

Tesis de Posgrado

Modulación opiácea de la percepción nociceptiva durante la habituación a un estímulo de peligro en el cangrejo *chasmagnathus granulatus* : correlatos ecológicos y posible valor adaptativo

Tomsic, Daniel

1993

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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

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

Cita tipo APA:

Tomsic, Daniel. (1993). Modulación opiácea de la percepción nociceptiva durante la habituación a un estímulo de peligro en el cangrejo *chasmagnathus granulatus* : correlatos ecológicos y posible valor adaptativo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2571_Tomsic.pdf

Cita tipo Chicago:

Tomsic, Daniel. "Modulación opiácea de la percepción nociceptiva durante la habituación a un estímulo de peligro en el cangrejo *chasmagnathus granulatus* : correlatos ecológicos y posible valor adaptativo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2571_Tomsic.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MODULACION OPIACEA DE LA PERCEPCION
NOCICEPTIVA DURANTE LA HABITUACION A UN
ESTIMULO DE PELIGRO EN EL CANGREJO
CHASMAGNATHUS GRANULATUS. CORRELATOS
ECOLOGICOS Y POSIBLE VALOR ADAPTATIVO.

Autor: Lic. DANIEL TOMSIC
Director: Dr. HECTOR MALDONADO

LABORATORIO DE FISIOLOGIA DEL COMPORTAMIENTO ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

1993

Tesis
2571
y/2.

Resumen

Se ha postulado que la morfina inhibe la respuesta de escape a un estímulo visual de peligro en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus* debido a una acción a nivel central, y que durante la habituación a dicho estímulo, se activaría un sistema opiáceo endógeno que modularía negativamente la respuesta. La viabilidad de la hipótesis de la acción central moduladora fue analizada en una serie de experimentos, en los que se usó como indicador, además de la respuesta de escape, la respuesta optomotora, es decir, un comportamiento inducido por un estímulo que "no" señala peligro; y como droga inhibidora, además de la morfina, el aminoácido GABA, es decir, un inhibidor "periférico" de la actividad motora. Las mayores dosis de morfina con claro efecto inhibidor sobre la respuesta de escape no afectaron la respuesta optomotora, excluyendo así la posibilidad de explicar la acción de la droga sobre la primera respuesta, en términos de efecto detrimental sobre la referencia visual o sobre la capacidad motora. Una dosis de 75 µg/g de morfina, administrada 30 min. antes de una sesión de entrenamiento habituante al estímulo de peligro, produjo un descenso paralelo de la curva de habituación, conforme con lo que debería esperarse si la droga tuviese una acción moduladora negativa sobre la respuesta. Dosis pre-entrenamiento de 100 µg/g de morfina o de 9 µg/g de GABA, redujeron drásticamente la reactividad durante la sesión de habituación, pero mientras la administración de morfina impidió la adquisición de la habituación de largo término, la de GABA no afectó esa adquisición. Este resultado apoya la idea de que el efecto de la morfina se debe a una interferencia transitoria entre el estímulo y su significado innato de peligro.

Para investigar el posible valor adaptativo de la gran propensión de *Chasmagnathus* a adquirir rápidamente una habituación por largo tiempo, así como el del sistema opiáceo endógeno que la asistiría, se estudió y comparó su comportamiento con el de *Pachygrapsus marmoratus*, una especie filogenéticamente cercana pero ecológicamente distante. Los resultados indicaron que *Chasmagnathus* posee una capacidad mucho mayor para habituarse que *Pachygrapsus*, mostrando una habituación de corto término más profunda, parcialmente mediada por una modulación opiácea endógena, y una habituación de largo término más rápida y duradera, parcialmente mediada por la representación mnésica de las claves del contexto. Se estudió también la capacidad para adquirir una habituación de largo término en cangrejos de la misma especie pero de diferentes edades, demostrándose que los animales viejos exhiben una retención de la habituación claramente menor que los animales más jóvenes. El valor adaptativo de estas diferencias es discutido en consideración a las presiones ecológicas a las que se encuentra sometida cada especie, y a la correlación entre los cambios dependientes de la edad y un cambio ontogénico de hábitat y de actividad exploratoria.

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

CENTRAL EFFECT OF MORPHINE PRETREATMENT ON SHORT- AND LONG-TERM HABITUATION TO A DANGER STIMULUS IN THE CRAB *CHASMAGNATHUS*. Tomsic D. y Maldonado H. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 36, pp.: 787-793.

MORPHINE AND GABA: EFFECT ON PERCEPTION, ESCAPE RESPONSE AND LONG-TERM HABITUATION TO A DANGER STIMULUS IN THE CRAB *CHASMAGNATHUS*. Tomsic D., Maldonado H. y Rakitin A. *Brian Research Bulletin*, vol. 26, pp.: 699-706.

HABITUATION TO A DANGER STIMULUS IN TWO SEMITERRESTRIAL CRABS. ONTOGENIC, ECOLOGICAL AND OPIOID MODULATION CORRELATES. Tomsic D., Massoni V. y Maldonado H. *Journal of Comparative Physiology A*, (en prensa).

A Vivi

Por ser el final de mi búsqueda.

Quiero agradecer:

A mis padres, por su amor, comprensión y apoyo.

Al Doctor Héctor Maldonado, por un sinnúmero de razones que pueden resumirse en una profunda y sincera admiración.

A mis compañeros de trabajo: Angel Vidal, Arturo Romano, Beatriz Dimant, Gabriela Hermitte, Mariana Lozada, Eugenia Pedreira y Juan Aggio, por la alegría con que compartimos estos años de investigación.

A Mely, Andy y Alex, por ser la esperanza de un futuro siempre mejor.

A mis amigos, por el cariño.

A Vivi, por el amor.

INDICE

Pág. No

CAPITULO I

Introducción	1
_Estudio del comportamiento	1
Niveles de causalidad	1
Métodos de campo y de laboratorio	3
_Habituaación	5
Definición y formas de estudio	5
Habituaación de la respuesta de escape	12
_Biología de la nocicepción	14
Definiciones	14
Neuromodulación y Opiáceos	16
Analgesia inducida por estrés	19
_El cerebro de los decápodos	23
Organización estructural	23
Organización funcional	24
Escape ante estímulos visuales	27
_Chasmagnathus granulatus	30
El animal y su medio	30
Antecedentes experimentales	31
Hipótesis	35
Objetivos	37
Materiales y métodos generales	39
_Animales	39
_Aparatos	41
Cilindro optomotor	41
Universal	44
_Procedimientos experimentales	46
Reacción optomotora	46
Habituaación	47
_Drogas e inyecciones	48
_Estadística	49

CAPITULO II

Acción opiácea central	52
_Experimento 1	52
Método	53
Resultados y discusión	54
_Experimento 2	55
Método	56
Resultados y discusión	56

CAPITULO III

Efecto opiáceo modulador	59
_Experimento 3a	59
Método	60
Resultados y discusión	60
_Experimento 3b	61
Resultados y discusión	62

CAPITULO IV

Interferencia opiácea sobre el vínculo señal-significado	64
_Experimento 4	64
Método	66
Resultados y discusión	66
_Experimento 5	70
Método	70
Resultados y discusión	70
_Experimento 6	72
Método	72
Resultados y discusión	73
_Experimento 7	75
Método	76
Resultados y discusión	76
_Experimento 8	78
Método	79
Resultados y discusión	79

CAPITULO V

Especie-especificidad de la capacidad de habituación	83
_Experimento 9	84
Método	84
Resultados y discusión	85
_Experimento 10	86
Método	87
Resultados y discusión	87

CAPITULO VI

Relación de la edad con la capacidad de habituación	90
_Experimento 11	90
Método	90
Resultados y discusión	92

CAPITULO VII

Especie-especificidad de la modulación opiácea	98
_Experimento 12	100
Método	100
Resultados y discusión	100
_Experimento 13	100
Método	101
Resultados y discusión	101
_Experimento 14	102
Método	102
Resultados y discusión	103

CAPITULO VIII

Contexto-especificidad	105
_Experimento 15	106
Método	106
Resultados y discusión	107
_Experimento 16	109
Método	109
Resultados y discusión	110
_Experimento 17	111
Método	112
Resultados y discusión	112

CAPITULO IX

Discusión general	114
_Causas próximas: aspectos fisiológicos	114
_Causas últimas: aspectos evolutivos	119
_Un modelo de valor heurístico	130
Referencias	135

"Todos creemos vivir directamente inmersos en el mundo que nos rodea, sentir sus objetos y acontecimientos con precisión, y vivir en el tiempo real y ordinario. Afirmo que todo eso no es más que una ilusión perceptiva, dado que todos nosotros nos enfrentamos al mundo desde un cerebro que se halla conectado con lo que está <<ahí afuera>> a través de unos cuantos millones de frágiles fibras nerviosas sensoriales. Esos son nuestros únicos canales de información, nuestras líneas vitales con la realidad. Estas fibras nerviosas sensoriales no son registradoras de alta fidelidad, dado que acentúan ciertas características del estímulo, mientras que desprecian otras. La neurona central es un contador de historias, por lo que respecta a las fibras nerviosas aferentes, y nunca resulta completamente fiable, permitiendo distorsiones de cualidad y de medida en una relación espacial forzada aunque isomórfica entre <<fuera>> y <<dentro>>. La sensación es una abstracción, no una réplica, del mundo real."

V. B. Mountcastle, Johns Hopkins Med. J., 136: 109 (1975)

"Miramos hacia el pasado a través de millones incontables de años, y vemos la gran voluntad de vivir que lucha por salir del fango situado entre las mareas, que lucha de forma en forma y de poder en poder, que se arrastra por el suelo y luego camina con confianza sobre él, que lucha de generación en generación por dominar el aire, que se insinúa en las tinieblas de lo profundo; la vemos levantarse contra sí misma con rabia y hambre y cambiar su forma por otra nueva, contemplamos cómo se nos acerca y se hace más parecida a nosotros, cómo se expande, se elabora a sí misma, persigue su objetivo inexorable e inconcebible, hasta alcanzarnos al final y latir su ser a través de nuestros cerebros y nuestras arterias... Es posible creer que todo el pasado no es más que el principio de un principio, y que todo lo que es y ha sido es sólo el crepúsculo del alba. Es posible creer que todo lo conseguido por la mente humana no es sino el sueño antes del despertar... Surgirán... de nuestro linaje mentes que volverán su atención a nosotros en nuestra pequeñez y nos conocerán mejor de lo que nos conocemos nosotros. Llegará un día, un día en la sucesión infinita de días, en que seres, seres que están ahora latentes en nuestros pensamientos y escondidos en nuestros lomos, se erguirán sobre esta tierra como uno se yergue sobre un escabel y reirán y con sus manos alcanzarán las estrellas."

H. G. Wells, Nature, 65: 326 (1902)

CAPITULO I

INTRODUCCION

Estudio del comportamiento

Niveles de causalidad

Los fisiólogos suelen explicar los fenómenos biológicos en función de lo que podríamos llamar las causas próximas, esto es, los mecanismos subyacentes que median desde la información genómica hasta el fenómeno que se describe. Por otro lado, los científicos más interesados en el estudio de los procesos evolutivos tienden a explicar los mismos fenómenos en términos de causas últimas, es decir, refiriéndose a los mecanismos de adquisición de un genotipo a través de la selección natural. La falta de claridad en la distinción entre causas próximas y últimas ha provocado largas discusiones en relación a los orígenes del comportamiento. Así, por ejemplo, cuando un cangrejo construye su cueva, podemos explicar tal comportamiento en función de las contracciones musculares evocadas por los estímulos nerviosos generados en alguna parte del sistema nervioso central como respuesta a un estado motivacional y fisiológico inducido por estímulos internos o externos. Podemos aún ir más lejos y ahondar en los procesos bioquímicos y moleculares que tienen lugar para producir la transmisión nerviosa y la contracción muscular, y aún más allá... En otras palabras,

podríamos completar un panorama bastante acabado de los mecanismos inmediatos que dan lugar al fenómeno en estudio. Pero también podemos explicar el comportamiento de construcción de la cueva como el resultado de procesos de selección que han conducido al establecimiento de un genotipo de cangrejos constructores de cuevas en virtud de la ventaja adaptativa que tal comportamiento le confiere a la especie. Dentro de este marco explicativo son de importancia las consideraciones acerca de las ventajas que la posesión de una cueva le ofrecen al animal, tales como refugio contra predadores, condiciones ambientales adversas, enfrentamientos intraespecíficos, etc. Aunque con menos precisión, también en este nivel de análisis es posible alcanzar un considerable grado de comprensión de los mecanismos, ahora mediatos, que originan el comportamiento en estudio. Las causas próximas están referidas a la decodificación de los programas genéticos de un individuo; las causas últimas a los cambios de los programas genéticos a través del tiempo y a los motivos de esos cambios. Estos dos niveles de investigación demandan el empleo de métodos diferentes: para el estudio de los factores próximos, el experimento es la herramienta ideal; para el estudio de los factores últimos, el método comparativo es el más indicado.

Con respecto a la habituación, muchos autores se han ocupado de estudiar los niveles próximos y han logrado explicar algunos de los mecanismos que median este proceso de aprendizaje. Otros autores en cambio, han puesto su atención en la causalidad última, concentrándose sobre los cambios en la respuesta comportamental como consecuencia de modificaciones en el medio ambiente y en cómo, tales cambios, favorecerían la supervivencia. Sin embargo, como lo

señalan Peeke y Petrinovich (1984 pág.4), "ningún nivel de estudio es el nivel, y el resultado obtenido en cada uno de éstos debería utilizarse para desarrollar una visión causal completa de la naturaleza y la función de los cambios en la respuesta comportamental."

Métodos de campo y de laboratorio

Contribuciones fundamentales al conocimiento biológico tales como el concepto de evolución fueron realizadas por científicos naturalistas, cuyo principal instrumento consistió en la observación cuidadosa y detallada de la ocurrencia de hechos relevantes, en su medio natural. La identificación y correcta interpretación de tales acontecimientos requieren de gran pericia ya que un hecho relevante en sentido biológico no es necesariamente conspicuo ni frecuente.

La principal ventaja del **método de campo** radica en que el comportamiento a observar ocurre en su ambiente natural con una mínima intromisión del observador, es decir, sin la influencia de factores artificiales como es el caso del comportamiento de animales en cautiverio. Las variables que influyen el comportamiento, comprendidas las variables ecológicas, lo hacen en una combinación natural y ejerciendo su acción en los niveles en que normalmente actúan. Por lo tanto, si estas observaciones se realizan adecuadamente, proporcionan una base ideal para la formulación de hipótesis.

La mayor desventaja del **método de campo** radica en la

imposibilidad de controlar las variables actuantes y en la dificultad de estudiar una respuesta aislada o parte de una respuesta. Además, ciertas combinaciones de variables, cuyos efectos podría ser interesante analizar, a veces no ocurren con suficiente frecuencia en la naturaleza. Puede argüirse que, si el fenómeno tiene lugar de manera esporádica, éste carece de importancia. Sin embargo, la **respuesta** a un acontecimiento raro, como lo es el ataque certero de un predador, es uno de los eventos más importantes en la vida de un organismo, que puede marcar la diferencia entre sobrevivir o morir.

Los inconvenientes señalados para el método de observación en el campo son salvados, aunque perdiendo algunas de sus ventajas, por el uso del **método experimental en el laboratorio**. Las condiciones perfectamente controlables permiten al experimentador emplear las variables en la combinación deseada y centrar su atención sobre las características particulares de la respuesta que le interesa estudiar. En efecto, si se pretende aislar los procesos fisiológicos que subyacen a un comportamiento o se quiere entender cómo un estímulo físico es detectado, traducido y transmitido, dando origen a una respuesta, entonces el control que ofrece el laboratorio es esencial. Además, la correcta aplicación de los procedimientos de laboratorio proporciona una garantía para la reproducibilidad de los resultados, que hace de este método el ideal para la puesta a prueba de las hipótesis. Por ejemplo, si quisiéramos sopesar la validez de una propuesta teórica, podríamos organizar la combinación específica de estímulos que nos permitiese aceptarla o descartarla. En este sentido, los requisitos de la respuesta pueden ser manipulados para poner a prueba la hipótesis.

Habitación

Definición y formas de estudio

Thorpe, en la segunda edición de su *LEARNING AND INSTINCT IN ANIMALS* (1963) pasó revista a la extensa bibliografía sobre habitación en los diferentes phyla y propuso lo que hoy constituye la típica definición de habitación: *"...es la disminución relativamente permanente de la respuesta como resultado de una estimulación repetida que no comporta recompensa o daño. Es específica del estímulo y no puede ser explicada por fatiga motora o adaptación sensorial."* Una definición equivalente, pero que destaca dos características del proceso relevantes para esta tesis, fue acuñada por Peeke (1984): *" es el decremento relativamente permanente de la predisposición a responder ante un estímulo, como resultado de su presentación reiterada o constante; tal decremento es específico del estímulo original, por lo que la respuesta puede ser reinstalada por un estímulo diferente de igual intensidad."* En ella, la habitación es definida por un decremento en la predisposición a responder y no por un decremento en la respuesta. Bajo este concepto se concibe la habitación independientemente de la respuesta (Peeke y Veno, 1976). Por otra parte, se destaca la especificidad de la habitación al estímulo original y la conservación de la posibilidad de responder a un estímulo nuevo.

La habitación fue originalmente estudiada bajo otras denominaciones por especialistas de distintas áreas del comportamiento y la fisiología. A modo de ejemplo cabe citar los

clásicos trabajos de Sherrington (1906) en gatos espinales, los trabajos de psicología experimental de Dodge (1923) y Davis (1934), los de Hinde (1954; 1954a) y de Hartshorne (1956) en el terreno de la etología y la revisión hecha por Humprey (1933) y por Hilgard y Marquis (1940) sobre las teorías de aprendizaje. Pero no fue hasta 1966, con el clásico trabajo de Thompson y Spencer basado en sus experimentos con gatos espinales, que se establecieron las bases para una teoría de la habituación. A partir de allí, las principales características de los procesos de habituación han sido repetidamente descritas (ej., Hinde, 1970; Petrinovich, 1973; Brunner y Maldonado, 1988; Lozada y col., 1990). Además de proporcionar una estructura para la interpretación de los datos existentes en la literatura, la revisión de Thompson y Spencer tuvo un impacto aún más profundo. En particular, el hecho de que una serie de criterios objetivos simples pudiesen describir la habituación en muchos sistemas de respuesta a través de diversas especies, condujo a la creencia general de que el fenómeno era mediado por un único mecanismo fundamental inherente a todos los organismos. De allí que luego de dicha revisión, investigadores de muy diversas disciplinas se volcaron con entusiasmo a investigar "el mecanismo" de la habituación en términos de su propia experticia.

Los trabajos iniciales sobre habituación centraron toda su atención en las características decrementales del proceso. No obstante, un importante volumen de datos no encajaba completamente en un marco explicativo que sólo comprendiera la reducción de la respuesta. Surgió entonces la necesidad de postular la

participación, concomitante al proceso decremental, de un proceso incremental conocido como **sensibilización**, y fueron Groves y Thompson (1970) los primeros en formular una teoría dual de la habituación que resultó luego perfeccionada (Thompson y col., 1973; Petrinovich, 1984). Esta teoría invoca dos procesos inferenciales -habituación y sensibilización- para predecir el curso de los cambios en la respuesta. Se supone que todo estímulo posee dos propiedades: 1) evocar una respuesta a través de la vía sensomotora estímulo-respuesta (E-R) y 2) influir sobre el estado del organismo. Las repeticiones de un estímulo efectivo resultan por un lado, en un proceso decremental inferido en la vía E-R que constituye el componente de habituación. Por otro lado tales repeticiones resultan en un proceso incremental inferido, que actúa sobre el estado de excitación o tendencia a responder, que constituye el componente de sensibilización. Se presume que ambos componentes ocurren y se desarrollan independientemente, pero que interaccionan para conformar la respuesta. Dentro de este marco conceptual, la salida comportamental corresponde a una función que depende de las constantes de tiempo de activación y de desactivación de los componentes de habituación y sensibilización. En otras palabras, la primacía de un proceso sobre el otro estaría determinada por el curso temporal de cada uno, en las circunstancias particulares del suceso, y ello condicionaría la respuesta final observada.

