ejemplares de *O. maya* de tres edades diferentes; un grupo de cinco ejemplares de cuatro semanas después de la eclosión ("bebés"), otro grupo de cinco ejemplares de cuatro meses ("jóvenes") y, el último grupo de cinco ejemplares de edad desconocida pero con un peso superior a 800 g, para los cuales fueron especímenes en etapa reproductiva ("adultos"). Los grupos de "bebés" y ejemplares "jóvenes" fueron criados y mantenidos en condiciones de laboratorio hasta el final de los experimentos, mientras que el grupo "adultos" estuvo conformado por ejemplares capturados. Los animales se mantuvieron en tanques de 120 l, con agua de mar artificial (3.5 % de salinidad) y condiciones que aseguraron su sobrevivencia en buenas condiciones (Rosas et al. 2014). Se utilizaron otros dos grupos de cinco individuos adultos en cada uno. Uno de ellos fue administrado con cicloheximida (Chx) y otro recibió inyección de agua marina artificial (Sham). Para evaluar el efecto de la cicloheximida sobre la motricidad de los individuos, se evaluó el tiempo de desplazamiento total durante la fase de prueba en los grupos Chx y Sham.

Al día siguiente de terminar el protocolo del paradigma de reconocimiento de objeto novedoso, tres ejemplares adultos y tres bebés fueron sacrificados mediante el uso de anestesia (etanol 3.5% en agua marina) y posterior extracción del cerebro para análisis histológicos.

- Tarea de reconocimiento de objetos novedoso (RON)

Esta tarea fue adaptada de otros modelos animales (Lupetow 2017; Ennaceur 2018; Rossato et al. 2019) para ajustarla al comportamiento del pulpo. Se ejecutaron tres fases; la fase de habituación, en la que se colocaba a los animales en un nuevo recinto y se les permitía

acostumbrarse al nuevo ambiente durante 24 horas, en este caso se consideraba que el animal estaba habituado si se colocaba en una posición denominada "reposo en un guarida" y consumía el alimento vorazmente. A las 24 horas comenzó la fase de familiarización (segunda fase). En esta fase se presentaban dos objetos equidistantes, que debían tener aproximadamente el tamaño del manto del ejemplar utilizado en la prueba para evitar aversión o indiferencia por parte de los individuos (Fig. 2). Estos dos objetos eran idénticos y se presentaron a "jóvenes" y "adultos" durante 30 minutos, y 5 minutos para el grupo de "bebés". La diferencia en la duración de la prueba se debió a los comportamientos mostrados por los individuos a diferentes edades, ya que las crías no exploraron los objetos por más de 5 minutos, como se observa en los resultados. Una vez transcurrido este tiempo, se retiraban los objetos y se dejaban pasar 24 horas para la última fase, que denominamos "la prueba". Durante la prueba, se presentaron dos objetos; uno familiar, mostrado el día anterior y uno nuevo, diferente al objeto familiar. La duración de esta fase fue la misma que en la familiarización. Durante las fases de familiarización y prueba se cuantificó la latencia a la exploración de los objetos, así como el tiempo total de exploración, la exploración visual y táctil de los objetos. La exploración visual consistió en acercarse indirectamente a uno de los objetos, con trepadas o saltos, y con al menos uno de los ojos dirigido hacia el objeto. Estos movimientos pueden continuar hasta acercarse lo más posible al objeto pero sin tocarlo. La fase de exploración táctil es cuando el espécimen toca el objeto con uno o más brazos, considerando que estos objetos no estaban adheridos a las paredes del tanque; por lo tanto, los sujetos podrían levantarlos o empujarlos. La exploración total consistió en la suma de la exploración visual y la exploración táctil. Finalmente, durante la fase de prueba se cuantificó la exploración final de ambos objetos, que corresponde a la suma del tiempo explorando el objeto novedoso y el objeto familiar. Para evitar un posible sesgo de preferencia, debido al color y forma de los objetos, las identidades de objetos familiares y nuevos se aleatorizaron entre los individuos. No se encontraron diferencias en los resultados de las pruebas, independientemente de los objetos utilizados. Para el grupo de individuos al que se administró ciclohecimida (Chx), esta se administró como se describe más adelante, una hora posterior a la prueba de familiarización (Fig. 2).

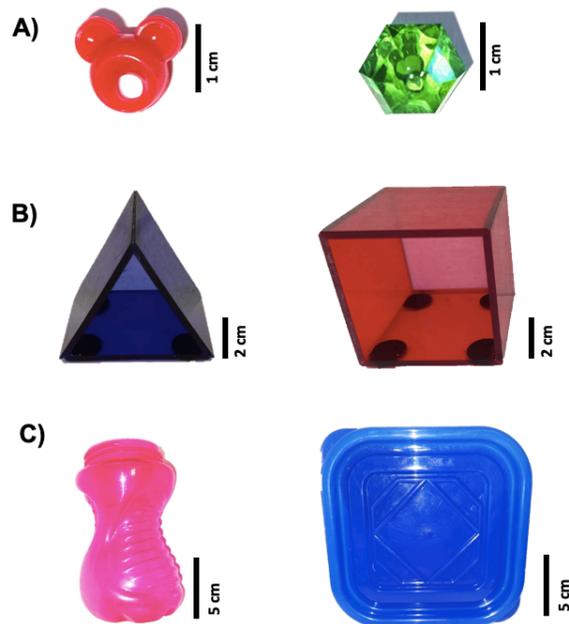
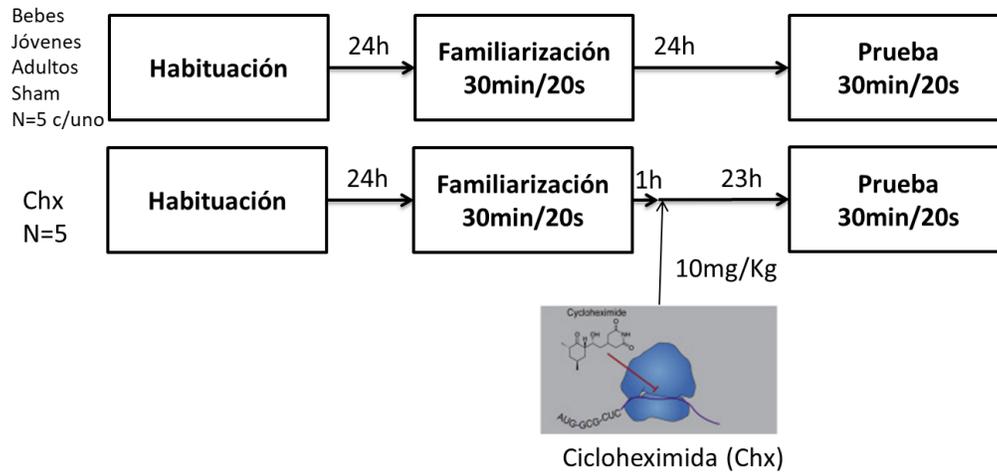


Figura 2. Esquema del protocolo de reconocimiento de objeto novedoso para *O. maya* (arriba). El protocolo consta de tres fases: habituación, el ejemplar entra en la pecera experimental y se permite que se familiarice con el contexto; familiarización, se presentan dos objetos idénticos; prueba, se presenta un objeto familiar y otro novedoso. Cinco ejemplares de cada grupo pasaron por el protocolo de RON (25 en total) y cinco ejemplares más fueron utilizados para la tarea RON y administración de la cicloheximida. **Ejemplo de objetos utilizados durante la prueba (abajo).** El tamaño de estos objetos cambió según el tamaño promedio del manto en cada grupo; A) bebés 1,5 cm, B) juveniles 6,5 cm y C) adultos

18 cm. Se utilizaron figuras acrílicas sencillas y se aleatorizó su identidad (nueva o familiar) entre los individuos.

- Histología

Se extrajo tejido cartilaginoso del cerebro como se describe a continuación:

- Se separan el manto y los brazos, dejando solo el segmento que contiene los ojos y el cráneo.
- Separa el cráneo del tejido muscular y se obtiene el cráneo, el cual tiene forma triangular, dos de los lados corresponden a las cuencas donde se ubican los ganglios ópticos, y el tercer lado corresponde a la región dorsal. La parte superior del cráneo es ligeramente redondeada.
- Se corta el vértice entre los dos lados con las cuencas de los ojos y desde allí se hacen cortes hasta el orificio de la vía óptica, en el centro de cada lado del cráneo.
- Estos cortes permiten abrir la parte superior del cráneo, exponiendo así el cerebro.
- El lóbulo vertical es rápidamente identificable por sus característicos surcos.
- Finalmente, se separa cuidadosamente el cerebro, cortando los nervios de la región inferior y se limpian los restos de cartílago.

Se fijó el cerebro durante 24h en formol al 4% en agua salada artificial y posteriormente se incluyó en parafina. Mediante el uso de un micrótopo (KEDEE, 2258), se obtuvieron secciones de tejido de 10 μm de espesor, cada 70 u 80 μm . Se realizaron tinciones con Hematoxilina-Eosina (HE) y violeta de cresilo (Nissl) siguiendo un protocolo estándar en secciones de 10 μm , como se describe a continuación:

1. Las laminillas se dejan en la estufa por 30 minutos a 60°C (desparafinación).
2. Xilol, 2 pasos de 10 minutos (final desparafinación).
3. Se pasan por concentraciones decrecientes de etanol (96°, 80°, 70°), 3 minutos en cada concentración. Acabar con un paso de agua (hidratación).
4. Hematoxilina durante 3-5 minutos.
5. Lavar la muestra en una cubeta con agua corriente de forma que rebose y eliminar el exceso de colorante.

6. La muestra se sumerge y se saca rápidamente en una cubeta con alcohol ácido (0.5% de HCl en etanol absoluto) varias veces, para eliminar el exceso de coloración en la muestra (diferenciación).
7. Se neutraliza el ácido sumergiendo la muestra en agua corriente durante 2 minutos.
8. Lavar con agua corriente durante varios minutos. Pasar por agua destilada antes de seguir.
9. Sumergir la muestra en Eosina durante 3 minutos.
10. Baño rápido con agua.
11. Se pasan por concentraciones crecientes de etanol (70°, 80°, 96°), 3 minutos en cada concentración. Acabar con 2 pases de etanol al 100% (deshidratación).
12. Se acaba en xilol, en 2 o 3 cubetas, de 30 segundos a 5 minutos.
13. Montar de manera habitual.
14. Para la tinción de Nissl, se remplazan los pasos 4-9 por un solo paso en el que se sumergen las laminillas en una concentración de violeta de cresilo al 0.02% por 3 minutos. Los pasos restantes continúan sin cambios.

Se obtuvieron 37-42 cortes sagitales de cada uno de los 3 especímenes de diferente edad y 51-56 de cortes coronales secuenciales. Además, se obtuvieron 51 portaobjetos transversales teñidos con HE del cerebro de un espécimen adulto.

- Administración cicloheximida

Se utilizó cicloheximida (Sigma, Aldrich, 01810) en una concentración de 20mg/ml en agua de mar artificial (3.5% salinidad). Para su administración cinco ejemplares adultos fueron anestesiados por inmersión en etanol al 3.5% en agua de mar artificial durante 15 minutos y pesados para determinar el volumen final de la solución a inyectar. Posteriormente se les administró la cicloheximida (10mg/kg) a través de la arteria aorta dorsal. Inmediatamente después los ejemplares se regresaron a sus recintos con agua salada (3.5%). El grupo Sham correspondió a cinco individuos adultos en los que se realizó un procedimiento idéntico al descrito previamente, con la única diferencia de inyectar únicamente agua de mar, sin cicloheximida.

- Análisis estadístico

Los datos fueron evaluados mediante el índice de discriminación (Novedoso-Familiar)/Exploración total) y las pruebas no paramétricas Wilcoxon de rangos con signo y U de Mann-Withney con el software STATISTICA 10 para comparar el tiempo de exploración del objeto familiar con el novedoso, considerando $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

3. Resultados

Cerebro de *O. maya*.

El tamaño del tejido ubicado dentro de la cavidad cartilaginosa (ganglio central) fue de $6\pm 1,5$ mm de ancho y $9\pm 1,7$ mm de largo (Fig. 3E, F). Se usaron secciones de tinción de HE y tinción de Nissl para caracterizar las diferentes regiones del cerebro de *O. maya*. En los tejidos se observó que mantienen una disposición típica de ganglios de invertebrados con un cúmulo de somas en la periferia o pericarion y proyecciones axonales formando el centro del mismo o neuropilo. Sin embargo, muestran una gran heterogeneidad en cuanto al tipo de células observadas, su disposición y su densidad. A través de la caracterización morfológica de los tejidos, observando los sitios del pericarion y del neuropilo, fue posible distinguir 30 lóbulos diferentes que conforman el ganglio central y al menos dos para cada uno de los ganglios axiales, con la identificación de al menos 10 tipos neuronales diferentes (Tabla 1; Fig. 3A-D). Como cada corte fue secuencial, y conociendo la distancia entre cada corte, se pudo calcular la distancia a la que se ubica cada corte al centro de la tela.

Una vez fotografiadas todas las secciones con el estereoscopio, estas fotografías se utilizaron para crear un modelo tridimensional que ayudaría a analizar todas las imágenes simultáneamente (Fig. 4C). De esta forma se determinaron las conexiones anatómicas existentes entre los diferentes lóbulos (Fig. 4A-B). En cuanto a los nervios y vías provenientes del resto del cuerpo del animal, se destacan los ocho nervios braquiales provenientes de cada ganglio braquial, los cuales confluyen en el lóbulo prebraquial, junto con los nervios anteroorbitario. Esto inicia una red compleja de tractos y nervios que conectan el lóbulo braquial posterior con los lóbulos bucal y bucal posterior de un lado y el lóbulo paliovisceral del otro. En cuanto a la vía óptica, atraviesa la región posterior de la masa supraesofágica, conectando los dos lóbulos ópticos con los lóbulos pedunculares, los lóbulos olfatorios y las glándulas ópticas. Además, este tracto se bifurca para unirse al lóbulo precomisural en la masa supraesofágica y al lóbulo paliovisceral en la masa subesofágica. La masa subesofágica y supraesofágica forman un anillo gracias a una amplia comunicación anatómica formada por axones y células (posiblemente gliales) que conforman las conexiones prebraquial-bucal por un lado y las conexiones pedal-basal/paliovisceral-basal por el otro. Observamos que existe una gran conectividad entre prácticamente todos los

lóbulos del cerebro y una gran distribución de nervios y tractos que distribuyen información sensorial a ambas masas cerebrales, supra y subesofágicas.

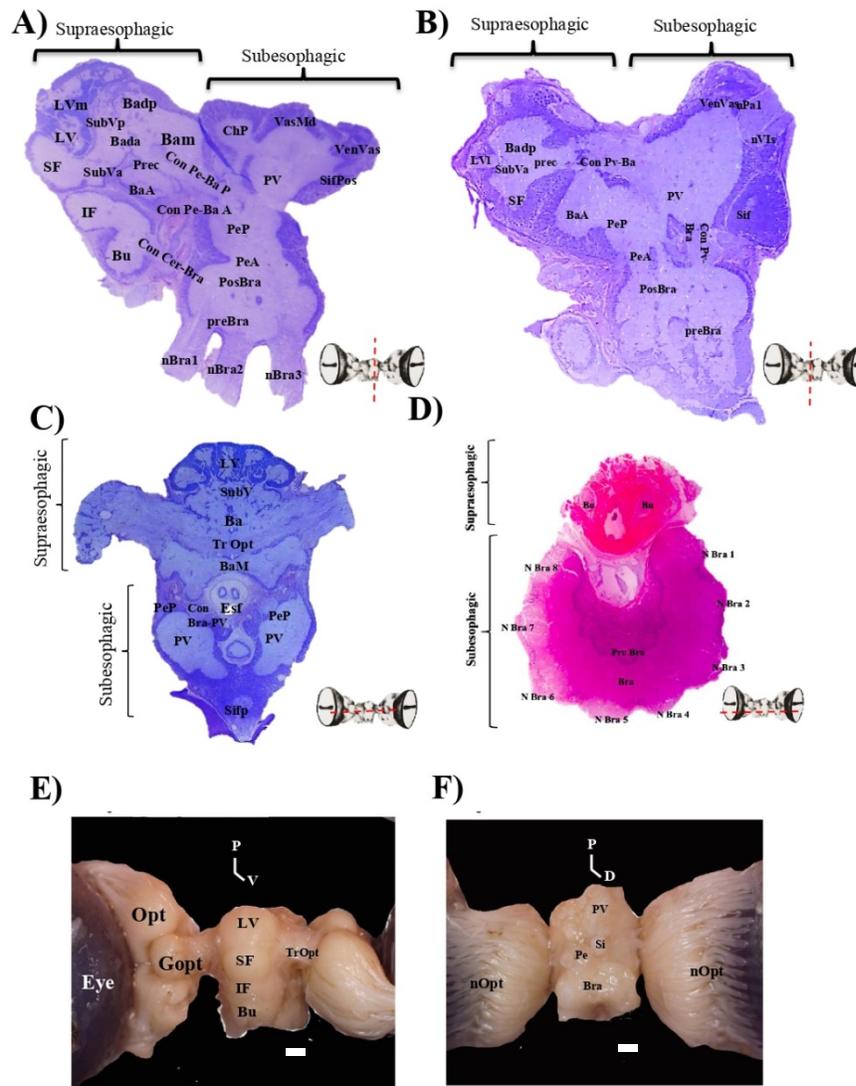


Figura 3. Estructuras cerebrales de *O. maya*. Cortes sagitales (A, B) del ganglio central de *O. maya* con abreviaturas en cada estructura, según Tabla 1. Cortes coronales (C, D) y fotografía de tejido fresco en perspectiva ventral (E) y dorsal (F). Las barras representan 1000 μm. P: Posterior, V: Ventral, D: Dorsal (Para revisar la nomenclatura ver Tabla 1).

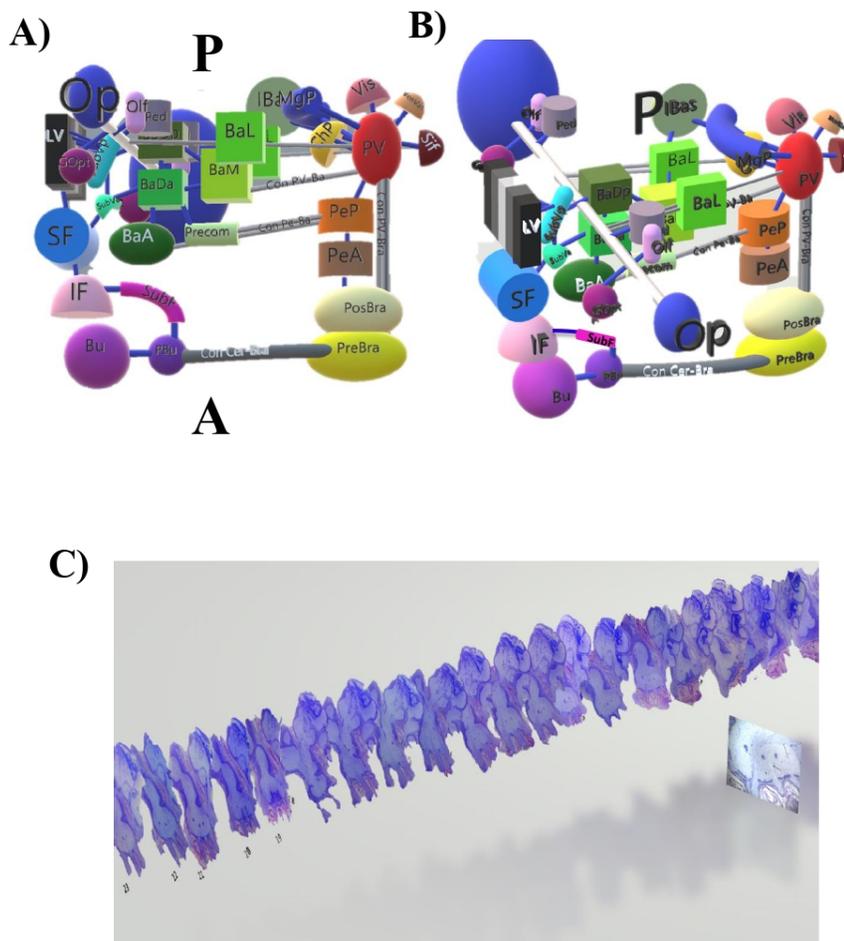


Figura 4. Esquema de conectividad en el cerebro de *O. maya*. Las formas geométricas representan cada uno de los lóbulos del cerebro de *O. maya*. Las líneas azules representan conectividad adyacente y las líneas grises representan conectividad distante a través de tractos neuronales o nervios (A, B). Imagen representativa del arreglo tridimensional de las láminas digitalizadas, correspondiente al total obtenido de un cerebro de pulpo completo, utilizado para el análisis de conectividad cerebral (C). Este arreglo en tres dimensiones fue realizado con la herramienta Paint 3D, de Microsoft. Las fotografías se dispusieron como etiquetas planas en orden secuencial, con espacios constantes entre cada una de ellas. Esto permite al usuario acercar y alejar, así como ver desde varias perspectivas para facilitar la interpretación de la conectividad y la morfología del tejido (Nomenclatura ver Tabla 1).