A este punto, es necesario destacar que bajo la denominación de habituación se reconocen dos procesos diferentes: **habituación de corto término** y **habituación de largo término** (Hinde, 1970;

Davis, 1970; Groves y col., 1976; Carew y col., 1972; Kandel, 1979; Lozada y col., 1990). Estos y otros trabajos indican que la habituación de corto término, con una duración de minutos a horas, coexiste con un proceso de larga duración que persiste por días o semanas. Existen datos experimentales que señalan que ambos procesos compartirían un mismo locus en el sistema nervioso (Carew, 1984), mientras otros sugieren que se trataría de procesos anatómicamente independientes. En este último sentido, lesiones del vermis cerebellar en ratas atenúan significativamente la habituación de largo término sin alterar la de corto término o el nivel inicial de respuesta (Leaton y Supple, 1986).

Aunque menos estudiadas y comprendidas, estas consideraciones en torno a procesos de corta y larga duración son también válidas para el fenómeno de sensibilización (Petrinovich, 1984; Kandel y Schwartz, 1981).

Una de las perspectivas de estudio del fenómeno de habituación fue establecida ya en 1906 por Sherrington. La misma centra el análisis en el marco conceptual del arco reflejo. El comportamiento es visto como el producto de la activación de una vía refleja, y la explicación de los cambios en el comportamiento se centra en la identificación de modificaciones en el patrón de actividad neural permitidos por el arco reflejo, identificación tanto de los sitios en que esos cambios ocurren como de su naturaleza. La potencialidad de esta perspectiva de análisis es puesta de manifiesto en la literatura moderna por los importantes programas de investigación de Kandel con la babosa marina *Aplysia* (ej., Kandel, 1979a; Abrams y Kandel, 1988) y de Krasne con el langostino de agua dulce (ej.,

Krasne, 1972; 1976; Krasne y Lee, 1988; Krasne y col, 1990), los cuales han arrojado luz sobre los mecanismos sinápticos que podrían estar asociados con los cambios en la excitabilidad refleja que sigue a la estimulación repetida.

Una perspectiva diferente en el estudio de la habituación es ofrecida por teorías integrales como las de Sokolov (1963), Konorski (1967) y Wagner (1976). En éstas, el énfasis no está centrado en los procesos fisiológicos particulares sino en formulaciones abstractas, para las cuales los mecanismos son tenidos en cuenta tan sólo para extraer las regularidades funcionales de las modificaciones plásticas del fenómeno de habituación. Una cualidad importante del enfoque de tipo integral es la posibilidad de detectar ciertas características que podrían exhibir una consistente regularidad a pesar de mediar procesos diferentes. Las presiones evolutivas podrían determinar convergencias en el comportamiento y éstas podrían alcanzarse a través de mecanismos distintos. Es decir, las bases fisiológicas de la habituación no son necesariamente las mismas entre las distintas especies o entre diferentes respuestas (Sharpless y Jasper, 1956; Treisman, 1984; Davis y File, 1984).

Algunas teorías integrales prestan especial atención a las influencias extrínsecas al proceso reflejo, como las ejercidas por el contexto en donde la habituación tiene lugar, las que en general no son consideradas por los seguidores de la tradición iniciada por Sherrington. Por ejemplo, la teoría de SOP (sigla inglesa de "procedimientos operacionales típicos") de los sistemas de memoria (Wagner, 1981; Whilow y Wagner, 1984) propone la mediación de dos procesos funcionales diferentes y asigna rasgos distintivos a la

habituaación de corto y de largo término: un proceso de tipo refractario en el corto término y un proceso de condicionamiento pavloviano en el largo término, en donde las claves contextuales de la situación experimental (estímulo condicionado) se han asociado con el estímulo habituante (estímulo incondicionado) y por lo tanto inducen la inhibición (respuesta condicionada) de la respuesta.

Las teorías sobre habituación pueden entonces ser superficialmente clasificadas en aquellas que involucran cambios en la vía estímulo-respuesta, es decir en la vía refleja que constituye la ruta más directa a través del sistema nervioso central entre el estímulo y la respuesta (Thompson y Spenser, 1966; Groves y Thompson, 1970; Kandel, 1978), en contraposición de aquellas que involucran procesos de naturaleza neural más compleja, que se desarrollan y refuerzan durante la repetición del estímulo y conducen a la supresión de la respuesta (Sokolov, 1963; Konorski, 1967; Wagner, 1976). En general los investigadores que trabajan con organismos o sistemas relativamente simples adhieren a la primera clasificación en tanto que aquellos que trabajan con modelos experimentales más complejos suscriben a la segunda.

En un intento por conjugar ambas posiciones Davis y File (1984) han propuesto un modelo teórico de considerable valor heurístico. Según éste, la habituación podría ocurrir en la vía estímulo-respuesta, proponiéndose, por ejemplo, una disminución en la liberación del neurotransmisor involucrado en la ruta estimulada (Farel y Thompson, 1976; Kandel, 1978). Los autores llaman a esto **habituaación intrínseca** (véase también Groves y Thompson, 1970). Por

otra parte y también afectando el nivel de respuesta, podrían actuar **sistemas moduladores**. La actividad de estos sistemas no puede por sí misma evocar la respuesta, pero sí puede disminuir o aumentar el nivel de reactividad. De aquí que la acción moduladora no se manifieste, a menos que la respuesta sea provocada por algún estímulo efectivo. El sistema modulador puede ser tónicamente activo o su influencia puede ser inducida por ciertos estímulos, inclusive por el mismo estímulo que evoca la respuesta en cuestión. Además, condicionamientos de tipo pavloviano también pueden determinar cambios en el sistema modulador. Todo esto da lugar a la posibilidad de que otro tipo de mecanismo pueda tener participación en el decremento de la respuesta. La habituación podría producirse entonces por la activación progresiva de un sistema modulador con efecto inhibitorio sobre la respuesta, o por la disminución progresiva de un sistema modulador que tónicamente contribuye a aumentar la respuesta. En cualquier caso, estaría involucrado un circuito neuronal externo al circuito estímulo-respuesta. Este tipo de habituación es denominada por los autores **habituación extrínseca**.

La habituación aparece siempre descrita en los libros de comportamiento como la forma más simple y al mismo tiempo más ubicua de aprendizaje. Por medio de ella, los animales, seres humanos incluidos, aprenderían a hacer caso omiso de estímulos que han perdido su novedad o significación, permitiéndoles prestar atención a los estímulos recompensadores o importantes para la supervivencia. Sin embargo, la costumbre generalizada de clasificar la habituación como aprendizaje simple y no-asociativo puede

conducir a subvaluar su importancia biológica. En tal sentido, son interesantes las reflexiones expuestas por Peeke y Petrinovich (1984, pág. 67). Estos autores sugieren que más allá de las consideraciones operacionales, existen pocas diferencias entre los aprendizajes asociativos y aquellos no asociativos. Ambos son producto de la experiencia, pueden ser de larga duración o permanentes y ambos pueden ser contexto específicos. Y aconsejan considerar la habituación como una forma más de aprendizaje y centrarse sobre el significado funcional del fenómeno en cuestión, más que sobre las operaciones utilizadas para distinguir entre tales fenómenos (ver también: Fantino y Logan, 1979; Whitlow y Wagner, 1984; Carew, 1984).

Habituación de la respuesta de escape

El papel de la habituación ha sido enfatizado en relación a los comportamientos de evitación y de escape porque es en este marco que el fenómeno aparece por primera vez en la filogenia y es aquí donde su importancia resulta más evidente (Thorpe, 1956). A pesar de lo ubicuo de la habituación entre los phyla, un ejemplo es frecuentemente citado en los libros de comportamiento animal (ej. Immelmann, 1976; Tinbergen, 1965): la reacción antipredatoria de aves gallináceas ante la visión de un objeto en vuelo. De manera innata, los polluelos recién nacidos se agachan en respuesta a una amplia variedad de estímulos que se presentan por sobre ellos. Luego de unas pocas experiencias inocuas con pájaros volando u hojas cayendo, la respuesta a estos estímulos decae. De aquí en

más, ésta es provocada sólo por objetos voladores no familiares. Dado que la aves de presa son menos frecuentes que las especies no predadoras o los objetos inanimados cayendo, parece clara la ventaja selectiva de aprender a no responder a la caída de cada hoja (Shalter, 1984).

En los procesos de reconocimiento de predadores ocurren muchos casos de errores de identidad, frecuentemente como resultado de la aparición súbita de un estímulo inocuo que la presa confunde con un predador (Schleidt, 1961; Gibb, 1960; Hinde, 1952; Miller, 1921; Morley, 1953; Morse, 1970). Además, existen evidencias de que la presa no se habitúa completamente a la presencia del predador. Las observaciones comportamentales en especies sociales indican que la respuesta de alarma se habitúa mientras la respuesta de orientación persiste (Russel, 1967; Sharpless y Jasper, 1956). Como bien señala Shalter (1984), aunque la respuesta de huida no necesariamente ocurra, el mantener la vigilancia parecería ser altamente adaptativo. Así, la habituación de la respuesta de escape ante la amenaza persistente de ataque de predadores, debe ser entendida como una situación de compromiso. Un delicado equilibrio entre dos necesidades: por un lado, la necesidad de escapar en cualquier momento de un enemigo y por otro lado, la necesidad de economizar energía y mantener actividades vitales tales como la búsqueda de alimento, construcción de nidos, reproducción (Clark, 1960a, 1960b; Nicol, 1950), que insumen gran cantidad de tiempo (Klopfer, 1973).

Llama la atención que las respuestas antipredatorias se habitúen más fácilmente en las condiciones del laboratorio que en la naturaleza (Lorenz, 1939; Morse, 1980; Shalter, 1975; Hinde,

1954; 1954a). Una explicación plausible de este hecho fue dada por Schleidt (1961). Según él, el hecho de que en los experimentos de laboratorio generalmente se mantenga constante el sitio de presentación y/o la dirección de aproximación del predador, daría cuenta de la diferencia en la tasa de habituación observada entre el laboratorio y el campo. La importancia del contexto espacial en la respuesta iterativa a un predador fue demostrada en una cantidad de trabajos (Falls, 1969; Petrinovich y Patterson, 1981; Peek y Veno, 1973; Shalter, 1975; Lozada y col, 1990) y su ventaja adaptativa se explica en términos de la dificultad de que en la naturaleza, dos ataques provengan desde el mismo sitio o dirección. Un cambio en el contexto espacial podría significar una situación nueva y posiblemente letal, ante la cual la presa debería poder continuar respondiendo. Así, el proceso perceptual de reconocimiento del predador, cuando ocurre repetidamente, involucraría una sutil evaluación del contexto espacial y no tan sólo la mera caracterización del predador.

Biología de la nocicepción

Definiciones

Se entiende por nocicepción a *"la capacidad que poseen los animales para detectar y reaccionar ante estímulos que podrían comprometer su integridad"* (Sherrington, 1906). Esta definición de nocicepción es correcta tanto para invertebrados como para seres humanos. No obstante, debe señalarse que los términos nocicepción

y dolor no son exactamente equivalentes y que la percepción de dolor no puede ser necesariamente inferida a partir de los comportamientos asociados con la nocicepción. La International Association for the Study of Pain define el dolor en humanos como *"una experiencia emocional y sensorial desagradable asociada con un daño tisular actual o potencial, o descrita en términos de ese daño"* (Merskey, 1983). Algunos autores, sin embargo, hablan de dolor en animales no-humanos, definiéndolo como *"una experiencia sensorial aversiva causada por un daño actual o potencial que induce reacciones motoras o vegetativas de defensa, resultando en un aprendizaje evitativo ..."* (Zimmerman, 1986), pero esta descripción está más cerca de la de nocicepción que de la de dolor en humanos, siendo abarcativa de los comportamientos ante estímulos aversivos de los bebés humanos que todavía no han accedido al concepto de "dolor" (Fitzgerald, 1987). Por lo tanto, durante el desarrollo de esta tesis, se consideró que el término "dolor" tan sólo puede ser empleado metafísicamente en referencia a animales no-humanos (véanse las discusiones de Eisemann y col., 1984; Fiorito, 1986; Bateson, 1991), optándose por la utilización del concepto "nocicepción" y distinguiendo entre **nocicepción actual** y **nocicepción potencial**. El primer concepto estará referido a la experiencia sensorial originada como producto de un daño físico concreto (el "dolor" metafísico). Por nocicepción potencial en cambio, entenderemos todas aquellas experiencias sensoriales causadas por amenazas o estímulos de peligro, esto es, estímulos que de proseguir y concretarse podrían conducir a un dolor (el "miedo" metafísico).

La existencia en protozoos de cambios comportamentales en respuesta a estímulos aversivos ha sido objeto de discusión (Nailtoh, 1982), pero en la clase antozooa (anémonas) ya es posible encontrar indicios indudables de respuestas nociceptivas (Shelton, 1982) que, de aquí en más, están presentes en todos los grupos, pareciendo constituir un componente esencial de la vida animal. Al respecto, es interesante la conjetura salvaje (sic) sugerida por Popper, acerca del papel del "dolor" (la nocicepción) en el surgimiento de la conciencia (Popper y Eccles, 1985, pág. 143).

Neuromodulación y opiáceos

Los trabajos iniciales sobre las bases neuronales del comportamiento se enfocaron sobre cuestiones anatómicas y fisiológicas de circuitos relacionados con patrones sensomotores simples. Se pensó que el conocimiento de las conexiones sinápticas de los circuitos explicaría cómo se generan los comportamientos. Sin embargo, ya al dilucidar los primeros circuitos neuronales se hizo evidente que el sólo conocimiento del circuito no permite predecir el comportamiento (Getting, 1988). Ahora sabemos que un circuito determinado puede generar una variedad de comportamientos relacionados y que la definición anatómica de un circuito no determina una única salida motora. Las entradas moduladoras y la retroalimentación sensorial juegan un papel fundamental en alterar las propiedades funcionales y las interacciones sinápticas entre las neuronas de los circuitos, esculpiendo en requerimiento de las circunstancias, nuevos circuitos a partir de una red neural

anat6micamente fija (Meyrand y col., 1991; Harris-Warrik, 1988; 1989). Por ello, ha surgido en a6os recientes un gran inter6s por la neuromodulaci6n del comportamiento, aunque la definici6n precisa de "acci6n neuromoduladora" sea todav6a sujeto de debate. El punto exacto en donde un neurotransmisor se hace neuromodulador y un neuromodulador se hace una hormona es dif6cil de establecer (Kavaliers, 1989). No obstante, los neuromoduladores pueden ser conceptualmente diferenciados de los neurotransmisores cl6sicos sobre la base de la naturaleza y duraci6n de su acci6n. El efecto de los neuromoduladores es m6s global y prolongado que el de los neurotransmisores, los que act6an por per6odos breves dentro del espacio sin6ptico (Iversen, 1986). Se ha propuesto que los neuromoduladores modifican la acci6n de los neurotransmisores, aumentando la diversidad y flexibilidad de la comunicaci6n intracelular. A nivel celular, el efecto modulador podr6a involucrar la facilitaci6n o la inhibici6n en sitios pre y post sin6pticos (Kaczmarek y Levitan, 1987; Bloom, 1988).

Algunos mecanismos transductores y sistemas de segundos mensajeros que asisten la acci6n moduladora, han mostrado ser virtualmente id6nticos en vertebrados e invertebrados (Lothshaw y col., 1986; Kavaliers, 1989). Particularmente en crust6ceos, se han llevado a cabo extensas investigaciones sobre la modulaci6n de comportamientos simples de origen central y de patrones generadores centrales. Entre ellos, se cuentan los trabajos sobre la modulaci6n de la locomoci6n (Chrachri y Clarac, 1987; Martinez y col., 1988), de los movimientos estomacales (ej., Meyrand, 1991), del latido card6aco (ej., Miller y col., 1984) y de especial inter6s, los trabajos sobre la modulaci6n de la sensibilidad sensorial en el

reflejo de escape del langostino (ej., Glanzman y Krasne, 1983; 1986, Bustamante y Krasne, 1991) y los elegantes trabajos sobre la modulación del sistema postural de la langosta (véase la revisión de Kravitz, 1988).

Al presente, se han reunido evidencias suficientes de que los péptidos opiáceos participan en la modulación de la nocicepción a estímulos aversivos y estresantes, tanto en vertebrados (Bodnar, 1986; Amit y Galina, 1986; 1986a) como en crustáceos (Maldonado y Miralto, 1982; Maldonado y col., 1989; Lozada y col., 1988), en insectos (Zabala y Gomez, 1991) y en moluscos (Kavaliers, 1987; 1988; 1989; 1992). La administración de pequeñas cantidades de péptidos opiáceos endógenos (endorfinas, encefalinas o dinorfinas) o de agonistas narcóticos exógenos tales como la morfina, tienen efecto antinociceptivo. Los antagonistas opiáceos típicos tales como el naloxono, suprimen ese efecto y en algunos casos producen hiperalgesia (Fanselow, 1987).

Una serie de trabajos realizados sobre diferentes especies de crustáceos analizando la modificación de la respuesta comportamental por la administración de opiáceos, preanunció la presencia de esas sustancias en este grupo (Maldonado y Miralto, 1982; Quackenbush y Fingerman, 1984; Martinez y col., 1986; 1988; Lozada y col., 1988; Maldonado y col., 1989; Romano y col., 1990). Contemporáneamente, otros investigadores, recurriendo a la utilización de métodos inmunocitoquímicos, encontraron reactividad opiácea en el tejido nervioso de crustáceos (Mancillas y col., 1982; Fingerman y col., 1985; Jaros y col., 1985; para una completa revisión véase Jaros, 1990). Sin embargo sólo recientemente, con

los trabajos de purificación, aislamiento y posterior secuenciación realizados en tejido nervioso del cangrejo *Carcinus maenas* (Rothe y col., 1991; Luschen y col., 1991), fue posible tener la certeza de la presencia de opiáceos endógenos en crustáceos. Los resultados de estos trabajos revelan una identidad estructural completa entre la met- y la leu-encefalina (dos representantes de la familia de compuestos opiáceos) de mamíferos y las del cangrejo.

En vista del origen polifilético de los invertebrados y puesto que es extremadamente difícil que mecanismos moduladores idénticos puedan haber surgido en varios phyla independientemente, todo sugiere que la modulación opiácea de las respuestas nociceptivas estaría presente desde un estadio temprano en la evolución.

Analgesia inducida por estrés

A los fines de la supervivencia, particularmente en un medio ambiente hostil, parece obvio suponer que los animales son capaces de detectar y reaccionar a cualquier estímulo nociceptivo. Por ello, el descubrimiento de que la exposición a estímulos nocivos, estresantes o tan sólo novedosos, puede conducir a la supresión de la nocicepción, resulta paradójico a la vez que de gran significación. Este fenómeno, descrito hace casi dos décadas simultáneamente por tres laboratorios diferentes (Akil y col., 1976; Hayes y col., 1976; Rosecrans y Chance, 1976) se conoce hoy como **SIA** (sigla inglesa de analgesia inducida por estrés). Las hipótesis más frecuentes con respecto a la naturaleza de los mecanismos que asisten al SIA proponen que es mediado a través de

la liberación de opiáceos endógenos que actuarían sobre receptores en el sistema nervioso central (Basbaum y Fields, 1984; Fanselow y col., 1991).