- El cerebro joven continúa su desarrollo 4 semanas después de la eclosión.

Se observó que, el cerebro a las 4 semanas en general presenta una similitud con el cerebro adulto, entendida como el mismo número de lóbulos y las conexiones anatómicas entre ellos; sin embargo, algunos lóbulos aún no tienen la morfología final que tendrán en la etapa adulta, principalmente los lóbulos frontal inferior, subfrontal, bucal y bucal posterior. Estos son lóbulos que se han propuesto como participantes en la memoria somatosensorial. Para sustentar estas sugerencias, se realizó un conteo manual de los somas de ejemplares adultos y de cuatro semanas de edad. Este conteo sugiere que hay una menor densidad celular en individuos jóvenes, en comparación con individuos completamente desarrollados, al menos en los lóbulos SF, IF y Bu (Fig. 5).

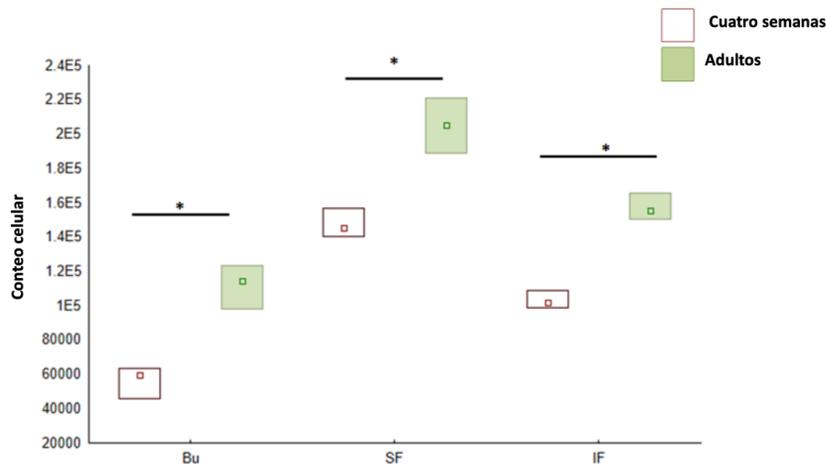


Figura 5. Conteo celular del cerebro de *O. maya*. Gráfico que muestra un menor número de cuerpos celulares en los lóbulos bucal (Bu), frontal inferior (IF) y frontal superior (SF) de ejemplares de cuatro semanas frente a ejemplares adultos, prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.05$, las líneas con asterisco indican diferencias significativas entre esos grupos.

- Los jóvenes y adultos de *O. maya* exploran diferencialmente un objeto familiar y uno nuevo.

Tanto el grupo de jóvenes como el de adultos mostraron un comportamiento similar con dos tipos de exploración de objetos; exploración guiada visual y táctil. La exploración visual consistió en acercarse indirectamente a uno de los objetos, con trepadas o saltos y con al menos uno de los ojos dirigido hacia el objeto. Estos movimientos pueden continuar hasta

acercarse lo más posible al objeto, pero sin tocarlo. Considerando que estos objetos no estaban adheridos a las paredes del tanque, los especímenes podrían levantarlos o empujarlos. Después de explorar los objetos, los animales regresaron a sus madrigueras en posición de descanso. En los grupos de jóvenes y adultos se observó que los tiempos de exploración eran similares entre ambos objetos durante la familiarización (Mann-Whitney, $p = 0.28$, $Z = 1.088$) y, aunque el tiempo dedicado a cada tipo de exploración podía variar entre individuos, los cinco ejemplares presentaban un acercamiento y manipulación de ambos objetos (Fig. 6). A las 24 horas se realizó la fase de evaluación y se observó que los ejemplares adultos exploraron el objeto familiar por menos tiempo, en comparación con el objeto novedoso (Wilcoxon, $p = 0.043$, $Z: 2.023$), mientras que los jóvenes exploraron el objeto novedoso de forma táctil durante un tiempo significativamente menor (Wilcoxon, $p = 0.028$, $Z: 2.2$), pero mostraron el mismo tiempo de exploración visual (Wilcoxon, $p\text{-value} = 0.23$, $Z: 0.94$). Se observó que al explorar el objeto familiar no hubo exploración táctil de este, es decir cuando se conoce el objeto solo se utiliza la exploración visual para su identificación, pero no la exploración táctil (Fig. 6).

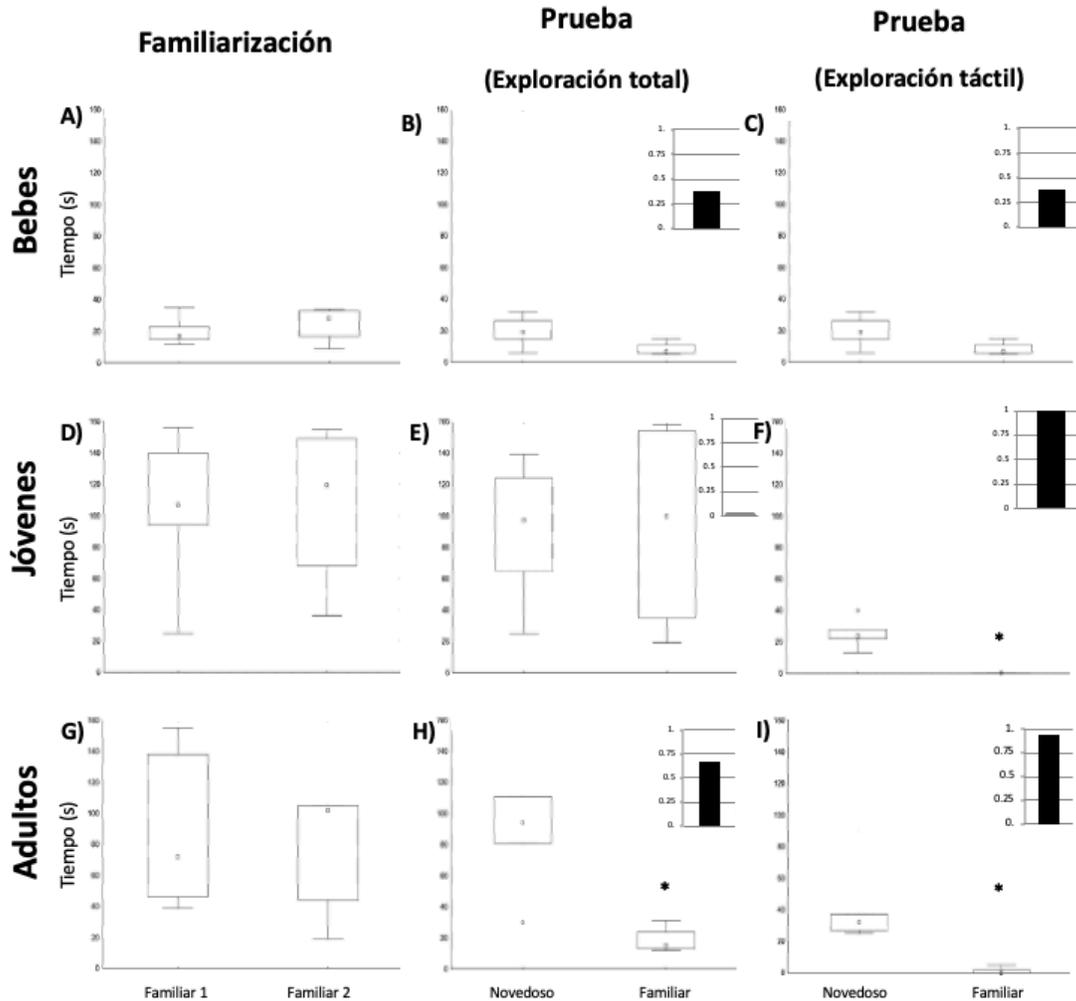
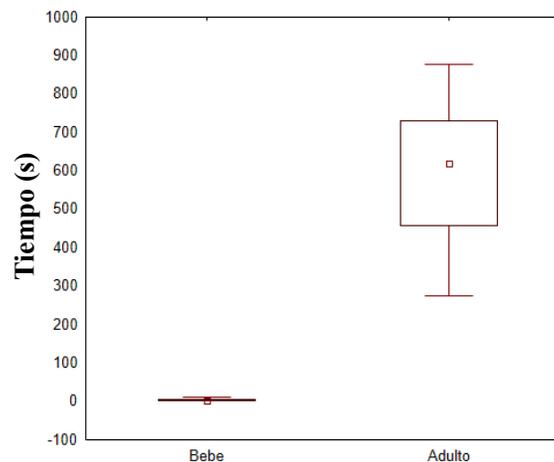


Figura 6. Resultados de la prueba RON en crías (arriba), juveniles (medio) y adultos (abajo) de *O. maya*. Durante la fase de familiarización (izquierda) no hay diferencias entre el tiempo total de exploración de ambos objetos (Mann-Whitney, $p = 0.28$, $Z = 1.088$), aunque se observa que los bebés exploran menos de 60 segundos, mientras que los grupos de jóvenes y adultos exploran más de 100 segundos. En la exploración total durante la fase de prueba (medio), solo los adultos muestran una diferencia significativa (Wilcoxon, $p = 0.041$, $Z: 2.03$). Si solo se considera la exploración táctil (derecha), tanto el grupo de jóvenes como el de adultos mostraron un comportamiento diferencial entre el objeto novedoso y el familiar (Wilcoxon, $p\text{-value} = 0.043$, $Z: 2.02$ y Wilcoxon, $p\text{-value} = 0.028$, $Z: 2.2$; respectivamente). Los recuadros en cada gráfico de prueba muestran el valor del índice de discriminación (ID) = (Tiempo de exploración del objeto novedoso – Tiempo de exploración del objeto familiar) / Tiempo de exploración final de ambos objetos). Un ID cercano a 1 se considera una buena discriminación entre el objeto familiar y el novedoso, mientras que un ID $>$ de 0.5 se considera una incapacidad para distinguir entre el objeto familiar y el novedoso (Ennaceur 2018; Sivakumaran et al. 2018).