Diversos autores, basándose en resultados de experimentos de SIA llevados a cabo en mamíferos, sugieren que la regulación de la nocicepción no sería la única ni la principal consecuencia de la activación de este sistema. En efecto, otros cambios comportamentales no muy notables aunque significativos, parecen acompañar la respuesta utilizada para caracterizar la analgesia. Tales cambios involucrarían alteraciones sutiles relacionadas con los estados de atención, orientación, alerta, etc. (Amir y col., 1980; Amir y Amit, 1987; Hayes y Katayama, 1986; Guilbaud, 1991).

Dado que la analgesia parece ser una consecuencia ineludible del estrés, sería de notable valor adaptativo que ella pasase a formar parte de la experiencia del individuo. Y en efecto, muchos resultados sugieren que la SIA podría ser condicionada a las claves contextuales del medio que estuvo asociado con una situación de daño o peligro, y que esta analgesia condicionada estaría mediada, tanto en mamíferos como en otros grupos, por opiáceos endógenos (Kincheck y col., 1984; Fanselow, 1984; Fanselow y col., 1991).

Por estar relacionado con este tema, y por hacerse referencia a él en diversos pasajes de esta tesis, resulta oportuno presentar aquí, sucintamente, el modelo propuesto por Fanselow (1986), denominado **recuperativo-defensivo-perceptual** (PDR en la sigla inglesa) y basado en experimentos en los que se emplea el paradigma de miedo condicionado (Sigmundi y col., 1980). Se parte de la premisa que los mecanismos de analgesia opiácea juegan un papel crítico en los comportamientos de defensa antipredadores. En el

modelo. Estos dos niveles son concebidos como mecanismos que sirven a funciones biológicas muy diferentes, una de defensa y otra de recuperación, y podrían ser considerados como integrando sistemas independientes. Sin embargo, el modelo propone dos puntos importantes de interacción entre estos sistemas. Primero, un estímulo nociceptivo actual puede asociarse con un estímulo neutro que se convierte así en estímulo nociceptivo potencial y activa la defensa; segundo, la activación del sistema de defensa provoca, a su vez, la activación de un proceso opiáceo endógeno que reduce la percepción de los estímulos nociceptivos actuales, disminuyendo de este modo los comportamientos recuperatorios. Fanselow (1984) ha planteado el valor adaptativo de esta acción analgésica, partiendo de la idea de que si, ante la presencia de un predador, el animal continuase comprometido en actividades recuperatorias, se haría imposible el despliegue de las reacciones defensivas específicas. Además, como consecuencia del debilitamiento en la percepción nociceptiva, se supone una reducción en la capacidad de condicionamiento. En ese sentido se demostró, en experimentos con ratas, que la asociación entre el gabinete experimental y el choque eléctrico, puede ser reforzada por efecto de la administración de naloxono (un típico antagonista opiáceo). El hecho se explica porque al antagonizar el efecto de los opiáceos endógenos, el naloxono aumenta la percepción del estímulo aversivo como si se tratase de un aumento en la intensidad del choque (Fanselow, 1981, 1987, 1991).

Un requisito que parece ser indispensable para la inducción de SIA de tipo opiáceo es el **aprendizaje de la inevitabilidad** (del

inglés learned helplessness). Cuando una situación aversiva sostenida es comportamentalmente incontrolable, podría ser adaptativo substraerse a esa situación y conservar energía hasta que aparezca la posibilidad de controlarla. Se ha argüido que la activación del sistema opiáceo tiende a funcionar para conservar energía en una variedad de situaciones de emergencia (Margules, 1979). Al respecto, la disminución de la sensibilidad y reactividad nociceptiva favorecerían el estado de abstracción ante situaciones aversivas inescapables. Por otro lado, si la situación es comportamentalmente controlable, sería más beneficioso actuar que substraerse. En este sentido, Maier (1986) ha encontrado que el aprender que un evento nocivo es incontrolable, podría ser un determinante crítico de los procesos de analgesia opiácea.

Además de la vasta literatura dedicada al SIA en vertebrados (para una extensa revisión véase el volumen editado por Kelly, 1986), existen al menos dos trabajos que prueban sin duda la existencia de este fenómeno en invertebrados (Kavaliers, 1987; Valeggia y col., 1989).

El cerebro de los decápodos

Organización estructural

Al igual que en la mayoría de los artrópodos, el cerebro de los crustáceos decápodos, se encuentra estructuralmente organizado en neuropilos, es decir, en áreas discretas asociadas con vías nerviosas aferentes y eferentes. Sin embargo, hay algunos

neuropilos que contienen gran número de neuronas y no están directamente asociados con vías de entrada o salida; la función de estos núcleos es escasamente comprendida (Sandeman, 1990).

Existen tres divisiones principales en el cerebro: 1) El protocerebro, que comprende dos lóbulos laterales (lóbulos ópticos) contenidos en los pedúnculos oculares, y una región medial formada a su vez por cuatro lóbulos y un área especializada conocida como cuerpo central. En los lóbulos ópticos se distinguen cinco neuropilos: lámina, médula externa, médula interna, médula terminalis y cuerpo hemielipsoide, ocupando una importante porción del cerebro. Esta preponderancia de los lóbulos ópticos es en parte debida, probablemente, a que se requiere un gran procesamiento para transformar cambios de intensidad de luz sobre los fotorreceptores en medidas de velocidad, dirección y tamaño de una imagen en movimiento. Cerca de la médula terminal se ubica el sistema glándula del seno-órgano X, una estructura neurosecretora fuente de muchas de las neurohormonas conocidas de crustáceos. 2) El deutocerebro, que recibe entradas de las anténulas, consta de los lóbulos olfatorios y paraolfatorios, los neuropilos antenulares y los lóbulos accesorios. 3) El tritocerebro incluye el neuropilo tegumentario y los lóbulos antenales.

Organización funcional

De acuerdo a Sandeman (1990), dentro del continuo de la organización funcional desde lo simple a lo complejo, los comportamientos en el cerebro pueden considerarse ordenados en tres

niveles:

Nivel 1: contempla las acciones en las que un estímulo relativamente simple resulta en una respuesta que involucra siempre el mismo grupo muscular. El número de neuronas participantes es pequeño; las latencias son cortas, lo que implica un vínculo directo sin la participación de interneuronas entre la entrada sensorial y la salida motora; el movimiento es en una dirección particular; y la intensidad es el único grado de libertad. Un ejemplo de acción a este nivel es el reflejo de retracción del ojo en el cangrejo (Abramson y Feinman, 1987).

Nivel 2: las acciones a este nivel pueden ser definidas como aquéllas en las cuales el estímulo es recibido por receptores contenidos en órganos sensoriales complejos (estatocistos, ojos, etc.), que proveen una señal que cualitativa y cuantitativamente determina la naturaleza de la respuesta comportamental. Esta puede incluir la participación de diversos sistemas motores actuando conjuntamente y controlados por retroalimentación, pudiendo ser influenciada por diferentes entradas sensoriales. Ejemplos de actividades a este nivel son: la respuesta de movimientos compensatorios de los pedúnculos oculares, la reacción optomotora, y la respuesta de escape ante estímulos visuales de peligro. Un indicio que ilustra la naturaleza multimodal de este tipo de respuesta, está dado por la extensión de los campos sinápticos de las neuronas motoras oculares que abarcan el protocerebro medial, el deutocerebro y el tritocerebro. Las respuestas de este nivel pueden variar en su intensidad de acuerdo al estado de alerta del animal y proporcionan un excelente modelo para explorar la acción de sistemas moduladores en el cerebro (Erber y Sandeman, 1990).

Nivel 3: las acciones se definen como aquellas que no requieren el mantenimiento de un estímulo externo para su continuación. La iniciación del comportamiento parece provenir del propio animal, aunque es posible establecer condiciones bajo las cuales éste ocurra con mayor probabilidad. Se hallan involucrados muchos sistemas aferentes y motores. Un buen ejemplo lo constituye la actividad de exploración, en la que se ven comprometidos al menos los receptores visuales, táctiles y gustativos (Dimant y Maldonado, 1992; Hermitte y Maldonado, comunicación personal).

Varju y Sandeman (1989) investigaron la actividad exploratoria en el langostino *Cherax sp.*, y llegaron a la interesante conclusión de que este animal es capaz de construir un mapa espacial del medio que lo circunda. A medida que progresan las excursiones exploratorias de *Cherax* desde su refugio, la distancia y dirección de determinadas marcas del ambiente conducirían a la formación y templado de un mapa espacial en su cerebro. Un cambio posterior en la topografía sería entonces percibido como un desajuste entre las posiciones de las marcas del mapa espacial almacenado, constituyendo un fuerte estímulo que conduciría a respuestas comportamentales del tipo de las descritas en el primer y segundo nivel. La capacidad de construcción de tales mapas es bien conocida en las abejas forrajeras (Cartwright y Collett, 1987).

La observación de que hay comportamientos que son temporalmente compatibles (ej. desplazarse y forrajear) y otros temporalmente incompatibles (ej. copular y escapar), ha conducido a una serie de hipótesis en torno a las interacciones de diversos comportamientos. Así, en base al modelo de los patrones fijos de

comportamiento liberados en respuesta a estímulos específicos (Lorentz, 1950) y al hecho de que la activación de un comportamiento produce muchas veces la supresión de otro, surgió la idea de la inhibición mutua entre centros que controlan comportamientos distintos (Timbergen, 1951; Lorentz 1982). Sobre este particular, los crustáceos han acreditado ser un excelente modelo de estudio como lo demuestra la abundante bibliografía (véanse revisiones en el volumen *Frontiers in Crustacean Neurobiology*, 1990). El tema en este grupo ha recibido tratamiento desde enfoques tan diversos como la teoría de costo y beneficio (Formanowicz y Brodie, 1988; Scarratt y Godin, 1992), la simulación por computadora (Edwards, 1991), y estudios de correlaciones comportamentales farmacológicas y electrofisiológicas (Krasne y Lee, 1988; Glanzman y Krasne, 1983; Bustamante y Krasne, 1991). En este último tipo de enfoque, se pone en evidencia el papel fundamental que les compete a los neuromoduladores en la regulación de las interacciones entre los diferentes comportamientos (Meyrand y col., 1991; Harris-Warrick, 1989).

Respuesta de escape a estímulos visuales en cangrejos

Cualquier persona que camine por una playa habitada por cangrejos puede percatarse del grado de alerta que ostentan estos animales. En efecto, los cangrejos, especialmente los semiterrestres, poseen un sistema visual altamente desarrollado y despliegan una rápida reacción de huida ante un objeto que se aproxima (Nishimoto y Herrnkind, 1978; Woodbury, 1986; Nalbach,

1990a). Como resultado de trabajos comportamentales de campo y de laboratorio con dos especies de cangrejos filogenética y ecológicamente poco relacionadas, *Heloccius cordiformis* y *Pachygrapsus marmoratus*, Nalbach (1987; 1990) arribó a la conclusión de que el parámetro crítico del estímulo para evocar la reacción de escape es el aumento del ángulo subtendido por el objeto que se acerca. Esto es así en ambas especies pese a las diferencias en el diseño de sus ojos (Zeil y col., 1986).

Hace más de 25 años, en una admirable serie de trabajos en los que registraba potenciales evocados en el nervio óptico de crustáceos, Wiersma describió la topografía funcional del ojo, clasificando las células de acuerdo al tipo de estímulo lumínico al que respondían y a su campo receptivo (Waterman y Wiersma, 1963; Wiersma y Yamaguchi, 1966; 1967; 1967a; Waterman y col., 1964). Uno de los grupos de clasificación correspondió a células detectoras de movimiento cuya respuesta se habituaba a la estimulación repetida (Wiersma y York, 1972; Labhart y Wiersma, 1976).

Avanzando en esta línea, Nalbach (1990) realizó registros electrofisiológicos de potenciales evocados por objetos en aproximación, en el cuerpo celular de neuronas de la lámina, médula externa y médula interna. Estos y otros experimentos (Glantz, 1977) revelaron la existencia de células detectoras de movimiento o **"células reflejantes"** (del inglés looming cells; Horridge, 1986) ubicadas en la médula interna. Dichas células responden al mismo parámetro crítico del estímulo encontrado para la respuesta de escape, y poseen un campo receptivo restringido que les permitiría codificar la dirección de aproximación del objeto. Además, poseen

la capacidad de habituarse durante la estimulación repetida, recuperando su respuesta cuando el objeto se aproxima desde un área diferente (Nalbach, 1990; Glantz, 1977) en modo similar a como lo hace la respuesta de escape (Brunner y Maldonado, 1988; Lozada y col., 1990). Posiblemente, estas células correspondan a algunas de las células detectoras de movimiento estudiadas hace años por Wiersma y sus colaboradores.

Nalbach (1987; 1990a) encuentra además, que la dirección del escape está gobernada por dos tendencias que se sumarían en forma vectorial: una de alejamiento del objeto que se acerca y otra de acercamiento hacia un refugio u otro objetivo definido. Con todos estos antecedentes, propone un esquema circuital para explicar el mecanismo de detección de aproximación de un objeto y evocación de la respuesta de escape. La idea básica es que la aproximación es detectada por el aumento de las líneas de contorno del objeto en el tiempo. Para extraer esta información, detectores de movimiento sensibles a la dirección podrían encontrarse integrados espacialmente de modo de generar señales proporcionales al número de omatidios estimulados. Cada señal, que saldría del conjunto de células detectoras con un retardo de tiempo, sufriría una sustracción, resultando en una señal proporcional al cambio en el número de detectores locales estimulados. Una integración temporal posiblemente llevaría a un nivel de excitación supraumbral en las células reflejantes y operaría la respuesta de escape. Dado que el cambio en el número de detectores locales estimulados es proporcional al cambio instantáneo en la longitud del contorno del objeto, la integración temporal resultaría en una señal proporcional al cambio en el tamaño angular del objeto, que es

exactamente el parámetro crítico del estímulo que induce la respuesta de escape.

Chasmagnathus granulatus

El animal y su medio

Chasmagnathus granulatus, pertenece a la familia Grapsidae y es un representante típico de los que se conocen como cangrejos semiterrestres. Estos cangrejos poseen un elevado desarrollo del sistema visual, suelen ser de reacciones rápidas y activos corredores. Por su hábito de respirar fuera del agua, y en el caso particular de *Chasmagnathus* por ser además un animal eurihalino, las condiciones de mantenimiento y experimentación en el laboratorio son sencillas.

El gran número de cangrejos que suele encontrarse en las marismas (pantanos salobres) originó el apelativo **cangrejal**, adoptado en varios países por los estudiosos de estos ecosistemas. La especie *Chasmagnathus granulatus* habita en estuarios de sedimento areno-lodoso, desde Río de Janeiro (Brasil) hasta el Golfo San Matías (Argentina). Los individuos cavan sus propias cuevas en el horizonte mesolitoral superior y supralitoral, ocupado por una densa vegetación de *Spartina densiflora* y *Spartina alterniflora*, alcanzando una densidad de 120 cangrejos por m² (Botto e Irigoyen, 1979). De hábitos gregarios, se trasladan hacia el mesolitoral inferior e infralitoral durante determinadas horas del día (Bond-Buckup y col., 1990; Olivier y col., 1969 1). Su

régimen es de tipo omnívoro-detritívoro, alimentándose principalmente de restos vegetales , característica que también facilita su mantenimiento en cautiverio. Entre sus predadores naturales se encuentran las gaviotas, especialmente la gaviota cangrejera *Larus belcheri* (Olivier y col.,1969 II), la corvina rubia *Micropogon opercularis* y la corvina negra *Pogonias chromis*.

Antecedentes experimentales

En años recientes, probablemente debido a la facilidad de su obtención en gran cantidad y a la sencillez de su mantenimiento en el laboratorio, *Chasmagnathus* ha sido objeto de intensa investigación. Así por ejemplo, Rodríguez y col. (ej., Rodríguez y Lombardo 1991; Rodríguez y Amin, 1993) han estudiado el efecto de agentes tóxicos sobre el metabolismo energético; Santos y col. (1988; 1991) han investigado las adaptaciones metabólicas en relación con los mecanismos de regulación de glucosa en hemolinfa; y nuestro grupo se ha concentrado sobre aspectos de fisiología comportamental.

De los diferentes paradigmas de aprendizaje estudiados en *Chasmagnathus*, el de habituación a un estímulo de peligro ha arrojado resultados bastante inesperados. De hecho, aunque un objeto pasando por sobre el cangrejo provoca inmediatamente una rápida respuesta de escape, sugiriendo que este estímulo es interpretado como el ataque inminente de un predador (Hiatt, 1948), la respuesta de huida se habitúa rápidamente (Brunner y Maldonado, 1988) y por largo tiempo (ej., Lozada y col., 1990). Los primeros

resultados de nuestro laboratorio mostraron que 15 presentaciones repetidas de una pantalla rectangular opaca movida horizontalmente, con una duración de 9 seg. por ensayo y un intervalo de 3 min. entre ensayos, producen una clara disminución de la respuesta de escape que persiste 24 horas. Resultados recientes muestran que entrenamientos aún más breves pueden inducir una memoria de más larga duración. En efecto, un entrenamiento de 5 min. con 30 ensayos sin intervalo, induce una habituación de la respuesta que dura al menos 3 días. Este hecho está en desacuerdo con el concepto según el cual la habituación de largo término sólo puede observarse en invertebrados después de una estimulación prolongada y continua (ej. Humphrey, 1933; Harris, 1943; Hinde, 1970). Además, una adquisición tan rápida y una persistencia tan prolongada de la respuesta habituada a una señal que presagia el ataque de un enemigo, parece no compadecerse con la noción de que la habituación de escape constituye un delicado compromiso entre la satisfacción de necesidades conflictivas para el animal (ver pág. 14).

Una serie de resultados de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto la existencia de opiáceos endógenos en *Chasmagnathus*. En efecto, la administración de morfina provoca la reducción, en forma dosis-dependiente y naloxono-reversible, de la respuesta defensiva a un estímulo nociceptivo actual, un choque eléctrico (Lozada y col., 1988). Asimismo, dosis equivalentes producen, también en forma específica, la reducción de la respuesta de escape ante un estímulo nociceptivo potencial, un objeto pasante por sobre el animal (Maldonado y col., 1989). Mientras el primer resultado es consistente con el bien conocido efecto analgésico de esta

droga, el segundo está en contra del punto de vista generalmente aceptado de que los opiáceos no tienen efecto sobre la reactividad a estímulos de amenaza o peligro (Fanselow, 1984; Fanselow, 1986; Warren e Ison, 1982).

Con estos antecedentes experimentales, se comenzó a indagar sobre la posible participación de un mecanismo opiáceo en la habituación a estímulos de peligro en *Chasmagnathus*. Se encontró entonces que el pretratamiento con naloxono posee un efecto incremental sobre la respuesta de escape que emerge a medida que progresa la presentación iterativa del estímulo, retardando la habituación (Romano y col., 1990). Para la interpretación de este resultado, se apeló al modelo teórico propuesto por Davis y File (1984) según el cual, una modificación en la pendiente de la curva de habituación es indicativa de que la droga en estudio actúa a nivel de la habituación intrínseca, mientras que, un desplazamiento paralelo de la curva representa la acción de la droga sobre un sistema modulador. De ahí entonces que la mencionada acción del naloxono debería adscribirse a la primera causa, es decir, a un retardo en el decremento de la respuesta atribuible a una interferencia sobre la depresión sináptica (Kandel, 1978; Wine y Krasne, 1982). Sin embargo, los autores postulan una hipótesis alternativa, con la que interpretan los resultados por la acción sobre un sistema modulador. De acuerdo con ésta, luego de unos pocos ensayos en una sesión de estimulación con una figura pasante, se activaría en *Chasmagnathus* un mecanismo opiáceo endógeno que contribuiría a la reducción de la respuesta. El naloxono, por bloqueo sobre este mecanismo, aumentaría la reactividad a los

estímulos subsiguientes. Debido al retardo en la activación del sistema opiáceo, debe esperarse un cambio en la pendiente de la curva de respuesta, a pesar de que el naloxono actúe alterando un sistema modulador y no la habituación intrínseca. Claro está que la posible acción moduladora opiácea contribuiría, pero no explicaría totalmente el proceso de habituación a corto término.