- A las 4 semanas *O. maya* no se comporta diferencialmente con respecto al objeto novedoso y al familiar.

En los ejemplares de cuatro semanas se observó que si bien existe un aumento en el tiempo que dedican a la exploración táctil del objeto novedoso, en comparación con el objeto familiar, esta diferencia no se presentó en todos los individuos y no es estadísticamente significativa (Wilcoxon, $p = 0.068$, $Z: 1.82$) (Fig. 6). En ese grupo se observó un comportamiento de “ataque” inmediato hacia los objetos, independientemente del tamaño de los objetos, los ejemplares se abalanzaban sobre ellos inmediatamente al entrar al agua. Esto queda demostrado por la corta latencia a la exploración (Fig. 7). Por esta razón, no hubo división en cuanto a las fases de exploración, solo se evaluó el tiempo en exploración táctil y el tiempo total de exploración (el tiempo pasado fuera de la guarida o en una actividad diferente al descanso). Por otro lado, el tiempo total dedicado a explorar fue el mismo independientemente de la fase de prueba (familiarización o evaluación) y dedicaron significativamente menos tiempo a explorar que el grupo de adultos (Fig. 7).



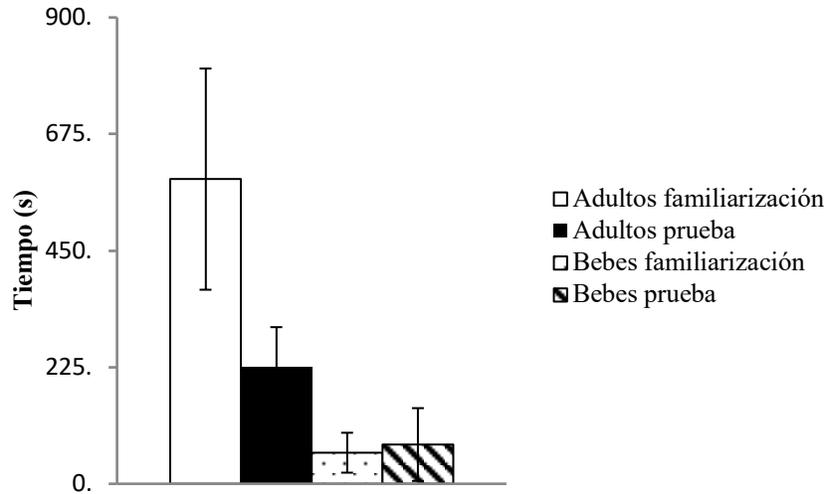


Figura 7. Tiempo de latencia a la exploración (arriba) y tiempo de exploración total de ambos objetos (abajo) durante RON.

- La inhibición de síntesis de proteínas interrumpe la formación de la memoria a largo plazo en RON.

Para observar el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas sobre la memoria a largo plazo en RON se administró vía intravenosa cicloheximida (10mg/kg) en cinco ejemplares adultos de *O. maya*, una hora después de la etapa de familiarización de los objetos. Se observó que el grupo con el inhibidor de síntesis de proteínas presentó una exploración similar entre el objeto novedoso y familiar, a diferencia del grupo sham que mostró un alto índice de reconocimiento (Fig. 8). Es decir, la memoria a largo plazo (24h posterior a la familiarización) se vio interrumpida por la administración de cicloheximida. Es importante mencionar que se evaluó el tiempo total de desplazamiento de los ejemplares en la pecera experimental. Se observó que ambos grupos (Chx y Ctrl) se desplazaron tiempos similares, alrededor del 70% del tiempo total (Fig. 9).

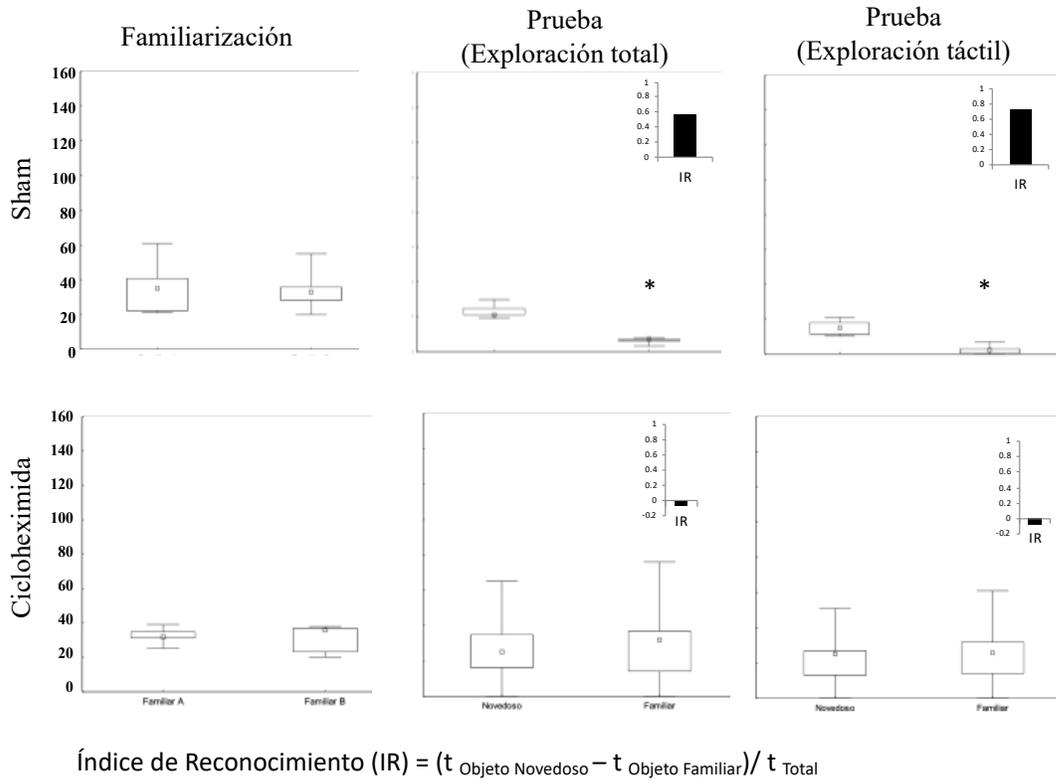


Figura 8. Tiempo de exploración durante la fase de familiarización y prueba de RON. Los organismos con cicloheximida no lograron discriminar el objeto familiar del objeto novedoso. Los organismos sham obtuvieron un índice de discriminación de 0.7, n = 5.

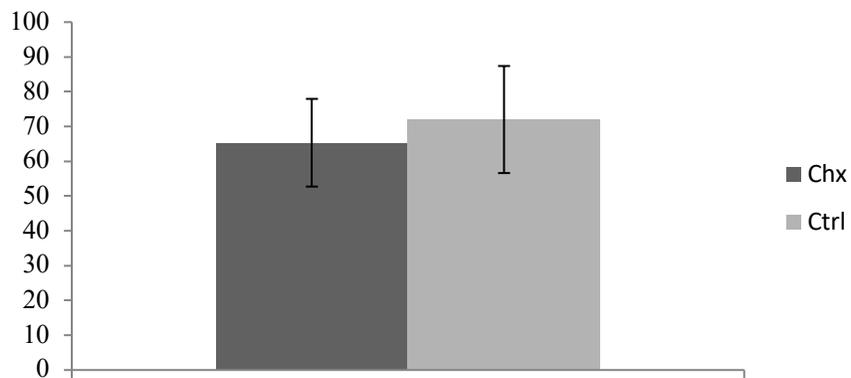


Figura 9. Tiempo de desplazamiento. Se presenta el porcentaje de tiempo del total (30min) que cada grupo, cicloheximida (Chx) y control (Ctrl), pasó desplazándose dentro de la pecera experimental.

Discusión

Caracterización del cerebro de *O. maya*.

Se determinó la estructura de 30 lóbulos en el cerebro de *O. maya* de ejemplares jóvenes y adultos, así como las células que conforman las vías de conectividad entre estas regiones. La compleja red de lóbulos y conectividad presente en el cerebro del pulpo subyace en la diversidad de comportamientos y habilidades cognitivas que se han propuesto en cefalópodos y particularmente en *O. maya*. Sin embargo, es importante aclarar que los métodos utilizados en este trabajo no nos permiten determinar la polaridad en esta conectividad, ni los tipos de células que la hacen posible. Son necesarias futuras investigaciones que utilicen diversos métodos de observación, así como de la actividad fisiológica, para caracterizar con más detalle la relación entre las diferentes estructuras y su participación en los diversos procesos neurofisiológicos. Estas investigaciones probablemente nos ayudarán a definir mejor las estructuras cerebrales, considerando los tipos de células, así como su función.

Observamos que a las cuatro semanas después de la eclosión, los cerebros de *O. maya* no muestran un cerebro completamente maduro. Se da el caso de que algunos lóbulos relacionados con la memoria somatosensorial tienen una densidad neuronal baja y una morfología más simple que la de los ejemplares adultos. Estas observaciones podrían correlacionarse con observaciones de comportamiento, ya que a esta edad los pulpos muestran una capacidad disminuida para la memoria y la inhibición de la respuesta (Vergara-Ovalle et al. 2022). Sin embargo, se necesitan más estudios sobre el desarrollo y maduración del sistema nervioso de *O. maya*, así como las diferencias conductuales y cognitivas que podrían presentar en diferentes etapas de su vida para confirmar estas ideas.