Otro resultado indicativo de la activación del sistema opiáceo de *Chasmagnathus* durante la presentación iterativa de un estímulo de peligro lo ofrecen Valeggia y col. (1989). En estos experimentos, dicha estimulación provoca un efecto inhibitorio transitorio sobre la subsiguiente respuesta de escape a diferentes estímulos que es revertido por naloxono.

Una pregunta inquietante que surge de estos resultados es si los efectos de la administración exógena de morfina o de la activación del sistema opiáceo endógeno, sobre las respuestas a los estímulos de peligro, son debidos a un efecto periférico, es decir, a una acción a nivel de la entrada sensorial o la salida motora, o se deben a una acción a nivel del sistema nervioso central. Sobre las bases de los antecedentes teóricos y experimentales mencionados hasta aquí, la búsqueda del posible valor adaptativo que tendría para *Chasmagnathus* tan rápida y persistente habituación a un estímulo de peligro y el papel que en ésta le compete al sistema opiáceo endógeno, ocupó el centro de nuestra atención y el motivo de esta tesis.

Hipótesis

La hipótesis que inspira la presente tesis con el cangrejo *Chasmagnathus granulatus* se sintetiza a continuación.

- a) El mecanismo de percepción por el cual un estímulo visual induce una respuesta de escape, podría ser concebido como un esquema circuital en donde ciertos cambios de intensidad de luz sobre los fotorreceptores, relacionados con la velocidad, forma, tamaño y demás características de un objeto que se mueve en el campo visual del cangrejo, serían decodificados e "interpretados" por el sistema, como el preanuncio de un hecho que puede comprometer su integridad. Tal interpretación activaría diferentes estrategias comportamentales, entre ellas la respuesta de escape. En dicho circuito neuronal, las señales de peligro (ej. objeto acercándose) se hallarían innatamente "conectadas" con un significado negativo (daño actual) para el animal.

- b) La presentación reiterada de un estímulo de peligro, cuya consecuencia "esperada" (el daño causado por el ataque de un predador) nunca se concreta, conduce a un proceso de habituación. El animal aprendería que esa señal no se corresponde con su significado innato de amenaza, por lo que deja de escapar.

- c) El proceso de habituación activa un mecanismo opiáceo endógeno cuyo **efecto observable** es acelerar el decremento de la respuesta. La acción de los opiáceos se ejercería a nivel central y el **efecto inferido** de dicha acción consistiría en un debilitamiento del vínculo entre el estímulo visual de peligro y su significado innato.
- d) El resultado comportamental de la acción opiácea endógena durante el proceso de habituación, así como el proceso en su conjunto, especialmente la rapidez con que se adquiere la habituación de la respuesta y su notable persistencia, tendrían valor adaptativo.

Objetivos

Tomando en consideración los modelos y datos bibliográficos citados en la introducción y la hipótesis de trabajo mencionada, los objetivos de esta tesis abarcan aspectos causales próximos y últimos del fenómeno de habituación a un estímulo visual de peligro en el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*.

Causas próximas:

- 1_ Investigar si el sustrato neuronal de la acción opiácea es central o periférico.
- 2_ Evaluar si los opiáceos intervienen en la vía intrínseca de habituación o si actúan como moduladores sobre ese proceso.
- 3_ Poner a prueba la hipótesis de que los opiáceos debilitan la conexión entre las señales visuales de peligro y su significado innato.

Causas últimas:

- 4_ Estudiar, en relación a las condiciones ecológicas, la importancia que reviste para *Chasmagnathus* tan rápida y

profunda habituación, así como la participación del sistema opiáceo en el proceso. En definitiva, evaluar el posible valor adaptativo de tal fenómeno.

Materiales y métodos generales

Animales

Los sujetos experimentales empleados en esta tesis fueron cangrejos machos de la especie *Chasmagnathus granulatus*, recolectados con mediomundos en las rías de San Clemente del Tuyú y transportados al laboratorio en gabinetes diseñados a tal fin. En los experimentos se utilizaron animales de entre 2,8 a 3,0 cm. de ancho de caparazón, a excepción de los experimentos en donde se indiquen expresamente otros tamaños. El peso húmedo promedio (\bar{X}) de esta categoría de tamaño, calculado desde 60 animales, fué de 14,9 gr. con un error estándar (EE) de 0,2. En el laboratorio, los cangrejos fueron alojados en cubas plásticas (35 x 48 x 27 cm.) con 2 cm. de agua proveniente del lugar de recolección de los animales, a razón de 35 sujetos por cuba, en una sala especial (el cangrejario). En dicho ambiente los animales se mantuvieron bajo un ciclo de 12-12 hs. luz-oscuridad en un rango de temperatura controlada entre 19-24 °C. La alimentación consistió en pellets para conejos suministrados cada 3 días. El agua era siempre renovada luego de 4 hs. del comienzo de la ingesta.

Chasmagnathus puede ser capturado durante todo el año. Sin embargo la intensidad de su respuesta de escape disminuye drásticamente a finales del invierno y durante la primavera. Por lo tanto, los experimentos con esta especie se realizaron entre los meses de diciembre y agosto, es decir durante el verano, otoño y buena parte del invierno austral.

En una serie de experiencias realizadas en Italia, se trabajó con cangrejos machos de la especie *Pachygrapsus marmoratus*, el cangrejo europeo de las rocas. Estos eran capturados en el golfo de Nápoles por el servicio de pescadores de la Stazione Zoologica di Napoli, Instituto donde se realizaron todos los experimentos con *Pachygrapsus* que se describen en esta tesis. Los animales fueron clasificados en tres categorías de acuerdo al ancho de sus caparazones como se indica más adelante. En el Instituto, los cangrejos fueron alojados en cubas plásticas (40 x 50 x 25 cm.) con 2 cm. de agua de mar circulante, a razón de 40 sujetos por cuba, en una sala especial (el estabulario). En dicha sala los animales se mantuvieron bajo un ciclo de 12-12 hs. luz-oscuridad en un rango de temperatura ambiente no controlada. La alimentación consistió en sardinas frescas suministradas cada 3 días.

Pachygrapsus puede también ser capturado durante todo el año y al igual que *Chasmagnathus*, la intensidad de su respuesta de escape disminuye drásticamente durante el invierno y la primavera. En esta especie entonces, los experimentos se realizaron entre los meses de mayo y noviembre, es decir a finales de primavera y durante el verano y otoño boreal.

Todos los experimentos fueron conducidos durante la fase luminosa del ciclo diario, dentro de las 2 primeras semanas del arribo de los animales al laboratorio. Antes de ser utilizado en un experimento cada cangrejo era sometido a una **prueba de aceptación**: la misma consistía en colocar al animal con el dorso hacia abajo y controlar el tiempo que tardaba en recuperar su posición habitual. La razón de este criterio de selección se basa

en que, los animales que manifiestan una lenta reacción en este test, muestran una baja reactividad frente a una amplia gama de estímulos, y poco tiempo más tarde presentan síntomas de deterioro físico. El porcentaje de eliminación bajo este criterio fue menor al 10 %. Cada cangrejo fue utilizado en un único experimento.

Aparatos

Los experimentos de esta tesis han sido realizados básicamente empleando dos equipos.

Cilindro optomotor

La Fig. 1 es una representación del aparato, construido expresamente para realizar las mediciones de la respuesta optomotora que se presentan en esta tesis. En la parte **a** se muestra un detalle de la pinza de sujeción del cangrejo y en la parte **b** un esquema general del dispositivo. El cangrejo era sostenido dentro del cilindro estimulador por la pinza de sujeción. El reborde (r) de una varilla móvil de la pinza, que era empujada hacia adelante por una banda elástica, sujetaba rígidamente al cangrejo contra los rebordes frontales (rf1 y rf2), y le impedía realizar movimientos con las quelas. La pinza era montada en un sistema de crucetas (c) que permitía moverla en todas direcciones, de modo que el animal podía ser fácilmente ubicado en el centro del tambor estimulador (T) en una posición apropiada con respecto a la

fotocélula (fc). Las patas del cangrejo apoyaban sobre una esfera de telgopor de 15 cm. de diámetro que, flotando sobre el agua de una copa, podía ser rotada por el cangrejo al caminar. La razón de esta disposición fue que la respuesta optomotora es más intensa cuando el cangrejo puede caminar que cuando se encuentra fijo (Nalbach y Nalbach, 1987a). Todo este dispositivo se hallaba montado sobre un disco rígido (d1). El tambor estimulador en cambio (diámetro= 28 cm., altura= 38 cm.), se encontraba montado sobre el disco móvil (d2), conectado directamente al eje de un motor (m) que rotaba a una velocidad de 2 revoluciones por min. [una velocidad angular que induce una fuerte respuesta optomotora (Horridge y Sandeman, 1964)]. La luz proveniente de una lámpara incandescente de 75 W. ubicada 10 cm. por encima del cilindro, alcanzaba al animal luego de atravesar un grueso vidrio que actuaba como difusor del calor. El patrón de estimulación constaba de 9 franjas verticales negras, igualmente espaciadas sobre un fondo blanco, de 20° de ancho angular cada una. Para registrar los movimientos del ojo, una banderita de aluminio (b), de 2,5 mg. de peso, era asegurada al extremo del ojo derecho por medio de una pequeña cantidad de cemento anaeróbico. La fotocélula posicionada con su lado sensible hacia arriba, se hallaba fijada al soporte (s). Moviendo la pinza correctamente se lograba colocar al animal en una posición tal que la bandera era mantenida apenas por encima de la fotocélula. Los desplazamientos horizontales del ojo proyectaban la sombra de la banderita sobre la fotocélula, induciendo cambios de voltaje en el circuito, que luego de ser amplificados eran procesados por una computadora. De cada experimento se obtuvo un registro de la función del desplazamiento del ojo en el tiempo,

donde se indicaban los valores de amplitud máxima y mínima en una escala de 0 a 250.

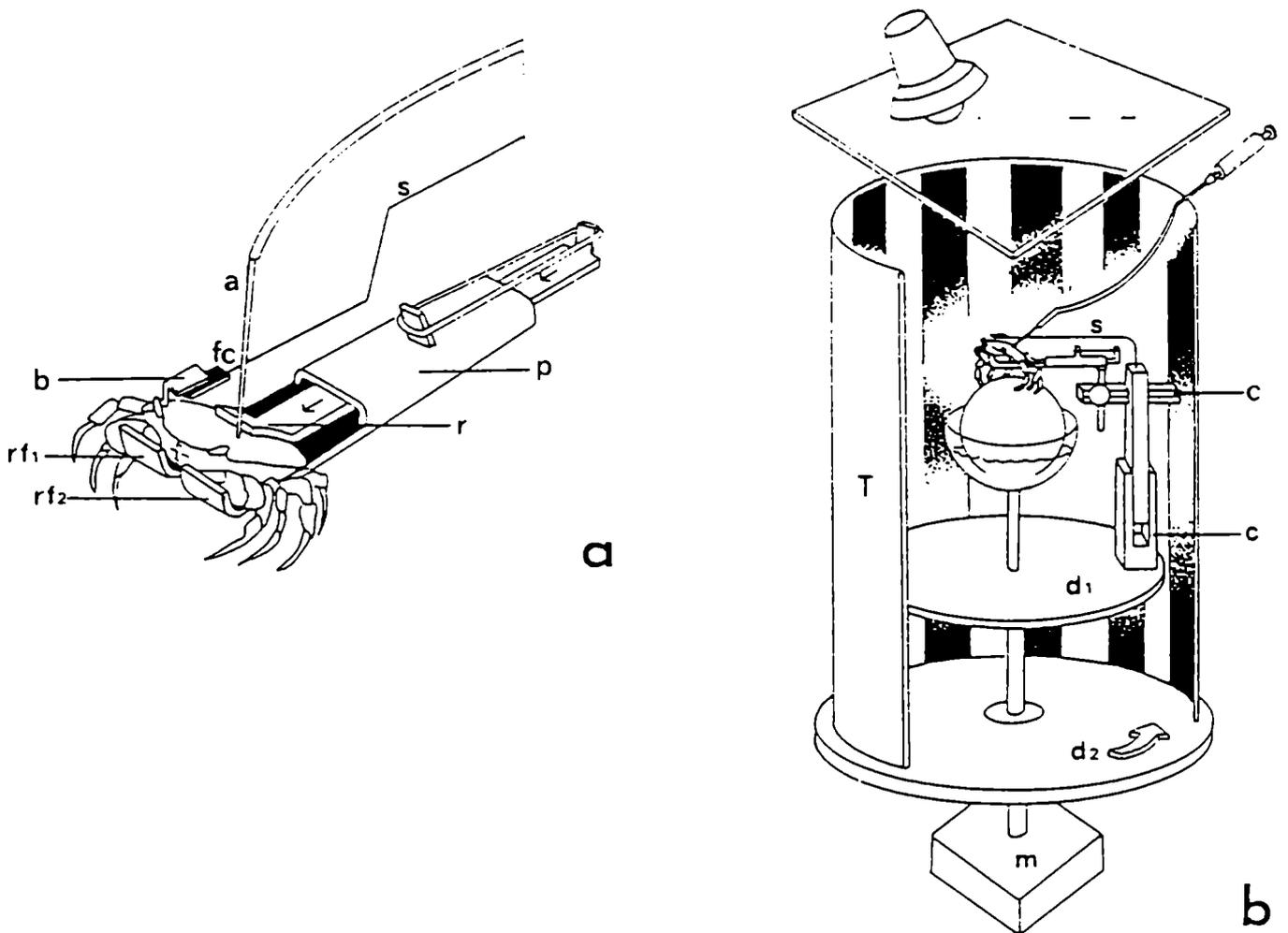


Fig. 1 __ a) Pinza de sujeción del cangrejo. b) Cilindro optomotor.

Universal

Con este nombre se designa el equipo empleado para realizar los experimentos de habituación de la respuesta de escape. La versión original que se usó en Buenos Aires consta de 40 unidades, la réplica construida en Nápoles tan sólo de 20. La Fig 2 muestra un esquema de una unidad o actómetro.

Cada actómetro, consiste en un contenedor semiesférico de plástico (C) con un sector central llano de 10 cm. de diámetro, cubierto con agua hasta una profundidad de 1 cm. El cangrejo es alojado en el contenedor que está suspendido por 3 tensores desde una estructura de madera y se encuentra iluminado por una lámpara (L) de 10 W. ubicada 30 cm. por encima del animal. Un motor (M) permite mover horizontalmente una figura (f) rectangular opaca (25 x 13 cm.) a través del borde superior del recipiente desde la posición (1) a la posición (2) y viceversa, a una velocidad angular que consiente realizar el recorrido completo en 2,25 seg., proyectando una sombra sobre el cangrejo. Los desplazamientos de la pantalla provocan una respuesta de escape en el animal y consecuentemente oscilaciones en el contenedor. En el fondo del recipiente se halla una aguja sólidamente cementada que se conecta con un elemento transductor piezoeléctrico (pe). Las oscilaciones del recipiente inducen, a través del piezoeléctrico, señales eléctricas proporcionales a su velocidad. Tales señales son amplificadas, integradas durante el tiempo de registro (9 seg.), y transformadas en unidades numéricas que van de 0 a 1020, antes de ser procesadas por la computadora. De este modo, los valores se encuentran proporcionalmente correlacionados con la velocidad y el

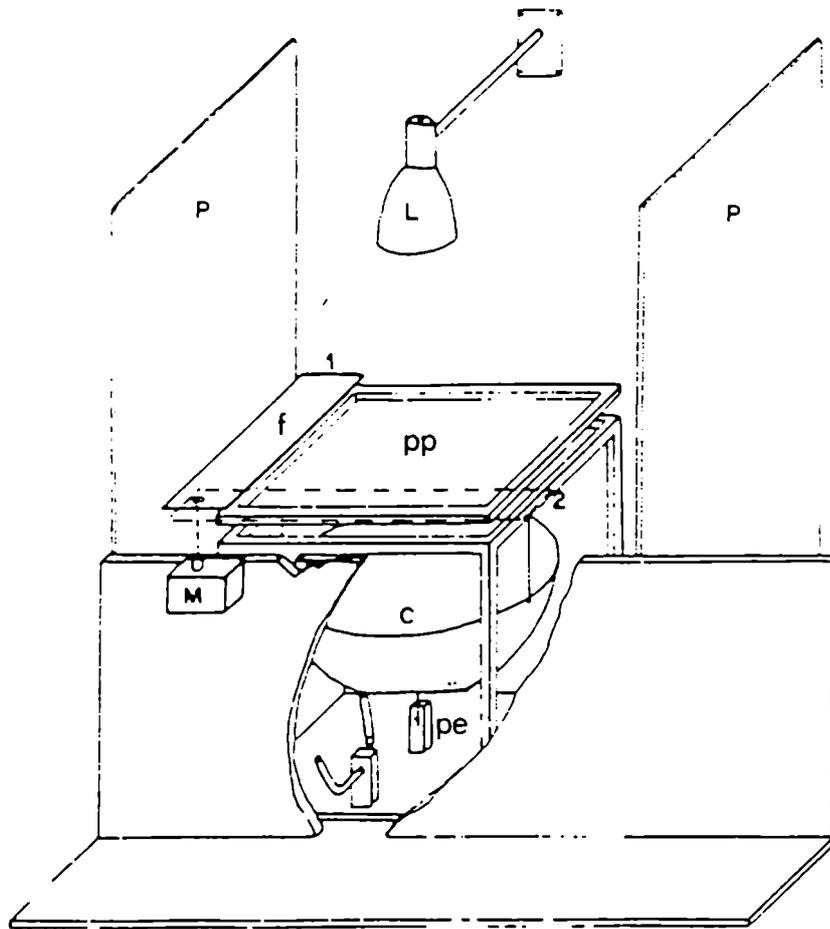


Fig. 2_ Esquema de un actómetro.

número de oscilaciones del contenedor durante los 9 seg. que dura el registro. La amplificación de los cambios de voltaje está calibrada con una ganancia que hace que los valores de registro se encuentren por debajo de las 1020 unidades. Un dispositivo de freno permite inmovilizar el recipiente mientras se realizan las maniobras de limpieza.

En la sala experimental los actómetros se hallan separados unos de otros por particiones laterales (P) y por una pared frontal. En orden a evitar un mal funcionamiento, las unidades son

calibradas periódicamente unas contra otras arrojando tres bolitas de metal al centro del recipiente durante los 9 seg. del registro. Este test revela que existe una gran uniformidad en el comportamiento de los actómetros (ej. $X = 513$ $EE = 9,48$ para $n = 40$ actómetros).

La respuesta de escape del cangrejo en el actómetro, consiste en corridas rápidas en un intento por alejarse de la figura pasante. Sin embargo, dado que la forma cóncava de las paredes del recipiente le impide trepar, cada carrera esta confinada al centro llano del recipiente, de modo que la respuesta de escape durante un ensayo aparece como una serie de huidas desde el centro hasta la base de las paredes.

Procedimientos experimentales

Reacción optomotora

Luego de preparados los animales eran colocados en el aparato. El protocolo experimental consistia en un periodo de adaptación de 15 min. seguido por 2 ensayos T1 y T2, separados por 30 min. Cada ensayo comenzaba con el encendido de la lámpara y del motor que hacia girar el cilindro durante 2 min., tomándose el registro correspondiente sólo al segundo minuto. La inyección era suministrada inmediatamente después de T1. Los datos de los diferentes grupos experimentales eran tomados en forma alternada

de manera de compensar cualquier posible efecto de la hora del día, o de los días en que se realizaron los registros.