Un retraso en la maduración del sistema nervioso como el observado en el presente trabajo se ha descrito en otros cefalópodos como la sepia *Sepia officinalis* (Dickel et al. 2005), *S. pharaonis* (Liu et al. 2017), el calamar *Idiosepius paradoxus* (Yamamoto et al. 2003) y *S. lessoniana* (Shigeno et al. 2001), los pulpos *O. ocellatus* (Yamazak et al. 2002) y *O. vulgaris* (Giuditta y Prozzo 1974). Esto puede indicar que es una característica conservada en el clado Cephalopoda. Es importante mencionar que, aunque los resultados sugieren una diferencia entre el número de neuronas de ejemplares adultos y jóvenes, la conectividad entre los

diferentes lóbulos parece estar ya formada desde las primeras etapas de vida. Sin embargo, aún falta determinar si esta conectividad modifica su actividad eléctrica y neurotransmisora a medida que los individuos maduran.

Los lóbulos cerebrales en *O. maya* son muy similares a los previamente descritos por Young (1971) y Jung et al. (2018) para *O. vulgaris* y *O. minor*, respectivamente. Aunque esto era de esperarse por tratarse de especies estrechamente emparentadas (Juarez et al. 2012). Aun así, es importante determinar la neuroanatomía de *O. maya* ya que es una especie ideal para realizar estudios fisiológicos y de comportamiento en el laboratorio. Esto se debe en parte a sus características de desarrollo, ya que eclosiona como larva holobentónica, pero también a sus hábitos de comportamiento, por ejemplo, no suele enterrarse, ni escapar de su recinto, cuando se le proporciona alimentación y refugio adecuados. Además, es una especie de pulpo en la que se ha avanzado considerablemente en la estandarización de sus cuidados.

Siempre que la información detallada sobre los aspectos fundamentales de la especie esté más disponible, promete ser un gran modelo para la investigación en neurobiología. Además, la determinación de las características morfológicas de diversas especies permite la comparación entre ellas y la relaciona con sus comportamientos y capacidades cognitivas, tal como lo discutieron recientemente Gutnick et al. (2022) y Chung et al. (2022).

En el presente estudio, se observó que especímenes jóvenes y adultos de *O. maya* mostraron reconocimiento de objetos novedosos. Este reconocimiento se observó como una disminución en el tiempo total de exploración del objeto familiar. La exploración puede ser al menos visual y táctil, siendo la principal diferencia que cuando el objeto se vuelve familiar, prácticamente no se explora de forma táctil. Los resultados sugieren que el objeto familiar puede reconocerse visualmente, sin necesidad de explorarlo con otro órgano de los sentidos, mientras que cuando el objeto es desconocido, se utiliza el tacto a través de los brazos, uno de los sentidos más desarrollados de la especie (Young 1963), para explorarlo. Esto puede considerarse como un indicador de una representación multi-modal de los objetos en su entorno, en la cual, en este caso, se reconocen las propiedades visuales y táctiles como pertenecientes a un solo objeto. Algo similar ha sido observado en otros invertebrados como los abejorros (Solvi et al. 2020). Sin embargo, es necesario realizar otros experimentos que

permitan corroborar esta afirmación, por ejemplo, utilizar objetos visualmente similares, pero con texturas diferentes para identificar si *O. maya* es capaz de discriminar objetos utilizando únicamente el tacto.

Con respecto a la discriminación multi-modal de los objetos en invertebrados, se han realizado algunos experimentos en sepias. Mediante un paradigma de discriminación por dos sentidos se entrena a los ejemplares en un condicionamiento operante para que escojan entre dos figuras, dependiendo del sentido por el que identificaron el objeto, a saber la imagen de un cangrejo o el aroma del mismo y concluyen que las sepias recuerdan si vieron u olieron el cangrejo con anterioridad (Billard et al 2020). De manera similar, aunque en otro grupo de invertebrados, Solvi et al. (2020) observaron que los abejorros son capaces de discriminar entre dos figuras de madera (esfera y cubo) a través de la vista y del tacto, de manera independiente. Finalmente, con respecto a la interpretación que podemos hacer de la capacidad de recordar el objeto familiar, Ennaceur (2010) menciona que, en los roedores, “La preferencia por un objeto nuevo significa que la representación del objeto familiar existe en la memoria del animal”; es decir, que el objeto existe como una imagen en el cerebro del animal, aunque el objeto no esté presente físicamente en el contexto del animal. Si esta afirmación es verdadera para los vertebrados, no habría objeciones a que también lo sea para un invertebrado con la misma preferencia por un objeto nuevo. E incluso podemos decir que muy probablemente, esta representación posee componentes visuales y táctiles del objeto familiar.

A diferencia de lo observado en los "jóvenes" y "adultos", la mayoría de los "bebés" no mostró un reconocimiento adecuado de un objeto novedoso. Además, sospechamos que en la etapa de bebé podría ser más importante la exploración táctil que la visual debido al comportamiento de los individuos de abalanzarse sobre los objetos con los ocho brazos, de manera similar al comportamiento de ataque reportado para otras especies de pulpos, por ejemplo, *O. vulgaris* (Shomrat et al. 2008; Zarrella et al. 2015). Esto se corrobora con los tiempos sumamente cortos de latencia a la exploración observados en las crías. Probablemente esta respuesta de ataque rápido forme parte de una respuesta adaptativa que permite a los individuos conseguir la mayor cantidad de alimento y de información durante

las primeras etapas del desarrollo. En conjunto con lo observado en el conteo de neuronas de tres lóbulos del cerebro de ejemplares bebés y adultos, estos resultados podrían sugerir la hipótesis que *O. maya* pasa por una etapa de maduración del sistema nervioso, durante la cual adquiere la capacidad de inhibir su respuesta y esto le permite discriminar mejor los objetos a explorar.

RON en *O. maya*

Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se aplica esta tarea a una especie de pulpo y solo se han realizado adaptaciones similares en unos pocos invertebrados como la sepia (Kelman et al. 2008; Billard 2020) y los abejorros (Solvi et al. 2020). Sin embargo, no se trataba estrictamente de paradigma de RON, sino de adaptaciones u otro tipo de discriminación, mientras que en este caso los pulpos se expusieron a una tarea idéntica a la que se realiza en los vertebrados, facilitando así la comparación entre ambas a nivel conductual y cognitivo. Por el contrario, el efecto que tiene la "familiaridad del contexto y los objetos" sobre el aprendizaje en algunas especies de pulpos ha sido ampliamente descrito (Fiorito et al. 1998; Borrelli et al. 2020), sin embargo, no había sido estandarizado en una prueba que pueda compararse con otros grupos y medirse como una prueba de memoria, hasta ahora.

Con respecto a esta comparación de la tarea entre diferentes grupos taxonómicos, *O. maya* en el presente trabajo incrementó la exploración del objeto novedoso. Esto podría ser indicador de un comportamiento de exploración innato hacia objetos novedosos, de manera similar a lo que sucede en los modelos murinos (Ennaceur 2018), pero diferente a lo que ocurre en otros vertebrados como el pez *Danio rerio*, el cual presenta aversión a los objetos novedosos o neofobia. (Fuss et al. 2014). Con respecto a las diferencias entre edades de la misma especie en el desempeño de RON, los resultados de este trabajo sugieren que *O. maya* pasa por una etapa de maduración, durante la cual adquiere respuestas más complejas, lo que permite una mejor discriminación de los objetos a explorar. Esto debería reflejarse en la maduración del sistema nervioso posterior a la eclosión de la especie (Vergara-Ovalle et al. 2022). Algo similar fue encontrado por Anderson et al. 2004 durante NOR en ratas. Al igual que en este trabajo, también utilizaron tres grupos de diferentes edades: destetados, juveniles y adultos. Observaron que las ratas jóvenes y adultas pueden discriminar entre un objeto

novedoso y un objeto familiar, 24 horas después de la familiarización, mientras que las ratas recién destetadas no pudieron. Esto parece indicar un proceso de maduración del sistema nervioso, lo que sugiere una similitud entre *O. maya* y las ratas. Es importante mencionar que para lograr una exploración adecuada de las ratas de diferentes edades durante la tarea, Anderson et al. hicieron la tarea apropiada para la edad al reducir el tamaño de los objetos y la arena de manera similar a como se hizo con *O. maya* en el presente trabajo. Esta diferencia ontológica durante la tarea NOR parece no ser universal; por ejemplo, las larvas de pez cebra pueden discriminar objetos desde los primeros días después de la fertilización (Bruzzone et al. 2020). Quizás esta diferencia en la capacidad de discriminar desde las primeras etapas de la vida se corresponda con la necesidad de madurar un sistema nervioso más complejo, considerando que el pez cebra tiene 10^7 neuronas (Friedrich et al. 2013), mientras que las ratas tienen un aumento acelerado en el número de neuronas durante los primeros meses después del nacimiento y llegan a 2×10^8 neuronas (Bandeira et al. 2009). Del mismo modo, los pulpos aumentan considerablemente su número de neuronas durante el desarrollo posterior a la eclosión hasta llegar a 5×10^8 neuronas (Hochner 2012). Aunque similar, esta exploración ocurre mucho más lentamente en *O. maya* que en los modelos de rata y ratón (Ennaceur 2018). Otra diferencia relevante entre ratas y pulpos es la presencia de una madriguera durante el ensayo, que se utiliza para evitar el estrés de los ejemplares y conseguir una correcta habituación. Esta guarida provoca en los animales un comportamiento particular en el que aumenta la latencia para explorar y una vez finalizada la exploración de los objetos vuelven a descansar en su guarida. Aunque esta es una diferencia importante entre la tarea en el modelo murino y los pulpos, no influye en la capacidad de evaluar la memoria del objeto familiar, ya que forma parte del contexto durante toda la prueba. En cuanto al tiempo de exploración, el tiempo total de exploración de los especímenes adultos disminuyó significativamente durante la fase de prueba. Si bien en el modelo murino esto normalmente representaría un problema de falta de motivación o motricidad durante la fase de prueba, en *O. maya* se puede explicar teniendo en cuenta que los ejemplares volvieron a su posición de reposo en la guarida, una vez finalizada la exploración de los objetos. Durante la fase de prueba no siempre se exploraba el objeto familiar, provocando que el tiempo total de exploración de ambos objetos se redujera, ya que en este lapso los animales casi solo invertían el tiempo para explorar el objeto novedoso y no en el familiar.