Habituaación de la respuesta de escape

Una sesión de estimulación comprendía un número variable de ensayos suministrados con 27 o 180 seg. de intervalo entre ensayos y precedidos por 30 min. de adaptación en el actómetro. Cada ensayo duraba 9 seg. y consistía en el pasaje de la pantalla 4 veces sobre el actómetro, registrándose la actividad del animal durante todo el tiempo de duración del ensayo. Muchos experimentos constaron de dos sesiones de estimulación: una **sesión de entrenamiento** y una **sesión de test**, separadas por intervalos de 4 hs. 30 min. o de 24 hs. En las experiencias de 24 hs., los cangrejos eran alojados en contenedores plásticos individuales donde permanecían tanto las 24 hs. previas a la sesión de entrenamiento como las 24 hs. del intervalo entre sesiones. Los diseños experimentales incluyeron un **grupo experimental entrenado (grupo E)** y un **grupo control no entrenado (grupo O)**. El primero recibía estimulación durante la sesión de entrenamiento, el control en cambio, permanecía en los actómetros durante el tiempo correspondiente a la sesión pero sin ser estimulado con la pantalla pasante.

Dado que el número de actómetros era insuficiente para correr todos los animales de todos los grupos en cada experimento simultáneamente, fue necesario realizar réplicas. En cada una de éstas se trabajó con el mismo número de cangrejos por grupo, pero los animales correspondientes a un mismo grupo fueron colocados en

actómetros diferentes en cada repetición. Así, cualquier posible efecto de la hora del día, de los días o de diferencias entre los actómetros, fue compensado.

Detalles particulares serán considerados en cada experimento.

Drogas e inyecciones

En los experimentos del capítulo II, las inyecciones fueron administradas a través de una aguja crónicamente implantada en el cefalotórax a 3 mm. de profundidad, en una pequeña depresión especificada por la confluencia de las regiones protogástrica, mesogástrica y mesobranquial (Boschi, 1972), conectada a través de una cánula con una jeringa de 1 ml. sostenida por un soporte exterior (Fig. 1). Dicha técnica de inoculación fue la misma que la empleada en trabajos previos (Lozada y col., 1988; Maldonado y col., 1989) donde se demostró el efecto inhibitorio específico de la morfina sobre estímulos nociceptivos actuales y potenciales. En los experimentos restantes en cambio, los *Chasmagnathus* fueron inyectados empleando jeringas Hamilton de 1 ml., en el lado derecho de la región metabranquial, a través de la membrana que une el cefalotórax con el abdomen. Las agujas fueron preparadas con un tope que permitía una penetración de 4 mm. asegurando de este modo que la solución inyectada era liberada en el saco pericardial. El cambio de técnica se explica porque en los experimentos de reacción optomotora el animal permanece fijo en una misma posición o realiza movimientos lentos favoreciendo así el empleo de la inyección por

cánula; por el contrario, con la respuesta de escape iterativa, los frecuentes e intensos movimientos del animal complican la utilización de ese sistema. Experimentos destinados a evaluar ambas vías de administración revelaron que no existen diferencias en los efectos de las drogas empleadas. En el caso de *Pachygrapsus*, la inyección les fue suministrada en un metámero torácico a través de la membrana articular de uno de los pereiópodos, en la base de la coxa, una vía de administración muy utilizada en cangrejos. La razón para esta diferencia fue que se observaba una pérdida importante por reflujo cuando estos animales eran inyectados a través de la membrana cefalotorácico-abdominal. Las soluciones eran preparadas el mismo día del experimento utilizando una balanza de alta precisión y las dosis fueron calculadas de acuerdo al peso promedio de los animales. Las inyecciones consistieron de 100 µl. del vehículo (ClNa, 1,6 %) o de la solución de la droga utilizada. El clorhidrato de morfina fue provisto por Saporiti-Argentina y Carlo Erba-Italia; el naloxono y el ácido gama-aminobutírico (GABA) por Sigma Chemicals-USA.

Estadística

Para evaluar la retención de una respuesta habituada luego de un período entre sesiones, el método más correcto consiste en comparar el desempeño de los grupos control y experimental durante el test (Rescorla, 1988). A primera vista, podría parecer que una simple comparación de la intensidad total de la respuesta basta para obtener una evaluación acabada del fenómeno, sin embargo, con

este tipo de análisis se desperdicia mucha información adicional relacionada con el perfil de la curva. Por lo tanto, en aquellos experimentos destinados a estudiar características paramétricas de la habituación a largo término en especies diferentes (Capítulos V y VI), se emplearon métodos particulares, definiéndose parámetros especiales que se describen en los siguientes párrafos.

Han sido utilizados diversos procedimientos para destacar los parámetros relevantes de la curva de habituación. A este respecto, Petrinovich y Widaman (1984) argumentaron convincentemente en favor de la realización del análisis de regresiones individuales, obteniéndose una ecuación lineal para cada sujeto y luego un promedio de cada coeficiente que se utiliza como parámetro para caracterizar la curva. No obstante, una simple inspección de las curvas de habituación de los cangrejos en este trabajo, sugiere que la regresión lineal sobre los datos de todos los ensayos de una sesión podría ser inadecuada, debido a la existencia de una gran porción asintótica en la curva. En consecuencia, las curvas de habituación de ambas especies se analizaron del siguiente modo.

Se efectuaron análisis de regresión sucesivos: el primer análisis fue realizado incluyendo todos los ensayos de la sesión, el segundo omitiendo el primer ensayo, el tercero omitiendo los dos primeros ensayos, y continuando así hasta que se obtenía una pendiente que no era significativamente diferente a cero. Esta porción final de la curva, estadísticamente paralela al eje de las abscisas, fue considerada la porción asintótica y su valor promedio por ensayo y por animal fue llamado **valor asintótico**. El último ensayo de la porción de caída y por lo tanto el primer ensayo de la asintota, fue llamado **ensayo límite**, es decir, un ensayo

correspondiente al punto de inflexión de la curva que probó ser un rasgo distintivo para caracterizar el curso temporal de la respuesta. Un análisis de regresión lineal adicional, sobre los datos correspondientes a la porción de caída de la curva, esto es, desde el primer ensayo de la sesión hasta el ensayo límite, permitió estimar con un 95% de confianza, el error estándar del ensayo límite.

Así, los parámetros estimados para evaluar la retención de la habituación de largo término en estos experimentos fueron el valor asintótico, el ensayo límite y el nivel general de respuesta.

En todos los experimentos de esta tesis se trabajó con un gran número de datos que fueron analizados utilizando estadística paramétrica. Para las comparaciones se emplearon la prueba de Student y diversas versiones del análisis de la varianza (Anova), seguido en algunos casos por el test de comparaciones múltiples de Duncan.

CAPITULO I I

Acción opiácea central

Experimento 1

Para responder el interrogante acerca de si el efecto de la morfina sobre la respuesta de escape a un estímulo visual de peligro, es determinado por una acción a nivel central o a nivel periférico, la posibilidad ideal sería estudiar el efecto sobre la reacción de escape del cangrejo provocada por estímulos visuales no peligrosos. Lamentablemente tal experimento parece imposible de realizar ya que la respuesta de escape no puede ser evocada por estímulos visuales neutros. Sin embargo, se podría emplear una respuesta que, a pesar de no ser idéntica a la respuesta de escape, involucrara una considerable actividad motora aún sin ser inducida por estímulos de peligro. La respuesta que cumple con esta condición es la **reacción optomotora**. En los cangrejos, ella consiste en movimientos oculares tendientes a compensar los desplazamientos de la imagen sobre la retina generados cuando el animal se traslada.

El experimento fue diseñado para testear el efecto de las dosis mayores de morfina usadas en trabajos previos (ej. Maldonado y col., 1989) y que probaron tener un potente efecto inhibitorio sobre la respuesta de escape, aunque empleando como indicador la respuesta optomotora evocada por un campo visual de alto contraste

en rotación (Sandeman, 1977). Se cuantificó el efecto de la droga sobre la aferencia y/o eferencia del nistagmus (Erber y Sandeman, 1990) con una metodología que ha sido reiteradamente utilizada para evaluar la agudeza visual (Von Buddenbrock y Friedrich, 1933; Hassenstein, 1954; Neil, 1982).

Método

El cangrejo era asegurado en la pinza de sujeción en donde se le pegaba la banderita y se le implantaba la cánula. Luego la pinza con el cangrejo era montada dentro del cilindro y acomodada hasta lograr una posición que permitiese proyectar una buena señal sobre la fotocélula.

El intervalo entre los dos ensayos T1 y T2, correspondió al utilizado en trabajos previos en donde la morfina administrada 30 min. antes del test mostraba un potente efecto inhibitorio sobre estímulos nociceptivos actuales y potenciales (Lozada y col., 1988; Maldonado y col., 1989).

Los parámetros evaluados fueron la **frecuencia de respuesta (FR)**, medida como el número de picos de amplitud por ensayo; y la **amplitud de respuesta (AR)**, medida como el promedio de la amplitud de los picos por ensayo. En la figura 3 se puede ver un ejemplo del tipo de registros que se obtuvieron. Para el análisis de los datos se consideró el porcentaje relativo de respuesta del T2 con respecto al T1, es decir: $FR\% = FR2/FR1 \times 100$, y $AR\% = AR2/AR1 \times 100$. En experimentos pilotos con cangrejos no inyectados o inyectados con solución salina, ni la FR% ni la AR% mostraron ser

estadísticamente diferentes de 100%.

Se distribuyeron entonces 60 cangrejos al azar, en tres grupos de 20 cada uno: el grupo SALINA, inyectado con el vehículo; el grupo MP75, inyectado con 75 $\mu\text{g/g}$ de morfina; y el grupo MP100, inyectado con 100 $\mu\text{g/g}$ de morfina.

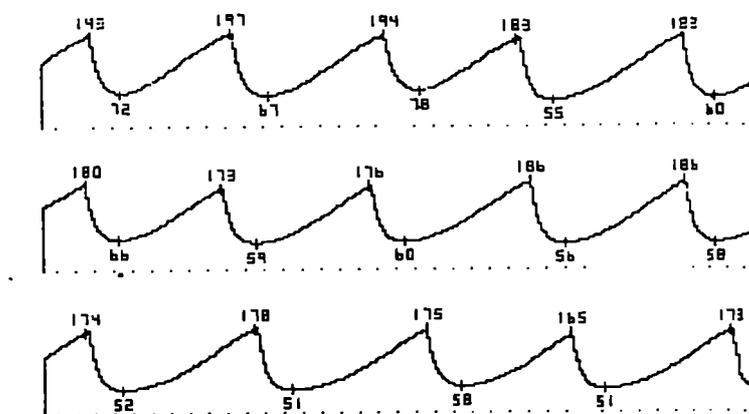


Fig. 3__ Registro de la respuesta optomotora. Los números indican los valores máximos y mínimos en la amplitud de los movimientos oculares.

Resultados y discusión

Un ANOVA de un factor realizado sobre los datos de los tres grupos no reveló diferencias significativas, tanto entre los valores de las medias de FR% ($F= 0,98$) que se muestran en la figura 4, como entre los de las medias de AR% ($AR%= 0,75$). Por lo tanto, ni la agudeza visual de *Chasmagnathus* ni la capacidad motora de sus pedúnculos oculares son significativamente afectadas por inyecciones de morfina de hasta 100 $\mu\text{g/g}$.

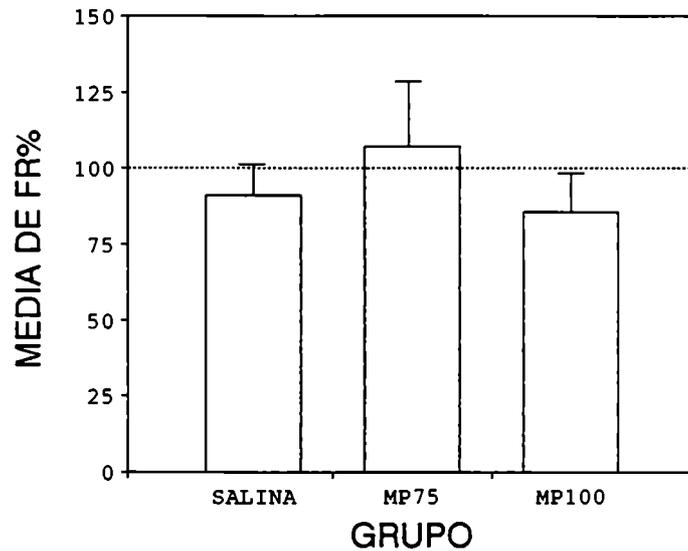


Fig. 4__ Efecto del pretratamiento con morfina sobre la frecuencia de movimientos de los pedúnculos oculares. La ordenada representa el promedio del porcentaje individual de variación de la respuesta.

Este resultado demuestra que el efecto inhibitorio de la morfina sobre la respuesta de escape a estímulos visuales de peligro (Maldonado y col., 1989), difícilmente pueda deberse a un perjuicio sobre la agudeza visual, es decir sobre la vía aferente.

Experimento 2

No obstante los resultados del experimento anterior, la inocuidad de la morfina sobre movimientos tan delicados como los del pedúnculo ocular, no permiten descartar completamente un potencial efecto sobre la capacidad motora general.

Este experimento se realizó entonces con la intención de investigar el posible efecto detrimental de la morfina sobre la capacidad locomotora del animal.

Método

Fue similar al empleado en el experimento 1 con algunas modificaciones en el dispositivo experimental y en el procedimiento. Un cilindro transparente de 20 cm. de alto con una base cóncava de 15 cm. de diámetro dividida por 8 líneas de marca a 45° unas de otras, reemplazó todo el dispositivo montado sobre el disco d1 (Fig. 1b). Los pedúnculos oculares del cangrejo eran fijados en su posición vertical por medio de una pequeña cantidad de cemento anaeróbico, y el animal era luego ubicado en el cilindro transparente. De este modo, la respuesta optomotora se expresaba ahora por la rotación completa del animal en su intento por compensar los movimientos del tambor de estimulación. El registro se hizo por simple observación, contabilizando el número de marcas de la base del cilindro que eran cruzadas por el ojo izquierdo del cangrejo durante el segundo minuto de cada ensayo. Los resultados se expresaron en valores relativos del porcentaje de la **respuesta de rotación** entre T2 y T1, es decir, $R\% = R2/R1 \times 100$.

Se distribuyeron al azar 60 cangrejos en tres grupos de 20 cada uno: el grupo SALINA, inyectado con el vehículo; el grupo MP75, inyectado con 75 µg/g de morfina; y el grupo MP100, inyectado con 100 µg/g de morfina.

Resultados y discusión

La figura 5 ilustra los resultados obtenidos. Un ANOVA realizado sobre los datos de los tres grupos no reveló diferencias

significativas entre las medias de los porcentajes de rotación. Así, las dosis que probaron no tener efecto sobre el nistagmus optomotor medido por los desplazamientos del pedúnculo ocular, mostraron asimismo no afectar la capacidad locomotora medida por la respuesta de rotación.

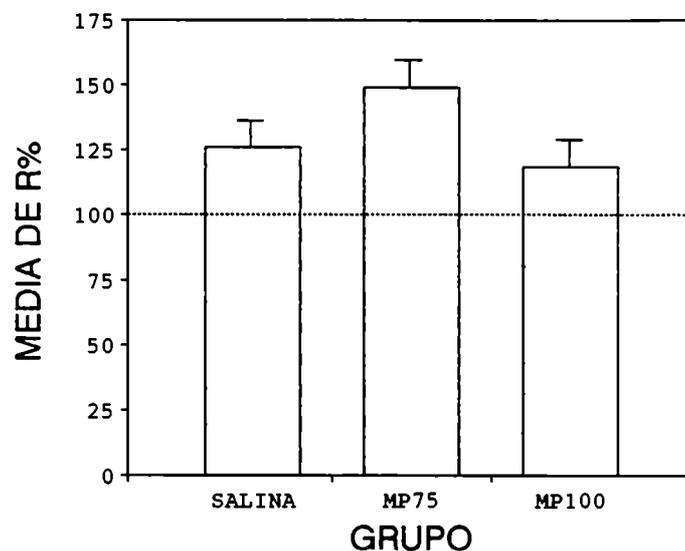


Fig. 5__ Efecto del pretratamiento con morfina sobre la respuesta de rotación. La ordenada representa el promedio del porcentaje individual de variación.

Los resultados de los experimentos 1 y 2 parecen descartar la explicación que basa el efecto de la morfina sobre la reactividad a estímulos visuales de peligro, simplemente por una acción detrimental sobre la agudeza visual o la capacidad locomotora. Como aquí se demuestra, las mayores dosis que probaron afectar la respuesta de escape a una pantalla movida horizontalmente 30 min. después de la inyección (Maldonado y col., 1989), no presentaron efecto alguno al ser evaluadas sobre respuestas evocadas por un

estímulo visual inocuo. Por lo tanto, podría concluirse que el efecto de la morfina depende específicamente del tipo de estímulo visual presentado. En otras palabras, que de las respuestas inducidas por estímulos visuales, la morfina parece inhibir tan sólo aquellas que son evocadas por estímulos que señalizan algún peligro para el animal.

CAPITULO III

Efecto opiáceo modulador

Experimento 3a

Dado que los resultados de los experimentos 1 y 2, sugieren que la acción inhibitoria de la morfina sobre la respuesta de escape es una acción central, y debido a que ha sido propuesto un mecanismo opiáceo endógeno que actuaría durante la habituación de corto término (Romano y col. 1990), pareció relevante investigar los efectos del pretratamiento con morfina sobre dicho proceso. El experimento 3 estuvo orientado a estudiar esta cuestión.

Un análisis de las alteraciones provocadas por la morfina en el curso temporal de la habituación, podía ayudar a entender los mecanismos que subyacen a los cambios en la respuesta durante la estimulación repetida. A este respecto el modelo de Davis y File (ver págs. 10 y 33) predice que cuando el efecto de la administración de una droga se manifiesta por un cambio en la pendiente de la curva respuesta-ensayo, tal efecto es debido a una acción sobre la vía refleja estímulo-respuesta. Por el contrario, cuando el efecto se revela por un desplazamiento paralelo de toda la curva, entonces debe atribuirse a una acción sobre un sistema modulador.

Método

El aparato utilizado fue el Universal. Cada cangrejo fue trasladado desde el cangrejario a la sala experimental e inyectado 30 min. antes del comienzo de una sesión de 15 ensayos con 27 seg. de intervalo entre ensayos. Se distribuyeron al azar 80 cangrejos en dos grupos de 40 cada uno: el grupo SALINA fue inyectado con el vehículo y el grupo MP100 con 100 µg/g de morfina.

Resultados y discusión

La figura 6 muestra las curvas respuesta-ensayo de ambos grupos. El análisis se restringió a los 6 primeros ensayos dado que la porción de caída de la curva finaliza aproximadamente en los ensayos 6 ó 7, a partir de los cuales se alcanza un nivel asintótico estable. Un ANOVA mixto de medidas repetidas (2 x 6) realizado con estos datos reveló un efecto principal significativo de la droga, $F(1,78) = 28,8$ $P < 0,005$; un efecto significativo de los ensayos, $F(5,390) = 90,9$ $P < 0,005$; y una interacción droga x ensayo significativa, $F(5,390) = 23,4$ $P < 0,005$. Un análisis basado en las regresiones lineales calculando la ecuación para cada sujeto de cada grupo, rindió una pendiente promedio de -133,9 (EE= 9,9) para el grupo SALINA y de -50,5 (EE= 8.0) para el grupo MP100, probando así una diferencia intergrupala altamente significativa, $t(78) = 6,6$ $P < 0,005$.

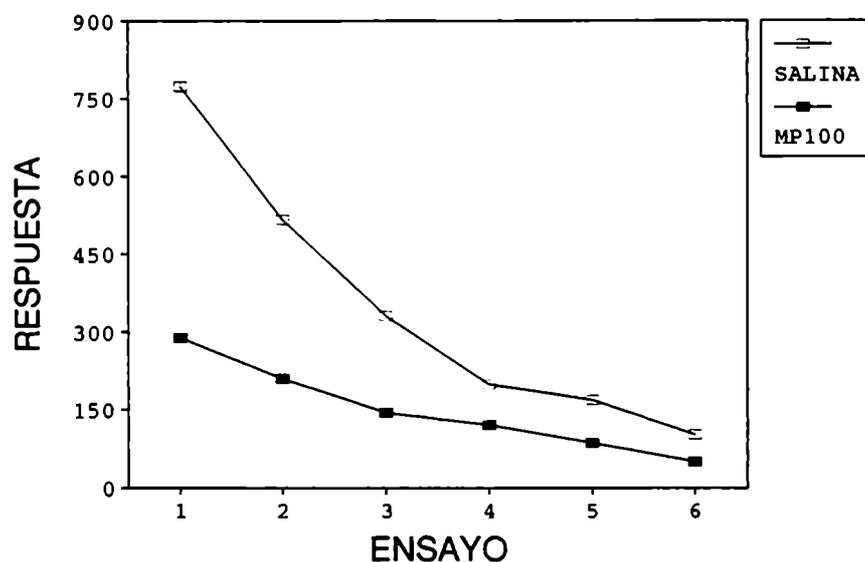


Fig. 6 _ Efecto del pretratamiento con morfina (100 $\mu\text{g/g}$) sobre la habituación de corto término. La ordenada representa el promedio de los valores de respuesta por ensayo.

El efecto de una dosis de 100 $\mu\text{g/g}$ de morfina no se manifestó por un desplazamiento paralelo de la curva sino que consistió en una pronunciada reducción de la pendiente de caída. Sin embargo, este hecho podría ser el resultado de un enmascaramiento producido por la combinación de una fuerte acción depresiva de la dosis, conjuntamente con un efecto de piso que limita la posibilidad de un mayor descenso de la respuesta.

Experimento 3b

Para evaluar la posibilidad mencionada en el párrafo anterior, se repitió el mismo experimento con una dosis más pequeña de

morfina. Se distribuyeron al azar 80 cangrejos en dos grupos de 40 cada uno: el grupo SALINA fue inyectado con el vehículo y el grupo MP75 con 75 $\mu\text{g/g}$ de morfina.

Resultados y discusión

La figura 7 muestra la respuesta de ambos grupos. El análisis es restringido, al igual que en el experimento anterior, a los 6 primeros ensayos. La observación de estas curvas sugiere que esta

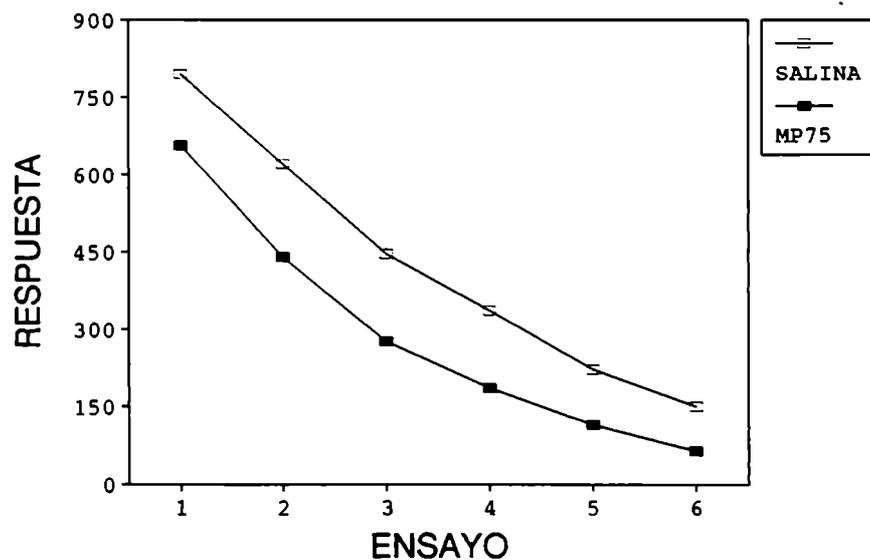


Fig. 7__ Efecto del pretratamiento con morfina (75 $\mu\text{g/g}$) sobre la habituación de corto término. La ordenada representa el promedio de los valores de respuesta por ensayo.

dosis de morfina provoca un desplazamiento paralelo de la misma. Un ANOVA mixto de medidas repetidas confirmó tal conclusión revelando un efecto significativo de la droga, $F(1,78) = 11,3 P <$

0,005; y un efecto significativo de los ensayos, $F(5,390)= 139,5$ $P < 0,005$; pero sin mostrar efecto significativo en la interacción droga x ensayo, $F(5,390)= 0,87$. El análisis de regresión individual realizado sobre ambos grupos manifestó una media de pendiente de $-129,5$ ($EE= 9,3$) para el grupo SALINA contra una media de $-114,9$ ($EE= 9,5$) para el grupo MP75. Un t-test indicó que estas diferencias no eran significativas, $t(78)= 1,1$.

De acuerdo a la proposición de Davis y File, este desplazamiento paralelo en el curso de la respuesta, como resultado de la administración de $75 \mu\text{g/g}$ de morfina 30 min. antes del entrenamiento, sería indicativo de una acción moduladora de la droga puesto que la habituación de corto término, expresada por su pendiente negativa, no sería en sí misma alterada. De acuerdo a ese modelo, debería esperarse una misma pendiente, independientemente de la dosis de la droga. Sin embargo, tal constancia no pudo ser demostrada cuando se empleó una dosis de $100 \mu\text{g/g}$, debido muy probablemente a las limitaciones impuestas por el efecto de piso.

CAPITULO IV:

Interferencia opiácea sobre el vínculo señal-significado

Experimento 4

Existen al menos dos explicaciones alternativas acerca de la acción opiácea moduladora central propuesta en los capítulos precedentes. Una de ellas fue expresada dentro de la hipótesis general de trabajo que originó esta tesis; según ella, el efecto observado de la morfina sería el resultado de una interferencia en la decodificación de la señal de peligro, es decir de una reducción en la magnitud del peligro que el estímulo visual naturalmente señala. La otra posibilidad, sería que el efecto de la morfina fuese la consecuencia de un aumento en el umbral de respuesta a estímulos visuales de peligro, aunque sin ninguna alteración de las capacidades perceptivas. En efecto, esta última posibilidad resulta consistente con la impresión de que dos estrategias diferentes parecen ser adoptadas por los animales, de acuerdo al período del año, como respuesta al estímulo de peligro. Los cangrejos capturados durante los meses de verano, otoño e invierno presentan una rápida reacción en la prueba de aceptación (pág. 40) y suelen ejecutar una intensa respuesta de escape ante la presentación de la figura pasante. Por el contrario, los animales capturados en

primavera, a pesar de reaccionar correctamente en dicha prueba, suelen presentar una pobre respuesta de escape. En su lugar, estos animales responden al estímulo visual de peligro adoptando un comportamiento de características crípticas: una respuesta de retracción que consiste en apoyar el cuerpo contra el piso, flexionar las quelas y patas caminadoras y recoger los pedúnculos oculares. Este comportamiento es observado fundamentalmente durante los primeros ensayos y desaparece conforme progresa el entrenamiento, sugiriendo así que también puede habituarse. En consecuencia, los cangrejos presentarían durante la primavera un incremento en el umbral para la respuesta de escape, aunque sin alteraciones en las capacidades perceptivas.

Para evaluar cual de las dos explicaciones anteriores posee mayor valor predictivo, se realizó un experimento destinado a investigar el efecto del pretratamiento con morfina sobre la habituación de largo término. Se hicieron las siguientes predicciones: un resultado que mostrase una falta de habituación a largo término apoyaría la hipótesis de que la morfina reduce el significado de peligro del estímulo perjudicando la magnitud de la estimulación, por el contrario, un resultado que revelase retención y por ende adquisición de la habituación sería indicativo de un efecto sobre el umbral de respuesta, ya que, aunque se manifieste un bajo nivel de reactividad durante el entrenamiento, el estímulo debe estar presente con toda su significación para lograrse el aprendizaje. El experimento 4 fue conducido entonces para estudiar el efecto de la morfina sobre la habituación de largo término.

Método

El procedimiento básico fue similar al utilizado en el experimento 3, aunque aquí se trabajó con dos sesiones de 15 ensayos cada una, la sesión de entrenamiento y la sesión de test, separadas por un intervalo de retención. Una única inyección del vehículo o la droga fue administrada 30 min. antes de la sesión de entrenamiento.

Experimentos preliminares sobre grupos de animales inyectados con solución salina y otros con 100 µg/g de morfina y testeados tiempo después con una única sesión de 15 ensayos, mostraron que el efecto inhibitorio desaparecía recién al cabo de 4 hs. 30 min. Por lo tanto éste fue el período empleado como intervalo de retención.

Se distribuyeron al azar 160 cangrejos asignados en igual número a cada celda de un diseño factorial 2 x 2, en donde los factores fueron la droga (SALINA= el vehículo, MP= 100 µg/g de morfina) y la sesión de entrenamiento (O= sin sesión de entrenamiento, E= con sesión de entrenamiento). De modo que se conformaron cuatro grupos: SALINA-O, SALINA-E, MP-O Y MP-E. Los animales permanecieron en el aparato durante todo el intervalo de retención.

Resultados y discusión

Una comparación entre el desempeño de SALINA-E y MP-E durante la sesión de entrenamiento reveló un resultado similar al obtenido

en el experimento 3a, hubo un marcado efecto inhibitorio del pretratamiento con morfina sobre el nivel de respuesta de la sesión de entrenamiento registrado 30 min. luego de la inyección. Por otro lado, los niveles de respuesta de SALINA-0 y MP-0 en la sesión de test no fueron significativamente diferentes, $F(1,78) = 0,45$; es decir que el efecto inhibitorio de la morfina estuvo totalmente disipado al momento del test.

La figura 8a representa la respuesta de los grupos SALINA-0 y SALINA-E durante la sesión de test. Un Anova mixto de medidas repetidas (2 x 5) realizado sobre estos datos reveló un efecto significativo del factor entrenamiento, $F(1,78) = 17,0$ $P < 0,005$; del factor bloque de ensayos, $F(4,312) = 227,4$ $P < 0,005$; y de la interacción entrenamiento x bloque de ensayos, $F(4,312) = 11,6$ $P < 0,005$. El desempeño de los grupos MP-0 y MP-E se ilustra en la figura 8b. Las curvas resultaron ser similares entre sí ya que el Anova no mostró efecto significativo ni para el factor de entrenamiento $F(1,78) = 0,96$; ni para el factor de la interacción entrenamiento x bloque de ensayos, $F(4,312) = 1,4$.

Así, la sesión de entrenamiento de 15 ensayos produjo una evidente habituación de largo término distinguible luego de un intervalo de 4 hs. 30 min. (grupo SALINA-E). Por el contrario, la exposición de los animales inyectados con morfina 30 min. antes del entrenamiento a una idéntica sesión de estimulación (grupo MP-E), no provocó una reducción de la respuesta al cabo del mismo intervalo de retención. Esta marcada diferencia, a pesar de la completa simetría en las condiciones de estimulación, es consistente con la hipótesis que atribuye el efecto de la morfina

sobre las respuestas de escape inducidas por estímulos visuales de peligro, a un debilitamiento en la unión entre el estímulo y su significado innato, es decir, a una reducción en la magnitud del peligro que el estímulo normalmente señala.

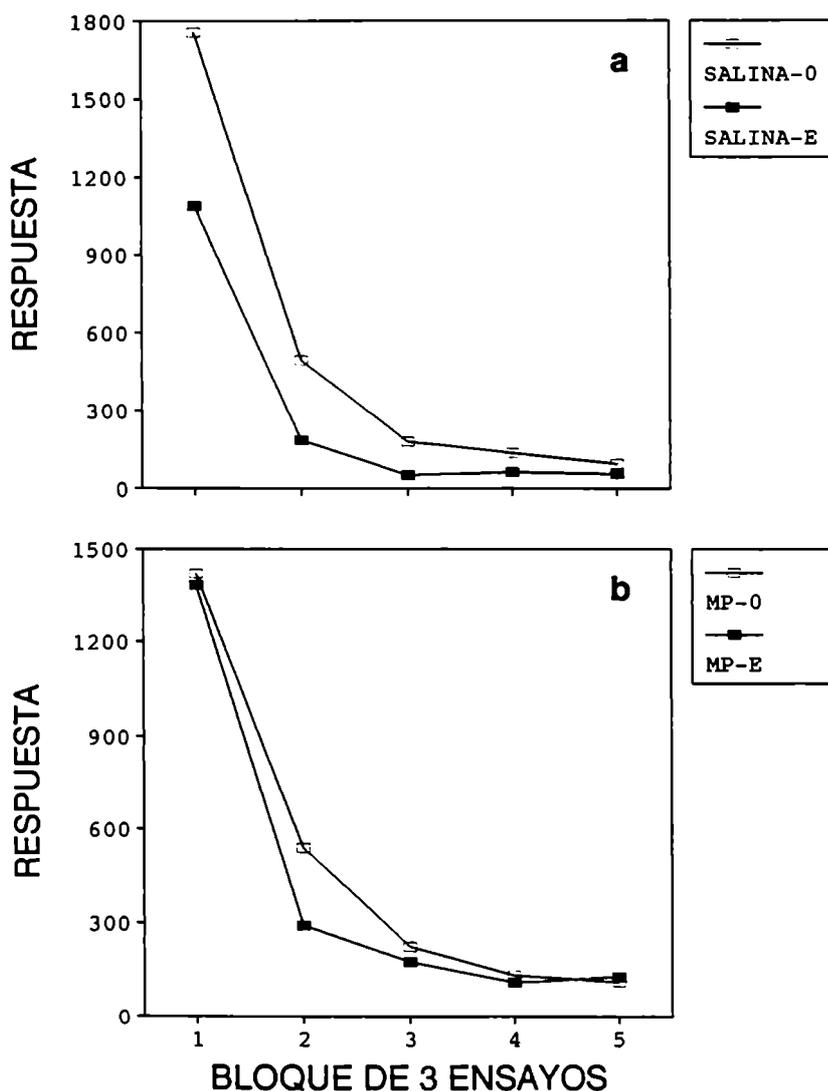


Fig. 8 Desempeño de los grupos inyectados con solución salina (a) y con 100 µg/g de morfina (b) 30 min. antes de la sesión de entrenamiento, durante la sesión de test de 15 ensayos. La ordenada indica el promedio de los valores acumulados cada 3 ensayos por cada animal. Los grupo 0 no recibieron entrenamiento, los grupos E recibieron un entrenamiento de 15 ensayos. Intervalo de retención: 4 hs. 30 min.

La falta de adquisición de la habituación de largo término, sin embargo, aun podría deberse a un efecto decremental de la morfina sobre el nivel de respuesta durante el entrenamiento y no

a un perjuicio sobre la percepción del significado del estímulo. Es decir, podría suponerse que el efecto de la morfina es aumentar el umbral de respuesta a la señal de peligro y reducir por ende la ejecución de la respuesta de la que dependería el aprendizaje.

Numerosos estudios parecen no apoyar esa hipótesis en cuanto sostienen la noción de que el estímulo y no la respuesta, es el factor crítico en este tipo de aprendizaje. En efecto, casos de habituación independiente de la respuesta han sido varias veces informados (Applewhite y col., 1969; Davis y Wagner, 1967; Peeke y Veno, 1976), y las instancias de la habituación subcero (Thompson y Spencer, 1966), apoyan la proposición de que la adquisición puede tener lugar aún cuando la respuesta estuviese ausente o fuertemente deprimida durante el entrenamiento. Por lo tanto, si se lograra evidencia experimental de que tampoco en el presente caso la respuesta es un factor crítico para adquirir la habituación a largo término, podría descartarse que el efecto de la morfina sobre la adquisición fuese debido a un aumento en el umbral de respuesta.

Con tal propósito, resultó promisorio comparar el efecto de la morfina con aquel obtenido empleando una droga que, sin perjudicar la visión, inhibiera la respuesta independientemente del tipo de estímulo visual presentado, es decir, una droga que actúe preponderantemente sobre las vías eferentes. A este fin, GABA pareció ser un buen candidato debido a su reconocida acción como neurotransmisor de las motoneuronas inhibitorias en crustáceos (Atwood, 1982). Consecuentemente, los siguientes experimentos fueron conducidos para evaluar el efecto del pretratamiento con GABA tanto sobre la respuesta de escape a la estimulación de peligro repetida como sobre la habituación de largo término.

Experimento 5

El propósito de este experimento fue estudiar el efecto del GABA sobre la respuesta de escape a un estímulo visual de peligro.

Método

Se inyectaron 160 cangrejos 30 min. antes del comienzo de una sesión de estimulación de 15 ensayos con intervalos entre ensayos de 180 seg. Cinco grupos de 32 cangrejos fueron formados al azar y cada uno recibió una dosis diferente de GABA: 0,0; 0,06; 0,6; 6,0 y 60 $\mu\text{g/g}$ respectivamente.

Resultados y discusión

La figura 9 representa los niveles de respuesta de cada grupo. El GABA produjo una reducción dosis-dependiente en la reactividad de los cangrejos al estímulo de peligro. Un Anova efectuado sobre estos datos mostró un efecto significativo de la dosis $F(4,155) = 4,4$ $P < 0,01$; y el test de Duncan reveló diferencias significativas entre el grupo de solución salina (0,0 $\mu\text{g/g}$) y los grupos de 60; 6,0; y 0,6 $\mu\text{g/g}$ de GABA ($P < 0,001$; $P < 0,01$; y $P < 0,05$; respectivamente), pero no entre el grupo control y el de 0,06 $\mu\text{g/g}$ de GABA. Un hecho inesperado lo constituyó el gran número de cangrejos que pocos minutos después de la inyección de 60 $\mu\text{g/g}$ de GABA, se desprendían de sus quelas y algunas de sus patas. Tal

efecto fue raramente visto con la dosis de 6,0 $\mu\text{g/g}$. Este fenómeno de autotomía no había sido observado previamente en nuestro laboratorio aún cuando se utilizaron dosis altas de otras drogas (morfina, serotonina, benzodiazepinas, inhibidores de la síntesis proteica, etc.), lo que induce a especular sobre la posibilidad de un efecto específico del GABA sobre tal comportamiento.

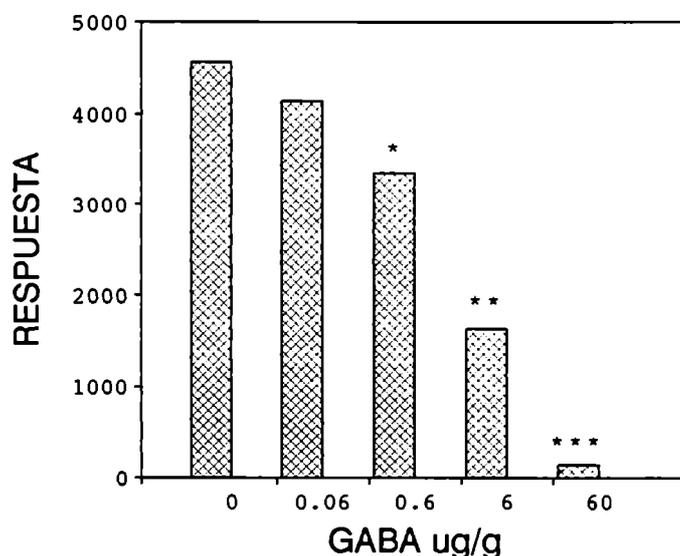


Fig. 9 — Reducción dosis dependiente de la respuesta de escape producida por la administración de GABA. La ordenada indica el promedio de los valores acumulados por cada animal durante 15 ensayos. Los asteriscos señalan diferencias significativas entre el grupo control y cada uno de los demás grupos (test de Duncan): * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$.