Efecto de la cicloheximida en la memoria de reconocimiento de *O. maya*.

La administración de cicloheximida en los ejemplares adultos provocó una exploración similar entre el objeto novedoso y familiar, a diferencia del grupo sham que mostró un alto índice de reconocimiento, 24h posteriores a la familiarización de los objetos. Esto puede considerarse como un indicador que en los pulpos la memoria a largo plazo del objeto familiar requiere de la síntesis de proteínas, por lo que presentaría una fase de consolidación de la memoria. Este resultado es similar a lo observado por Agin et al. (2003) en sepias durante una tarea de ataque a presa dentro de un tubo transparente. En este paradigma el animal aprende a inhibir la respuesta de ataque después de los primeros intentos fallidos de atrapar la presa inaccesible por el tubo transparente. Este aprendizaje puede evaluarse a corto y largo plazo y se observó que la administración de cicloheximida inhibía la memoria a largo plazo. Dentro del phylum mollusca, se ha observado un resultado similar en caracoles de la especie *Helix pomatia* (Nikitin et al. 2019).

Estructuras del cerebro posiblemente relacionadas con la memoria de reconocimiento.

Con respecto a las estructuras que participan durante el paradigma de RON, en vertebrados, RON se ha asociado con la actividad del hipocampo, la corteza insular, la corteza perirrinal y la corteza prefrontal medial (Tanimizu et al. 2017; Rossato et al. 2019; Cinalli et al. 2020). Aunque ningún invertebrado tiene tales estructuras, incluidos los pulpos como *O. maya*, esta y probablemente otras especies de pulpos muestran una convergencia evolutiva con los vertebrados en la capacidad de recordar un objeto familiar. Algunas estructuras del cerebro central de los pulpos se han relacionado con tareas de memoria y se ha buscado similitud entre estas y las estructuras del cerebro de los vertebrados, en particular se ha comparado su lóbulo vertical con el hipocampo de los vertebrados (Shomrat et al. 2015; Shigeno y Ragsdale 2015; Shigeno et al. 2018). Si bien esta comparación ayuda a tratar de comprender qué sucede en el cerebro del pulpo, a partir de nuestro conocimiento en otros grupos más estudiados, podría ser importante considerar la conformación del sistema completo, en lugar de una similitud de cada estructura. Esto permitiría encontrar las características mínimas y necesarias de un sistema nervioso para que surjan las capacidades que estudiamos, en este caso la memoria de reconocimiento de objeto.

Históricamente, para integrar el conocimiento de cómo funciona el cerebro del pulpo se realizaron estudios dividiendo la región supraesofágica del cerebro del pulpo en dos sistemas; uno que incluye el lóbulo vertical y el lóbulo superior frontal (VL-SF) responsables de las tareas de memoria visual, y otro que involucra el lóbulo bucal y el lóbulo frontal inferior (Bu-IF), responsables de las tareas de memoria somatosensorial (Wells y Young 1975). Esta división es útil a la hora de evaluar tareas como discriminación visual (Sutherland 1962; Tomita et al. 2014) o condicionamiento del miedo (Shomrat et al. 2008). Sin embargo, en los resultados de este trabajo queda claro que durante la tarea RON, *O. maya* utiliza la exploración visual y táctil. En consecuencia, esta tarea posiblemente involucre a ambos sistemas, el VL-SF y el Bu-IF. Esto está respaldado por las observaciones histológicas presentadas aquí y por previos autores (Jung et al. 2018), que soportan la existencia de una conexión neuronal entre el lóbulo frontal superior y el lóbulo frontal inferior directamente y a través del lóbulo subfrontal.

De verificarse, esto plantea un sustrato físico para la conectividad de los posibles sistemas que se requieren para que *O. maya* recuerde el objeto familiar. Además, permite proponer una serie de experimentos para corroborar si estos sistemas participan en la memoria de reconocimiento y cuál sería el papel que estarían jugando las diferentes estructuras del cerebro durante RON. Sería interesante ver si la exploración visual es esencial para RON en *O. maya*, ya que como se ve en este estudio, una vez que el pulpo se familiariza con los objetos, prácticamente no requiere exploración táctil para reconocerlos.

El presente estudio apoya la idea de una convergencia evolutiva entre vertebrados y *O. maya* (y muy probablemente otras especies de pulpos). La idea de convergencia evolutiva entre pulpos y vertebrados ha sido previamente propuesta; a nivel de organización neuronal y plasticidad sináptica, entre el LV de pulpos y el hipocampo de mamíferos (Hochner et al. 2006); en cuanto al número de neuronas y complejidad del cerebro entre pulpos y peces (Packard 2006); y a nivel de conducta, al compartir la capacidad de aprendizaje condicionado (Mather & Kuba 2013; Zarella et al. 2015). Sin embargo, esta última ha sido criticada pues ha resultado difícil replicar los experimentos de condicionamiento operante, principalmente por la falta de motivación o de estímulos adecuados para la especie (Boal 1996; Hochner et al. 2006). Los resultados de este trabajo apoyan la convergencia evolutiva entre pulpos y

vertebrados a nivel conductual a través de una tarea comparable que permitiría el reconocimiento de objetos novedosos con sistemas nerviosos completamente distintos. Esencialmente, esta tarea se puede evaluar de manera casi idéntica entre ambos grupos y abre la oportunidad de comparar los procesos fisiológicos que la sustentan, como la plasticidad neuronal, la síntesis de proteínas y ARN, la participación de diferentes factores de transcripción y sistemas de estructuras cerebrales que la componen, entre otros. Este trabajo servirá para nuevas investigaciones sobre el sistema nervioso de los cefalópodos, particularmente para aumentar el conocimiento neurobiológico sobre *O. maya*, lo que, junto con la ventaja de ser una especie criada en cautiverio, adiciona elementos para justificar su uso en estudios sobre cognición en cefalópodos.

Conclusiones

- *Octopus maya* puede discriminar un objeto familiar de uno novedoso, al menos desde los dos meses de vida.
- Primera vez que se describe exitosamente la prueba de Reconocimiento de Objeto Novedoso en invertebrados.
- Se propone a la exploración táctil como principal parámetro a medir para evaluar la discriminación.
- La cicloheximida interfiere con la memoria a largo plazo del reconocimiento de objeto.
- Se da evidencia inicial de la presencia de una fase de consolidación de la memoria a largo plazo en *Octopus*, dependiente de síntesis de proteínas.
- A las cuatro semanas de edad no todos los ejemplares de *O. maya* pueden discriminar el objeto novedoso del familiar, probablemente debido a la respuesta refleja de ataque.
- El cerebro central de *O. maya* se conforma de al menos 30 lóbulos, ampliamente interconectados. Similares a los descritos para *O. vulgaris* y *O. minor*.

Referencias

1. Agin, V., Chichery, R., Maubert, E., & Chichery, M.-P. (2003). Time-dependent effects of cycloheximide on long-term memory in the cuttlefish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(1), 141–146. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(03\)00041-8](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(03)00041-8)
2. Alberini, C. (2008). The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. *Neurobiology of learning and memory*, 89(3), 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.007>
3. Alberini, C., & Kandel, E. (2014). The Regulation of Transcription in Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a021741. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021741>
4. Alberini, C. M., & Ledoux, J. E. (2013). Memory reconsolidation. *Current biology : CB*, 23(17), R746–R750. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.06.046>
5. Barker, G., & Warburton, E. (2008). NMDA receptor plasticity in the perirhinal and prefrontal cortices is crucial for the acquisition of long-term object-in-place associative memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(11), 2837–2844. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4447-07.2008>
6. Billard, P. Clayton, N. Jozet-Alves, C. (2020). Cuttlefish retrieve whether they smelt or saw a previously encountered item. *Scientific Reports*. 10. 5413. 10.1038/s41598-020-62335-x.
7. Blaser, R., & Heyser, C. (2015). Spontaneous object recognition: a promising approach to the comparative study of memory. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 9, 183. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00183>
8. Boal, J. G. (1996). A review of simultaneous visual discrimination as a method of training octopuses. *Biological Reviews*, 71(2), 157–190. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1996.tb00746.x>

9. Boal, J., Dunham, A., Williams, K., & Hanlon, R. (2000). Experimental evidence for spatial learning in octopuses (*Octopus bimaculoides*). *Journal of Comparative Psychology*, 114(3), 246–252. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.114.3.246>
10. Borrelli, L., Chiandetti, C., & Fiorito, G. (2020). A standardized battery of tests to measure *Octopus vulgaris*' behavioural performance. *Invertebrate Neuroscience*, 20(1). <https://doi.org/10.1007/s10158-020-0237-7>
11. Bublitz, A., Weinhold, S., Strobel, S., Dehnhardt, G., & Hanke, F. (2017). Reconsideration of Serial Visual Reversal Learning in Octopus (*Octopus vulgaris*) from a Methodological Perspective. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00054>
12. Chen, D., Bambah-Mukku, D., Pollonini, G., and Alberini, C. (2012). Glucocorticoid receptors recruit the CaMKII alpha-BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. *Nat.Neurosci.* 15, 1707–1714.doi: 10.1038/nn.3266
13. Chung, W., Kurniawan, N., & Marshall, N. (2022). Comparative brain structure and visual processing in octopus from different habitats. *Current Biology*, 32(1), 97-110.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.10.070>
14. Cinalli Jr., D., Cohen, S., Guthrie, K., Stackman Jr., R. (2020). Object Recognition Memory: Distinct Yet Complementary Roles of the Mouse CA1 and Perirhinal Cortex. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.527543>
15. De Houwer, J., Barnes-Holmes, D., Moors, A. (2013). What is learning? On the nature and merits of a functional definition of learning. *Psychonomic Bulletin & Review*, 20(4), 631–642. <https://doi.org/10.3758/s13423-013-0386-3>
16. Di Cosmo, A., Pinelli, C., Scandurra, A., Aria, M., & D'Aniello, B. (2021). Research Trends in Octopus Biological Studies. *Animals*, 11(6), 1808. <https://doi.org/10.3390/ani11061808>
17. Dickel, Ludovic & Darmaillacq, AS & Poirier, Roseline & Agin, V. (2005). Behavioral and neural maturation in the cuttlefish *Sepia Officinalis*. *Vie et Milieu*. 56. 89-95.

18. Ennaceur A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural brain research*, 215(2), 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>
19. Ennaceur, A. (2018). Object Novelty Recognition Memory. *Handbook of Object Novelty Recognition*, 1–22. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812012-5.00001-x>
20. Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural brain research*, 31(1), 47–59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-x](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-x)
21. Fiorito, G., Affuso, A., Basil, J., Cole, A., de Girolamo, P., D’Angelo, L., Dickel, L., Gestal, C., Grasso, F., Kuba, M., Mark, F., Melillo, D., Osorio, D., Perkins, K., Ponte, G., Shashar, N., Smith, D., Smith, J., & Andrews, P. (2015). Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research –A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. *Laboratory Animals*, 49(2_suppl), 1–90. <https://doi.org/10.1177/0023677215580006>
22. Fuss T., Bleckmann H., Schluessel V. (2014). Visual discrimination abilities in the gray bamboo shark (*Chiloscyllium griseum*). *Zoology (Jena)* 117, 104–111. [10.1016/j.zool.2013.10.009](https://doi.org/10.1016/j.zool.2013.10.009)
23. Giuditta, A., & Prozzo, N. (1974). Postembryonic growth of the optic lobe of *Octopus Vulgaris*, lam. *The Journal of Comparative Neurology*, 157(2), 109–116. <https://doi.org/10.1002/cne.901570202>
24. Gutnick, T., Kuba, M. J., & Di Cosmo, A. (2022). Neuroecology: Forces that shape the octopus brain. *Current Biology*, 32(3), R131–R135. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.12.047>
25. Hanlon, R. & Forsythe, J. (1985). Advances in the laboratory culture of Octopus for biomedical research. *Laboratory animal science*. 35. 33-40.
26. Hodgkin, A., & Huxley, A. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4), 500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
27. Hochner, B., Shomrat, T., & Fiorito, G. (2006). The Octopus: A Model for a Comparative Analysis of the Evolution of Learning and Memory Mechanisms. *The Biological Bulletin*, 210(3), 308–317. <https://doi.org/10.2307/4134567>

28. Inda, M., Muravieva, E., & Alberini, C. (2011). Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(5), 1635–1643. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4736-10.2011>
29. Jarome, T. & Helmstetter, F. (2014). Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00061>
30. Johansen, Joshua P., Cain, Christopher K., Ostroff, Linnaea E., & LeDoux, Joseph E. (2011). Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory. *Cell*, 147(3), 509–524. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.009>
31. Josselyn, S., Köhler, S., & Frankland, P. (2015). Finding the engram. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(9), 521–534. <https://doi.org/10.1038/nrn4000>
32. Juárez, O., Rosas, C., & Arena-Ortiz, M. (2012). Phylogenetic relationships of *Octopus maya* revealed by mtDNA sequences. *Ciencias Marinas*, 38(3), 563–575. <https://doi.org/10.7773/cm.v38i3.1962>
33. Jung, S. H., Song, H. Y., Hyun, Y. S., Kim, Y. C., Whang, I., Choi, T. Y., & Jo, S. (2018). A Brain Atlas of the Long Arm Octopus, *Octopus minor*. *Experimental neurobiology*, 27(4), 257–266. <https://doi.org/10.5607/en.2018.27.4.257>
34. Kandel, Eric R., Dudai, Y., & Mayford, Mark R. (2014). The Molecular and Systems Biology of Memory. *Cell*, 157(1), 163–186. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>
35. Kania, B. F., Wrońska, D., & Zięba, D. (2017). Introduction to Neural Plasticity Mechanism. *Journal of Behavioral and Brain Science*, 07(02), 41–49. <https://doi.org/10.4236/jbbs.2017.72005>
36. Kart-Teke, E., De Souza Silva, M., Huston, J., & Dere, E. (2006). Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiology of learning and memory*, 85(2), 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.10.002>
37. Kelman, E., Osorio, D., Baddeley, R. (2008). A review of cuttlefish camouflage and object recognition and evidence for depth perception. *The Journal of experimental biology*. 211. 1757-63. [10.1242/jeb.015149](https://doi.org/10.1242/jeb.015149).

38. Korte, M. (2013) Cellular correlates of learning and memory. In *Neurosciences – From Molecule to Behaviour: A University Textbook*. (Calizia, C.G. and Lledo, P.-M., eds), pp. 577-608, Springer-Verlag
39. Krashes, M., & Waddell, S. (2008). Rapid Consolidation to a radish and Protein Synthesis-Dependent Long-Term Memory after Single-Session Appetitive Olfactory Conditioning in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 28(12), 3103–3113. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5333-07.2008>
40. Lagasse, F., Devaud, J.-M., & Mery, F. (2009). A Switch from Cycloheximide-Resistant Consolidated Memory to Cycloheximide-Sensitive Reconsolidation and Extinction in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 29(7), 2225–2230. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3789-08.2009>
41. Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature protocols*, 8(12), 2531–2537. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>
42. Liu, Y., Liu, T., Su, C., & Chiao, C. (2017). Neural Organization of the Optic Lobe Changes Steadily from Late Embryonic Stage to Adulthood in Cuttlefish *Sepia pharaonica*. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00538>
43. Lueptow L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (126), 55718. <https://doi.org/10.3791/55718>
44. Lynch M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological reviews*, 84(1), 87–136. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2003>
45. Macias-Silva, M., Vazquez-Victorio, G., & Hernandez-Damian, J. (2010). Anisomycin is a Multifunctional Drug: More than Just a Tool to Inhibit Protein Synthesis. *Current Chemical Biology*, 4(2), 124–132. <https://www.eurekaselect.com/article/38844>
46. Mather, J. (1991). Navigation by spatial memory and use of visual landmarks in octopuses. *Journal of Comparative Physiology A*, 168(4), 491–497. <https://doi.org/10.1007/bf00199609>

47. Mather, J., & Alupay, J. (2016). An ethogram for Benthic Octopods (Cephalopoda: Octopodidae). *Journal of comparative psychology* (Washington, D.C. : 1983), 130(2), 109–127. <https://doi.org/10.1037/com0000025>
48. A. Mather, & J. Kuba (2013). *The cephalopod specialties: complex nervous system, learning, and cognition I*. *Canadian Journal of Zoology*; <https://www.semanticscholar.org/paper/The-cephalopod-specialties%3A-complex-nervous-system%2C-MatherJennifer-KubaMichael/93b889fca32c16733ce9665708c75110473d50d7>
49. Mathiasen, J., & DiCamillo, A. (2010). Novel Object Recognition in the Rat: A Facile Assay for Cognitive Function. *Current Protocols in Pharmacology*, 49(1). <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0559s49>
50. Mcgaugh, J. (2000). Memory-a Century of Consolidation. *Science* (New York, N.Y.). 287. 248-51. [10.1126/science.287.5451.248](https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248).
51. Menzel, R. (2022). In Search for the Retrievable Memory Trace in an Insect Brain. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2022.876376>
52. Merlo, S., Santos, M., Pedreira, M., & Merlo, E. (2020). Identification of a Novel Retrieval-dependent Memory Process in the Crab *Neohelice granulata*. *Neuroscience*, 448, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.09.035>
53. Nakajima, R., Shigeno, S., Zullo, L., De Sio, F., & Schmidt, M. R. (2018). Cephalopods Between Science, Art, and Engineering: A Contemporary Synthesis. *Frontiers in Communication*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcomm.2018.00020>
54. Nikitin, V., Solntseva, S., & Nikitin, P. (2019). Protein synthesis inhibitors induce both memory impairment and its recovery. *Behavioural Brain Research*, 360, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.11.046>
55. Packard, a. (1972). Cephalopods and fish: the limits of convergence. *Biological Reviews*, 47(2), 241–307. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1972.tb00975.x>
56. Pedreira, M., Dimant, B., Tomsic, D., Quesada-Allue, L., & Maldonado, H. (1995). Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52(2), 385–395. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00124-f](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00124-f)

57. Penzo, M., Robert, V., Tucciarone, J., De Bundel, D., Wang, M., Van Aelst, L., Darvas, M., Parada, L., Palmiter, R., He, M., Huang, Z., & Li, B. (2015). The paraventricular thalamus controls a central amygdala fear circuit. *Nature*, 519(7544), 455–459. <https://doi.org/10.1038/nature13978>
58. Rajalingham, R., Schmidt, K., & DiCarlo, J. (2015). Comparison of Object Recognition Behavior in Human and Monkey. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(35), 12127–12136. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0573-15.2015>
59. Rodríguez-Serna, M., & Carmona-Osalde, C. (2022). Crecimiento y supervivencia de crías de pulpo (*Octopus maya*): alimentados con dietas inertes bajo condiciones de laboratorio en Yucatán, México. *Hidrobiológica*, 18(3), 209–214. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972008000300004
60. Rosas, C. Gallardo, P. Mascaró, M. Caamal-Monsreal, C. Pascual, C. (2014). Octopus Maya. *Cephalopod Culture*. 383-396. 10.1007/978-94-017-8648-5_20.
61. Rossato, J., Gonzalez, M., Radiske, A., Apolinário, G., Conde-Ocazonez, S., Bevilaqua, L., & Cammarota, M. (2019). PKM ζ Inhibition Disrupts Reconsolidation and Erases Object Recognition Memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(10), 1828–1841. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2270-18.2018>
62. Schacter, D., Eich, J., & Tulving, E. (1978). Richard Semon's theory of memory. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior*, 17(6), 721–743. [https://doi.org/10.1016/s0022-5371\(78\)90443-7](https://doi.org/10.1016/s0022-5371(78)90443-7)
63. Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W., Green, R., Shen, B., & Liu, J. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature chemical biology*, 6(3), 209–217. <https://doi.org/10.1038/nchembio.304>
64. Schwabe, L., Joëls, M., Roozendaal, B., Wolf, O., & Oitzl, M. (2012). Stress effects on memory: an update and integration. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 36(7), 1740–1749. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.002>