En base al resultado del presente experimento, se concluye que la administración de GABA al igual que la de morfina (Maldonado y col., 1989) produce en cangrejos intactos una reducción de la respuesta de escape dependiente de la dosis.

Experimento 6

Este experimento estuvo orientado a conseguir una drástica reducción de la reactividad durante el entrenamiento por medio de la administración de GABA, con la intención de evaluar el efecto que la falta de ejecución de la respuesta tiene sobre la adquisición de la habituación de largo término.

Método

Durante la realización de experimentos pilotos se encontró que una dosis de 9 $\mu\text{g/g}$ de GABA administrada 5 min. antes del entrenamiento, produce una enorme reducción de la reactividad a la figura pasante, en tanto que provoca pocos casos de autotomía. Otros experimentos pilotos revelaron que el efecto inhibitorio de dicha dosis desaparecía completamente a las 4 hs. 30 min.

Por lo tanto, en el presente experimento los animales fueron sometidos a un entrenamiento de 15 ensayos con intervalos entre ensayos de 180 seg., seguido, 4 hs 30 min. más tarde, por un test de 3 ensayos, es decir, usando un diseño similar al del experimento 4. Las soluciones de salina o GABA fueron administradas 5 min. antes de la sesión de entrenamiento.

Ciento veinte cangrejos fueron distribuidos al azar, en igual número a cada celda de un diseño factorial 2 X 2, donde los factores fueron la droga (SALINA= el vehículo, GABA= 9 $\mu\text{g/g}$) y el entrenamiento (0= sin entrenamiento, E= con entrenamiento). Se formaron así cuatro grupos: SALINA-0, SALINA-E, GABA-0 y GABA-E.

Resultados y discusión

La figura 10a muestra las curvas de los valores de respuesta contra los ensayos, de los grupos SALINA-E y GABA-E durante el entrenamiento. El GABA redujo drásticamente la respuesta, observándose que la mayor parte de los cangrejos no respondió durante toda la sesión de entrenamiento.

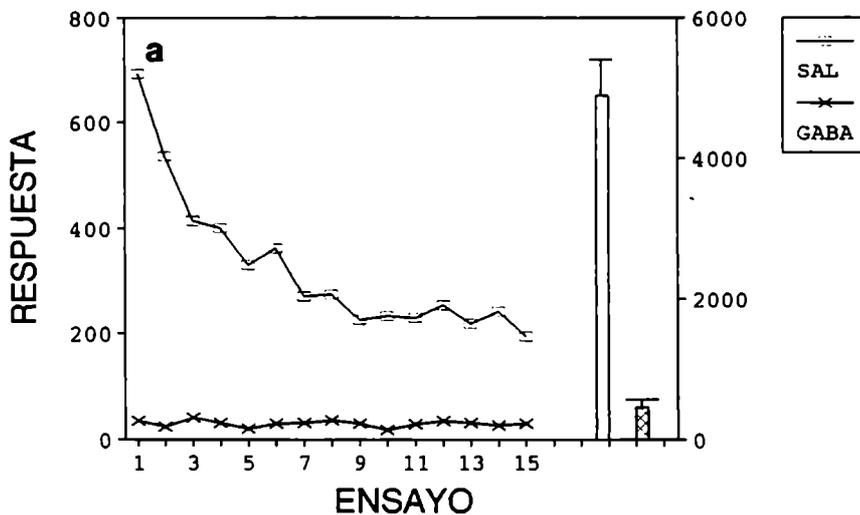
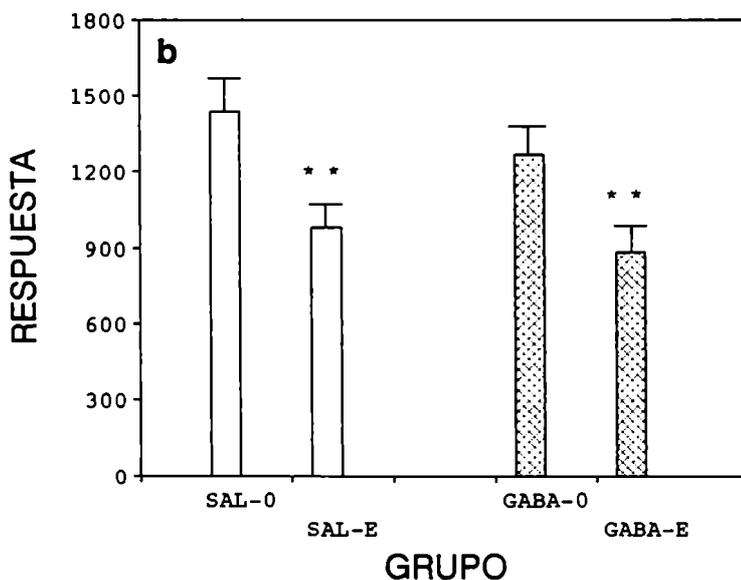


Fig. 10__ La administración de GABA inhibe la respuesta al estímulo de peligro durante el entrenamiento sin alterar la habituación de largo término. (a) Resultados de la sesión de entrenamiento. La ordenada izquierda corresponde al promedio de respuesta por ensayo. La ordenada derecha representa el promedio de los valores acumulados durante 15 ensayos por cada animal (barras). (b) Resultados de la sesión de test. La ordenada indica el promedio de los valores acumulados de los 3 ensayos del test por cada animal. Los grupos 0 no recibieron entrenamiento, los grupos E recibieron un entrenamiento de 15 ensayos. Intervalo de retención: 4 hs. 30 min. ** Diferencias significativas entre los grupos SAL-0 Y SAL-E o GABA-E (test de Duncan $P < 0,01$).



La figura 10b presenta los valores medios de respuesta para cada grupo durante la sesión de test. De la inspección de esta figura surgen tres puntos a destacar. Primero, luego de 4 hs. 30 min. de intervalo, el efecto inhibitorio del pretratamiento con GABA estuvo totalmente disipado, es decir que el nivel de respuesta del grupo GABA-0 fue igual al del grupo SALINA-0. Segundo, como es usual, el nivel de respuesta del grupo SALINA-E es menor que el del grupo SALINA-0, sugiriendo que la habituación adquirida durante el entrenamiento persiste luego del intervalo de retención. Tercero, el nivel de respuesta del grupo GABA-E es menor que el del grupo GABA-0, indicando que una habituación de largo término fue adquirida durante el entrenamiento a pesar de que la respuesta había estado casi completamente suprimida en esa sesión. Coincidentemente, un Anova de un factor realizado sobre esos datos mostró diferencias significativas $F(3,116) = 6,97$ $P < 0,005$; y el test de Duncan probó diferencias significativas entre los grupos SALINA-0 y SALINA-E o GABA-E, pero no entre SALINA-0 y GABA-0.

Así, los cangrejos pueden adquirir una habituación de largo término sin desplegar una respuesta de escape durante el entrenamiento, probando que tal falta de respuesta debida a la acción del GABA, no es causada por una interferencia en el proceso de decodificación de la señal. Estos resultados apoyan la idea de que la respuesta no es un factor crítico para la formación de la habituación de largo término.

El pretratamiento con morfina inhibe la respuesta (experimentos 3a y 3b), pero a diferencia del GABA, impide la adquisición de la habituación de largo término (experimento 4). Por lo tanto, estas drogas parecen deprimir la respuesta de escape

durante el entrenamiento actuando de manera diferente. El GABA, afectando vías eferentes sin influir en el procesamiento perceptivo del estímulo; y la morfina, alterando este procesamiento pero sin afectar la capacidad motora.

Experimento 7

Resultados previos de nuestro laboratorio (Lozada y col., 1990) sugieren que un entrenamiento de 15 ensayos es el mínimo confiable para garantizar una retención de la habituación por 24 hs. Coincidentemente, experimentos preliminares demostraron que cuando la sesión de entrenamiento es reducida en unos pocos ensayos, se presentan casos de falta de retención en el test. Tal efecto puede ser interpretado de acuerdo a la hipótesis antes mencionada, es decir, por una reducción en la cantidad de estimulación más que por una disminución en la cantidad de respuesta, de modo que un pequeño efecto depresivo de la morfina sobre el nivel de respuesta debería ser suficiente para debilitar la retención. Por lo tanto, el presente experimento fué conducido para comparar el efecto de GABA y morfina sobre la habituación de largo término, cuando las dosis de las drogas, el intervalo entre la inyección y el entrenamiento y los intervalos entre ensayos, estuvieron calibrados para producir una ligera inhibición, equivalente entre ambas drogas, durante el entrenamiento. En otras palabras, para poner a prueba la hipótesis de que a pesar de un efecto similar sobre la respuesta, la morfina, pero no el GABA, perjudica la habituación de largo término.

Método

Experimentos pilotos demostraron que 6 $\mu\text{g/g}$ de GABA y 100 $\mu\text{g/g}$ de morfina inyectados 30 min. antes del primer ensayo de entrenamiento, inducían una reducción similar de la respuesta durante una sesión de 15 ensayos con intervalos entre los estímulos de 180 seg.

El presente experimento constó de dos sesiones separadas por un intervalo de retención de 24 hs.: una sesión de entrenamiento de 15 ensayos y una sesión de test de 3 ensayos. Se distribuyeron al azar 204 cangrejos en seis grupos de 34 animales cada uno: SAL-E, inyectado con el vehículo; MP-E, con 100 $\mu\text{g/g}$ de morfina; GABA-E, con 6 $\mu\text{g/g}$ de GABA; y tres grupos 0 (SAL-0, MP-0 y GABA-0) inyectados con las respectivas soluciones pero que durante el entrenamiento no recibieron la estimulación con la figura pasante.

Resultados y discusión

La figura 11a ilustra el desempeño de los cangrejos entrenados (SAL-E, MP-E y GABA-E) durante la sesión de entrenamiento.

De acuerdo a lo esperado, la respuesta del grupo GABA-E fue mucho mayor que la del grupo correspondiente en el experimento 6, dado que aquí se inyectaron 6 en lugar de 9 $\mu\text{g/g}$, con una adaptación pre-entrenamiento de 30 min. en lugar de 5 min. Por otra parte, la respuesta del grupo MP-E fué sustancialmente mayor que la obtenida con la misma dosis en el experimento 3, atribuyéndose esta diferencia al hecho de que aquí se empleó un intervalo

interestimulo de 180 seg. en vez de 27 seg. O sea que mientras en el experimento 3 la estimulación se presentó entre 30 y 38 min. después de la inyección, en el presente experimento tuvo lugar entre 30 y 75 min., razón por la cual la disipación del efecto de

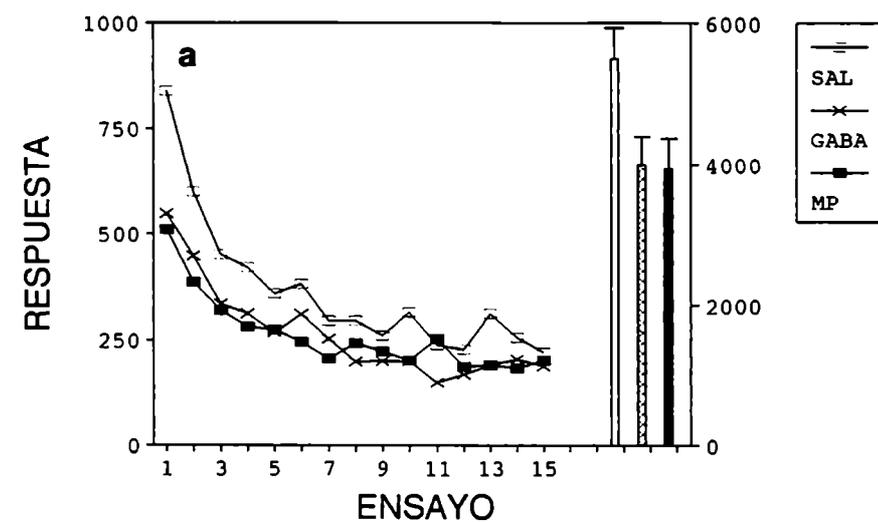
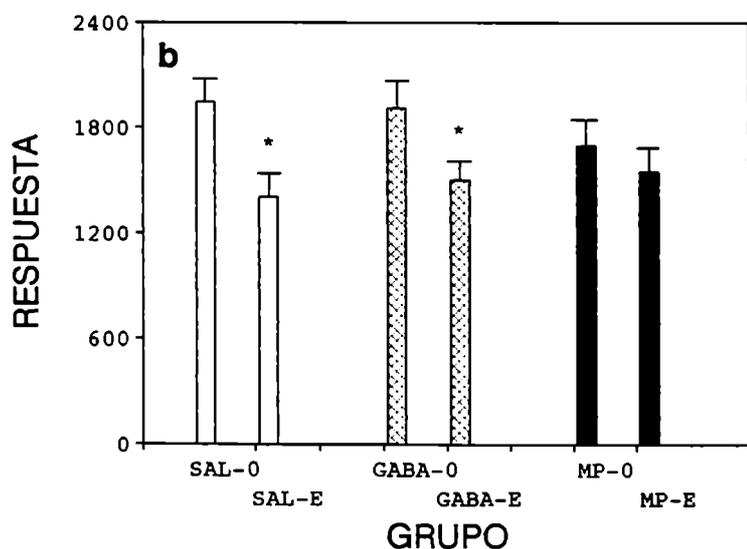


Fig. 11 Efecto de morfina y GABA: a pesar de deprimir en forma equivalente la respuesta durante el entrenamiento, sólo la morfina afectó la habituación de largo término. (a) Resultados de la sesión de entrenamiento. La ordenada izquierda corresponde al promedio de respuesta por ensayo. La ordenada derecha representa el promedio de los valores acumulados durante 15 ensayos por cada animal (barras). (b) Resultados de la sesión de test. La ordenada indica el promedio de los valores acumulados de los 3 ensayos del test por cada animal. Los grupo 0 no recibieron entrenamiento, los grupos E recibieron un entrenamiento de 15 ensayos. Intervalo de retención: 24 hs. * Diferencias significativas entre SAL-0 vs. SAL-E, o vs. GABA-E (test de Duncan $P < 0,05$).



la droga durante el entrenamiento resultó aquí más evidente (Lozada y col., 1988). Un Anova realizado sobre los valores acumulativos de los 15 ensayos (Fig. 11a) reveló un efecto significativo,

$F(2,117) = 3,1$ $P < 0,05$; y un test de Duncan mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre SAL-E vs. MP-E, o vs. GABA-E, pero no entre los grupos tratados con droga.

El Anova realizado sobre datos del test (figura 11b) indicó una diferencia significativa entre grupos, $F(5,198) = 2,8$ $P < 0,025$; y el Duncan mostró que la diferencia ($P < 0,05$) se hallaba entre SAL-0 vs. SAL-E o vs. GABA-E, pero no entre SAL-0 vs. GABA-0, o vs. MP-0, o vs. MP-E.

Entonces, la adquisición de la habituación de largo término a un estímulo visual de peligro, se muestra abolida por un pequeño efecto depresivo de la morfina sobre la respuesta de escape durante el entrenamiento, pero no por un efecto equivalente del pretratamiento con GABA.

Experimento 8

Aunque los resultados anteriores apoyan la hipótesis de que la morfina inhibe la formación de la habituación de largo término por interferir el procesamiento decodificador del estímulo, existe aún otra hipótesis alternativa. Podría argüirse que la morfina reduce el nivel de respuesta al estímulo de peligro pero sin interferir con el procesamiento de la información, explicándose la abolición de la retención a largo término, no por una falla en la adquisición de la habituación sino, por un efecto amnésico (una disrupción en el almacenaje o una falla en la recuperación). El experimento 8 se realizó para sopesar esta alternativa.

Método

Se realizaron dos sesiones separadas por 24 hs.: una sesión de entrenamiento de 15 ensayos con intervalos entre ensayos de 180 seg. y una sesión de test de 3 ensayos. En este caso las inyecciones fueron administradas inmediatamente después del último ensayo de la sesión de entrenamiento o a un tiempo equivalente en el caso de los animales que no recibieron estimulación (grupos 0).

Ciento sesenta cangrejos fueron distribuidos al azar en igual número en cada celda de un diseño factorial 2 x 2, en donde los factores fueron la droga (SALINA= el vehículo, MP= 100 µg/g de morfina) y el entrenamiento (0= sin entrenamiento, E= con entrenamiento). De este modo se conformaron 4 grupos: 0-SAL, E-SAL, 0-MP y E-MP.

Resultados y discusión

Un Anova de un factor realizado sobre los datos del test (Fig. 12) demostró un efecto significativo, $F(3,156) = 6,01$ $P < 0,005$; y el test de Duncan señaló que las diferencias ($P < 0,01$) se hallaban entre los grupos 0-SAL vs. E-SAL, o vs. E-MP, pero no entre 0-SAL vs. 0-MP. Por lo tanto, parece razonable concluir que no se produjo amnesia retrógrada por la inyección de morfina luego del entrenamiento.

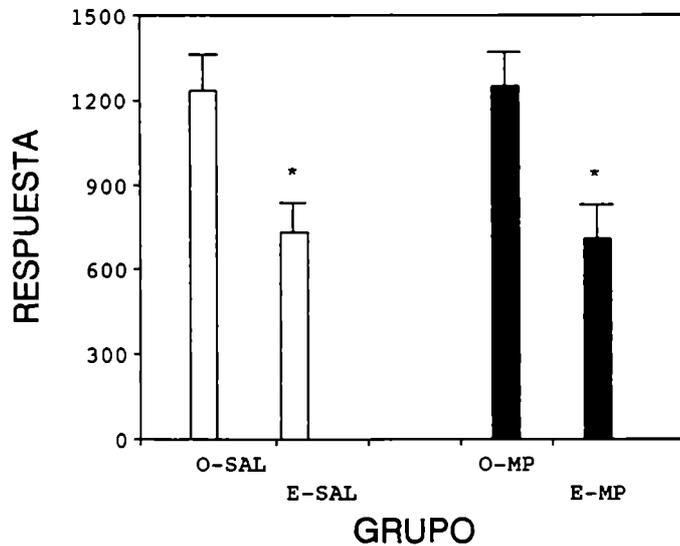


Fig. 12__ La administración de morfina post-entrenamiento no afecta la habituación de largo término. Ordenada: promedio de los valores acumulados por animal durante los 3 ensayos del test. Los grupos O no recibieron entrenamiento, los grupos E recibieron un entrenamiento de 15 ensayos. *# Diferencias significativas entre los grupos O-SAL y E-SAL o E-GABA (Duncan $P < 0,01$).

Si la morfina administrada 30 min. antes del entrenamiento perjudicase el almacenamiento de la memoria, debería esperarse un perjuicio similar cuando la droga se administra inmediatamente después del entrenamiento. En efecto, en los estudios sobre consolidación de la memoria se suelen preferir los tratamientos post-entrenamiento cuando se enfocan los efectos disruptivos de las drogas (Martinez y col., 1983), utilizándose en lo posible paradigmas de aprendizaje de un solo ensayo para acortar el período de elaboración de la traza mnésica (Gold, 1986; Lewis, 1979). Dado que en este caso se trata de un paradigma de habituación, el empleo de un entrenamiento de múltiples ensayos es inevitable, pero el hecho de que la inyección post-entrenamiento de morfina no produzca un efecto amnésico, difícilmente puede atribuirse a la formación

de una memoria de largo término durante la sesión de entrenamiento, dado que 15 ensayos con intervalos de 180 seg. (45 min.), parece ser el mínimo entrenamiento requerido para adquirir una habituación de 24 hs. (Lozada y col., 1990). En consecuencia, puede suponerse que al finalizar la sesión de entrenamiento la memoria se halla recién adquirida. Además, no se observó efecto amnésico de la morfina aún cuando ésta fue inyectada inmediatamente después de una sesión donde la duración total del entrenamiento se redujo a 10 min. (con un intervalo entre ensayos de 36 seg. en lugar de 180 seg.), (Romano, 1991a).