65. Shigeno, S., Andrews, P., Ponte, G., & Fiorito, G. (2018). Cephalopod Brains: An Overview of Current Knowledge to Facilitate Comparison With Vertebrates. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00952>
66. Shigeno, S., Tsuchiya, K., & Segawa, S. (2001). Embryonic and paralarvae development of the central nervous system of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana*. *The Journal of Comparative Neurology*, 437(4), 449–475. <https://doi.org/10.1002/cne.1295>
67. Shigeno, S. & Ragsdale, C. (2015). The gyri of the octopus vertical lobe have distinct neurochemical identities: Compartments in octopus frontal-vertical system. *Journal of Comparative Neurology*. 523. [10.1002/cne.23755](https://doi.org/10.1002/cne.23755).
68. Shomrat, T., Zarrella, I., Fiorito, G., Hochner, B. (2008). The Octopus Vertical Lobe Modulates Short-Term Learning Rate and Uses LTP to Acquire Long-Term Memory. *Current biology : CB*. 18. 337-42. [10.1016/j.cub.2008.01.056](https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.056).
69. Shomrat, T., Zarrella, I., Fiorito, G., Hochner, B. (2008). The octopus vertical lobe modulates short-term learning rate and uses LTP to acquire long-term memory. *Current biology : CB*, 18(5), 337–342. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.056>
70. Solvi, C., Gutierrez Al-Khudhairy, S., & Chittka, L. (2020). Bumble bees display cross-modal object recognition between visual and tactile senses. *Science*, 367(6480), 910–912. <https://doi.org/10.1126/science.aay8064>
71. Spetch, M. & Friedman, A. (2006). Pigeons see correspondence between objects and their pictures. *Psychological science*, 17(11), 966–972. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9280.2006.01814.x>
72. Stöwe, M., Bugnyar, T., & Loretto, M., Schloegl, C., Range, F., Kotrschal, K. (2006). Novel object exploration in ravens (*Corvus corax*): Effects of social relationships. *Behavioural processes*. 73. 68-75. [10.1016/j.beproc.2006.03.015](https://doi.org/10.1016/j.beproc.2006.03.015).
73. Sutherland, N. (1962). Visual discrimination of shape by Octopus: Squares and crosses. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 55(6), 939–943. <https://doi.org/10.1037/h0040049>
74. Tanimizu, T., Kenney, J. W., Okano, E., Kadoma, K., Frankland, P., & Kida, S. (2017). Functional Connectivity of Multiple Brain Regions Required for the Consolidation of Social Recognition Memory. *The Journal of neuroscience : the*

- official journal of the Society for Neuroscience, 37(15), 4103–4116.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3451-16.2017>
75. Tokuda, K., Masuda, R., & Yamashita, Y. (2014). Conditional discrimination in Octopus vulgaris. *Journal of Ethology*, 33(1), 35–40. <https://doi.org/10.1007/s10164-014-0414-4>
76. Tomita, M. Aoki, S. (2014). Visual Discrimination Learning in the Small Octopus Octopus ocellatus. *Ethology*. 120. 10.1111/eth.12258
77. Toms C., Echevarria D. (2014). Back to basics: searching for a comprehensive framework for exploring individual differences in zebrafish (Danio rerio) behavior. *Zebrafish* 11, 325–340. 10.1089/zeb.2013.0952
78. Tronson, N., & Taylor, J. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(4), 262–275. <https://doi.org/10.1038/nrn2090>
79. Turchetti-Maia, A., Stern-Mentch, N., Bidel, F., Nesher, N., Shomrat, T., Hochner, B. (2018). A novel NO-dependent "molecular-memory-switch" mediates presynaptic expression and postsynaptic maintenance of LTP in the octopus brain. 10.1101/491340.
80. Van Heukelem, W. 1976 Growth, bioenergetics and life-span of Octopus cyanea and Octopus maya. University of Hawaii at Manoa.
81. Vergara-Ovalle, F., Ayala-Guerrero, F., Rosas, C., & Sanchez-Castillo, H. (2022). Novel Object Recognition in Octopus Maya. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1439375/v1>
82. Villar, M., Marchal, P., Viola, H., & Giurfa, M. (2020). The Author(s). *Cell Reports*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.086>
83. Voss, G., Solís Ramírez, M. (1966). Octopus maya, a new species from the Bay of Campeche, Mexico. *Bulletin of Marine Science*. 16(3), 615-625
84. Walker, J., Longo, N., & Bitterman, M. (1970). The octopus in the laboratory. Handling, maintenance, training. *Behavior Research Methods & Instrumentation*, 2(1), 15
85. Wells, M. Young, J. (1975). The subfrontal lobe and touch learning in the octopus. *Brain research*, 92(1), 103–121. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90530-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90530-2)

86. Wittstock, S., Kaatz, H., & Menzel, R. (1993). Inhibition of brain protein synthesis by cycloheximide does not affect formation of long-term memory in honeybees after olfactory conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 13(4), 1379–1386. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-04-01379.1993>
87. Wu, J., Tai, C., Feng, K., Chen, S., Chen, C., & Chiang, A. (2017). Long-term memory requires sequential protein synthesis in three subsets of mushroom body output neurons in *Drosophila*. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07600-2>
88. Yamamoto, M., Shimazaki, Y., & Shigeno, S. (2003). Atlas of the Embryonic Brain in the Pygmy Squid, *Idiosepius paradoxes*. *Zoological Science*, 20(2), 163–179. <https://doi.org/10.2108/zsj.20.163>
89. Yamazaki, A., Yoshida, M., & Uematsu, K. (2002). Post-Hatching Development of the Brain in *Octopus ocellatus*. *Zoological Science*, 19(7), 763–771. <https://doi.org/10.2108/zsj.19.763>
90. Young JZ (1971): The anatomy of the brain of *Octopus vulgaris*. Oxford: Clarendon Press.
91. Zarrella, I., Ponte, G., Baldascino, E., & Fiorito, G. (2015). Learning and memory in *Octopus vulgaris*: a case of biological plasticity. *Current opinion in neurobiology*, 35, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.06.012>

Anexo. Tabla 1

Lóbulo	Abreviatura	Tipos celulares
Vertical	LV	Gliales, Pequeñas amacrinas; pocas neuronas largas
Vertical medial	LVm	Gliales, Pequeñas amacrinas; pocas neuronas largas
vertical lateral	LVI	Gliales, Pequeñas amacrinas; pocas neuronas largas
Subvertical Anterior	SubVa	Neuronas largas, gliales, piramidales; axons del SFL
Subvertical Posterior	SubVp	Neuronas largas, gliales, piramidales; Cuerpos celulares que conectan con entradas del LV
Superior Frontal	SF	Neuronas largas, gliales, piramidales y amacrinas grandes
Inferior Frontal	IF	Neuronas largas, grandes y pequeñas
SubFrontal/posteriorFrontal	SubF	Neuronas pequeñas y grandes, gliales
Bucal	Bu	Neuronas pequeñas y grandes, gliales
Post Bucal	BuP	Neuronas pequeñas y grandes, gliales
Dorsal Basal Anterior	BaDa	Neuronas largas, grandes y pequeñas con axones fusionados, neuronas multipolares pequeñas, glía
Dorsal Basal Posterior	BaDp	Neuronas largas, grandes y pequeñas con axones fusionados, neuronas multipolares pequeñas, glía
Basal Anterior	BaA	Neuronas largas, grandes y pequeñas con axones fusionados, neuronas multipolares pequeñas, glía
Basal Medial	BaM	Neuronas largas, grandes y pequeñas con axones fusionados, neuronas multipolares pequeñas, glía
Basal Lateral	BaL	Neuronas largas, grandes y pequeñas con axones fusionados, neuronas multipolares pequeñas, glía
Precomisural	Precom	Neuronas pequeñas y grandes, gliales
PreBraquial	PreBra	Neuronas largas, grandes y pequeñas con axones fusionados, neuronas multipolares pequeñas, glía, sincitio funcional
PosBraquial	PosBra	Neuronas largas, grandes y pequeñas con axones fusionados, neuronas multipolares pequeñas, glía
Pedal Anterior	PeA	Células amacrinas grandes, piramidales y grandes
Pedal Posterior	PeP	Células amacrinas grandes, piramidales y grandes
Palio Visceral	PV	Largas, piramidales y gliales
Sifón	Sif	Neuronas con cuerpos celulares muy grandes, baja densidad celular, disposición en "panal de abeja" y algunas células pequeñas en la base
Ventral Vasomotor	VenVas	Neuronas con cuerpos celulares muy grandes, baja densidad celular, disposición en "panal de abeja" y algunas células pequeñas en la base

Medial Vasomotor	VasM	Neuronas con cuerpos celulares muy grandes, baja densidad celular, disposición en "panal de abeja" y algunas células pequeñas en la base
Interbasal	Iba	Grandes neuronas con axones entrelazados como un "ramo", alta densidad celular
Cromatoforo Posterior	ChP	Grandes neuronas con axones entrelazados como un "ramo", alta densidad celular
Magnocelular dorsal	Mgd	Grandes neuronas con axones entrelazados como un "ramo", alta densidad celular
Magnocelular posterior	Mgp	Grandes neuronas con axones entrelazados como un "ramo", alta densidad celular
Olfactorio	Olf	Neuronas con citoplasma amplio, forma cuboidal, baja densidad celular
Peduncular	Ped	Pequeñas neuronas, alta densidad celular
Óptico	Opt	Neuronas amacrinias, muestra una capa de neuronas largas con proyecciones axonales entre perikarion y neuropil, alta densidad de somas en neuropilo
Glándula Óptica	Gopt	Alta densidad celular, sin neuropilo, alta densidad de proyecciones axonales interconectadas
Tracto Óptico	TrOpt	
Nervio Óptico	nOpt	
Nervio Braquial 1-8	nBra 1-8	
Nervio Sifón anterior	nSifa	
Nervio Sifón posterior	nSifp	
Nervio Paliar	nPa	
Nervio Visceral	nVis	
Nervio Bucal	nBu	
Nervio Orbital Anterior	nAntorb	
Conexión Cerebro-braquial	Con Cer.Bra	
Conexión Pedal-Basal Anterior	Con Pe-Baa	
Conexión Pedal-Basal Posterior	Con Pe-Bap	
Conexión Paliovisceral-Basal	Con PV-Ba	
Conexión Paliovisceral-Braquial	Con Bra-PV	