En trabajos anteriores se ha sugerido que la habituación a un estímulo de peligro en *Chasmagnathus* involucra la liberación de opiáceos endógenos (Romano y col., 1990; Valeggia y col., 1989), que atenúan la reactividad a la subsiguiente presentación de un estímulo nociceptivo diferente (Valeggia y col., 1989), es decir que una sesión de habituación modificaría el estado interno del organismo. Por otro lado, resultados provenientes de estudios sobre "dependencia de estado" (Izquierdo y Díaz, 1983; Izquierdo y Netto, 1985), indican que cuando las modificaciones en el estado interno son producidas por cambios en el nivel de ciertos compuestos endógenos debido al entrenamiento, el suministro exógeno post-entrenamiento de estos compuestos ejerce un efecto amnésico, puesto que la memoria depende de la congruencia en las "claves introceptivas" (Riccio y Concannon, 1981) entre el momento del entrenamiento y el del test (Izquierdo y Díaz, 1983). De manera que el hallazgo de que la inyección post-entrenamiento de morfina no posee efecto sobre la retención de la memoria, permite descartar

también la posibilidad de la dependencia de estado, reforzando así la hipótesis que explica el efecto opiáceo sobre las señales visuales de peligro, por una interferencia transitoria entre el estímulo (objeto pasante) y su significado innato (la amenaza inminente del ataque de un predador).

CAPITULO V

Especie-especificidad de la capacidad de habituación

Como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos de esta tesis ha sido estudiar el valor adaptativo que podría tener en *Chasmagnathus*, una habituación tan rápida y persistente a un estímulo visual de peligro, como así también el de un mecanismo opiáceo disparado por la presencia repetida del estímulo.

Con el propósito de dilucidar este tipo de cuestiones, Domjan y Galef (1983) han propuesto extender al estudio del aprendizaje una táctica de investigación que se ha manifestado exitosa en estudios de especializaciones adaptativas de rasgos morfológicos (ej. Zeil y col., 1986) y comportamientos instintivos (ej. Cullen, 1957), es decir, emplear el método comparativo. Sin embargo, es pertinente puntualizar los requisitos para su aplicación en cada estudio en particular, pues como bien lo señalara Russell en una discusión sobre este tema (1951), "resulta una falacia suponer un acuerdo general con relación a la naturaleza básica del método". Para investigar el valor adaptativo de una supuesta especialización, debe establecerse una correlación entre el rasgo específico bajo estudio (un carácter morfológico, fisiológico o comportamental) y algún aspecto ecológico particular. A tal fin, el estudio debe hacerse entre especies filogenéticamente cercanas pero ecológicamente dispares (Domjan y Galef, 1983); o entre

diferentes categorías de edad de la misma especie, toda vez que ello implique cambios ontogénicos en la selección del hábitat y, consecuentemente, cambios en las presiones ecológicas (Richards, 1992; Werner y Gilliam, 1984).

De acuerdo con lo anterior, el propósito de esta parte de la tesis fue investigar el significado biológico, tanto de la fuerte predisposición de *Chasmagnathus* para habituar una respuesta comportamental innata a un estímulo de peligro, como de la modulación opiácea endógena disparada por la presentación iterativa de dicho estímulo, comparando los comportamientos de *Chasmagnathus granulatus* con los de *Pachygrapsus marmoratus*.

Experimento 9

Este experimento fue realizado con el fin de caracterizar las diferencias más conspicuas que distinguen a *Chasmagnathus* y *Pachygrapsus* en el proceso de habituación a corto término.

Método

Se utilizaron *Chasmagnathus* de un ancho de caparazón de entre 2,5 a 2,9 cm. con un peso vivo promedio de 13,34 gr. (n= 60; EE= 0,29), y *Pachygrapsus* de entre 2,7 a 3,2 cm. con un peso medio de 12,79 gr. (n= 60; EE= 0,47). Cuarenta animales de cada especie fueron sometidos en condiciones análogas, a una sesión de 15 presentaciones de la figura pasante, una cada 180 seg. Aquí como

en los siguientes experimentos, los grupos de cada especie fueron tratados en tiempo y espacio diferentes, es decir no fueron corridos simultáneamente, por lo que no se realizaron comparaciones estadísticas interespecíficas.

Resultados y discusión

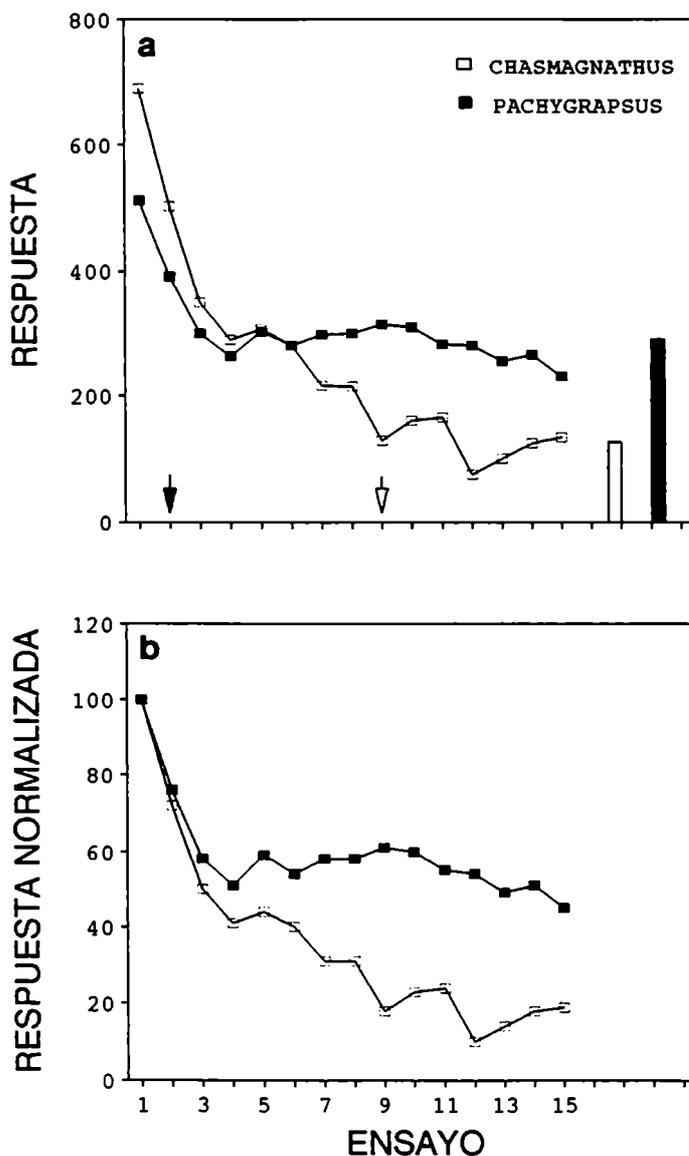


Fig. 13__ Habitación de corto término. Comparación de la respuesta de *Chasmagnathus* y *Pachygrapsus* medianos durante una sesión de entrenamiento de 15 ensayos. (a) La ordenada indica el promedio de los valores de respuesta por ensayo, las barras representan el promedio del valor asintótico y las flechas señalan el ensayo límite de cada grupo. (b) Normalización de las curvas de (a). Los promedios de los ensayos de cada grupo fueron divididos por el primer ensayo y luego multiplicados por 100.

Desde el momento en que se llevaron a cabo los primeros experimentos pilotos de habituación de corto término en *Pachygrapsus*, se pudo observar una diferencia manifiesta con relación a *Chasmagnathus*. El desenvolvimiento de ambos grupos se muestra en las figuras. 13a y b. El nivel de respuesta de *Chasmagnathus* desciende hasta un valor asintótico mucho más bajo que el de *Pachygrapsus* (barras blanca y negra respectivamente en la figura 13a) y alcanza dicho valor, en ensayos posteriores a los que lo hace *Pachygrapsus* (flechas blanca y negra respectivamente). Cuando los valores se expresan normalizados con respecto al primer ensayo de cada grupo, la diferencia es aún más notable (Fig. 13b).

Es evidente que la declinación del nivel de respuesta es más pronunciada en *Chasmagnathus* que en *Pachygrapsus*, indicando un mayor grado de habituación a corto término, una diferencia interespecífica que fue consistente a lo largo de todas las comparaciones.

Experimento 10

La intención de este experimento fue estudiar las características de la habituación de largo término en *Pachygrapsus* y compararlas con aquellas de *Chasmagnathus*.

Método

Se emplearon animales de tamaño y peso equivalentes a los del experimento anterior. Resultados obtenidos en experimentos preliminares con *Pachygrapsus* demostraron que con una sesión de entrenamiento de 15 ensayos, no se podía encontrar diferencias significativas en la retención a 24 hs. entre los grupos controles y entrenados. Por lo tanto, el grado de retención para ambas especies fue estudiado utilizando 15 ensayos de entrenamiento para *Chasmagnathus* y 30 para *Pachygrapsus*. Dentro de cada especie se distribuyeron al azar 37 animales en dos grupos, uno experimental o entrenado y el otro control o no entrenado.

Resultados y discusión

La figura 14 reúne los resultados correspondientes a estas comparaciones, mostrando el desempeño de los grupos controles y entrenados tanto para *Chasmagnathus*, como para *Pachygrapsus*. Una inspección de la figura sugiere que en *Chasmagnathus*, la diferencia entre los grupos fue mayor durante los primeros ensayos de la sesión de test y disminuyó a lo largo de los ensayos. Un análisis estadístico de estos datos de acuerdo a los parámetros de retención definidos en Métodos Generales, confirma esta conclusión. No se hallaron diferencias en los valores asintóticos (barras blanca y negra), pero sí en el ensayo límite ($t = 2,88$ $P < 0,01$), ya que la asíntota comenzó en el ensayo 4 para el grupo entrenado (flecha

negra) y en el ensayo 8 para el control (flecha blanca). Un Anova (2 x 5) realizado sobre los datos de los 5 bloques de 3 ensayos demostró un efecto principal significativo, $F(1,72) = 4,21$ $P < 0,05$ y un efecto significativo de la interacción grupo x ensayo, $F(4,288) = 6,78$ $P < 0,001$. Cuando se realizó una serie de Anovas sucesivos reduciendo el número de bloques de 3 ensayos desde el bloque 5 al bloque 1, se hizo evidente un aumento en la significancia del efecto principal y una disminución en la interacción.

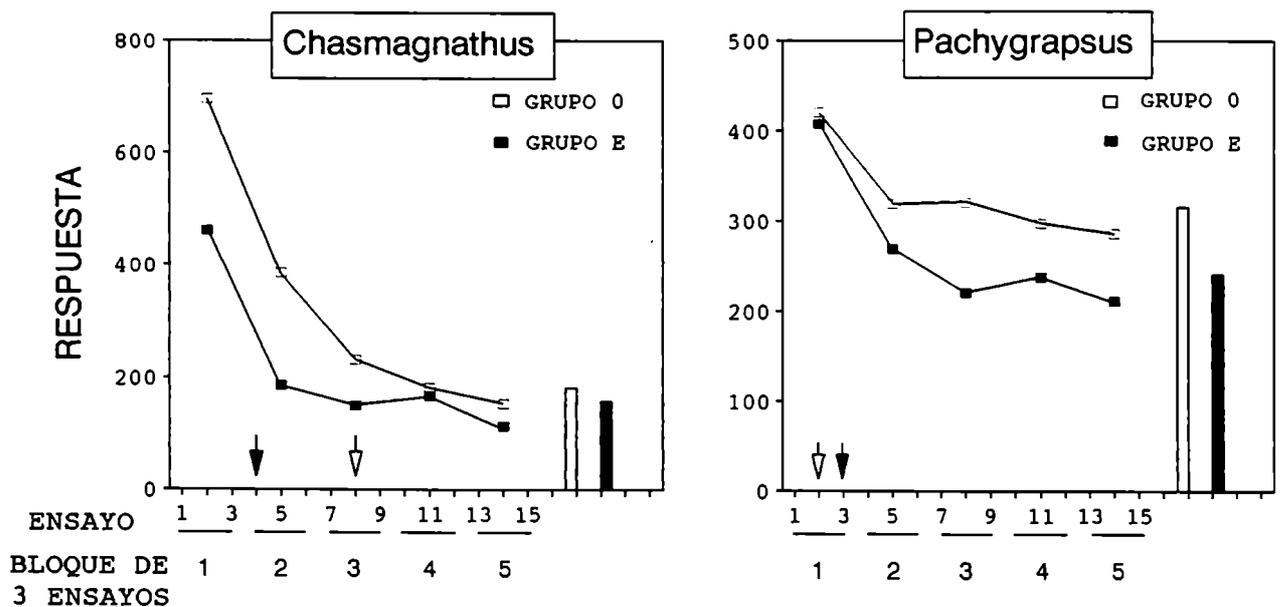


Fig. 14 __ Habitación de largo término de *Chasmagnathus* y *Pachygrapsus* medianos. Comparación de la respuesta de grupos controles (0) y grupos entrenados (E) durante la sesión de test, 24 hs. luego del entrenamiento. La ordenada indica el promedio de los valores de respuesta calculado a partir del valor medio cada 3 ensayos de cada sujeto. Las barras representan el promedio del valor asintótico y las flechas señalan el ensayo límite de cada grupo. La absisa superior indica los ensayos y la inferior los bloques de 3 ensayos.

El desenvolvimiento de *Pachygrapsus* en el test resultó notablemente distinto al descrito para *Chasmagnathus*. Una

inspección de la figura indica que la respuesta de los grupos entrenado y control, es similar en la porción inicial de la sesión, surgiendo luego una diferencia que aumenta con los ensayos. El análisis estadístico de los parámetros de retención confirmó tal impresión. Se encontró una diferencia significativa entre los valores asintóticos (barras blanca y negra, $t = 1,82$ $P < 0,05$), comenzando la asíntota en el ensayo 2 para los controles (flecha blanca) y en el ensayo 3 para los entrenados (flecha negra), aunque la diferencia entre ensayos límite no alcanzó a ser significativa. Se realizó una serie de Anovas sucesivos sobre bloques de 3 ensayos con el método usado antes para *Chasmagnathus*, aunque en un orden inverso, es decir, desde el bloque 1 al 5. Este análisis demostró un efecto principal significativo sólo cuando se efectuó sobre datos de los tres últimos bloques, $F(1,78) = 4,03$ $P < 0,05$, donde la interacción no reveló diferencias, $F = 0,45$.

Por lo tanto, cuando *Chasmagnathus* son entrenados con 15 ensayos, sus niveles de respuesta en el test (luego de 24 hs.) arriban a un valor asintótico similar al de los controles pero alcanzando la asíntota antes que éstos, mostrando así un desplazamiento del ensayo límite hacia adelante, de modo que la mayor diferencia entre los grupos ocurre en la primera porción de la curva. Por otro lado, cuando *Pachygrapsus* son entrenados con 30 ensayos, los niveles de respuesta de los grupos entrenado y control en la parte inicial de la sesión de test son similares, diferenciándose luego hasta alcanzar, el entrenado, un valor asintótico significativamente inferior al control.

CAPITULO VI

Relación de la edad con la capacidad de habituación

En el capítulo anterior se efectuó un estudio interespecífico de la capacidad de habituación (una comparación horizontal). Una segunda forma de abordar esta cuestión ya fue formulada anteriormente, es decir, realizar un estudio intraespecífico de la capacidad de habituación utilizando cangrejos de la misma especie pero de diferentes edades (una comparación vertical). Con este propósito, se estudió el desempeño de cangrejos grandes y pequeños de ambas especies.

Experimento 11

El objetivo de este experimento fue investigar las características de la habituación de corto y largo término en animales de distintas edades.

Método

Se han establecido escalas de la relación entre el tamaño y la edad en varias especies de cangrejos, basadas en estimaciones

de los intervalos entre las sucesivas exuvias, y el incremento de tamaño de cada exuvia (ej. McKay, 1942; Charmantier-Daures, 1987). Hiatt (1948) estudió especialmente a *Pachygrapsus crassipes* y concluyó que, a pesar de los distintos métodos empleados para investigar las relaciones de edad en Brachyura, se obtenían estimaciones equivalentes. Por esto, a excepción del largo período de vida (8 a 10 años) informado para *Cancer magister* (McKay, 1942), una expectativa de vida similar de 3 a 4 años, ha sido estimada por diversos autores para varias especies.

En éste y el siguiente experimento, se utilizaron animales cuyo ancho de caparazón se hallaba por debajo y por encima del de aquellos empleados en los experimentos 9 y 10, definiéndoselos entonces como **chicos** y **grandes** respectivamente, en relación a los **medianos** de aquellos experimentos. Los *Chasmagnathus* chicos estaban comprendidos entre 2,1 y 2,5 cm. de ancho de caparazón y pesaban en promedio 7,39 gr. (n= 60; EE= 0,15); los grandes en cambio, se hallaban entre 2,9 y 3,4 cm. y su peso medio era de 17,39 gr. (n= 60; EE= 0,26). En el caso de *Pachygrapsus*, los individuos chicos se ubicaban entre 2,3 y 2,7 cm. de ancho, con un peso de 8,04 gr. (n= 60; EE= 0,14) y los grandes entre 3,2 y 3,7 cm. con un peso promedio de 21,28 gr. (n= 60; EE= 0,47). Tomando en cuenta las anteriores consideraciones acerca de la homogeneidad en los períodos de vida, la escala de edad calculada por Hiatt (1948) para los individuos machos de la especie *Pachygrapsus crassipes*, y el ancho mayor de caparazón informado para los machos de las especies *Pachygrapsus marmoratus* (4,2 a 4,4 cm.), *Pachygrapsus crassipes* (4,2 a 4,6 cm.) y *Chasmagnathus granulatus* (3,6 a 3,8 cm.), la edad correspondiente a los tamaños utilizados fue estimada por

aproximación. De acuerdo con ello, los cangrejos chicos se hallarían en la última parte de su primer año o en la primera parte de su segundo año de vida; los cangrejos medianos (utilizados en los experimentos 9 y 10) corresponderían a individuos en su segundo año; y los cangrejos con un ancho de caparazón mayor a 3,0 cm. serían individuos de tres o tal vez cuatro años de edad.

El experimento constó de una sesión de entrenamiento y una de test, 24 hs. después. En *Chasmagnathus* ambas sesiones fueron de 15 ensayos. Para *Pachygrapsus* en cambio, el entrenamiento fue como antes, de 30 ensayos, pero ahora incluso el test se realizó con 30 presentaciones del estímulo. La razón para este cambio en el test fue que, como se observa en el experimento anterior, la diferencia entre controles y experimentales emerge en *Pachygrapsus* a lo largo de los ensayos, de modo que la retención podría ser mejor evaluada tomando en consideración el desempeño de los animales durante 15 ensayos adicionales. En cada especie y para cada categoría de edad se conformaron grupos experimentales y controles de 40 animales cada uno.

Resultados y discusión

La actuación de los cangrejos chicos y grandes (Fig. 15) durante el entrenamiento, presentó un perfil similar al de los animales medianos del experimento 9 (Fig. 13). Cuando se compararon las sesiones de entrenamiento entre los animales chicos y grandes de cada especie (Fig. 15a contra Fig.15b; rectángulos blancos, *Chasmagnathus*; rectángulos negros, *Pachygrapsus*), la similitud de

los perfiles fue manifiesta más allá de la notable diferencia en el nivel de respuesta. Esta conclusión fue apoyada por el análisis estadístico. En efecto, mientras que un test de t reveló diferencias significativas entre los valores asintóticos de los

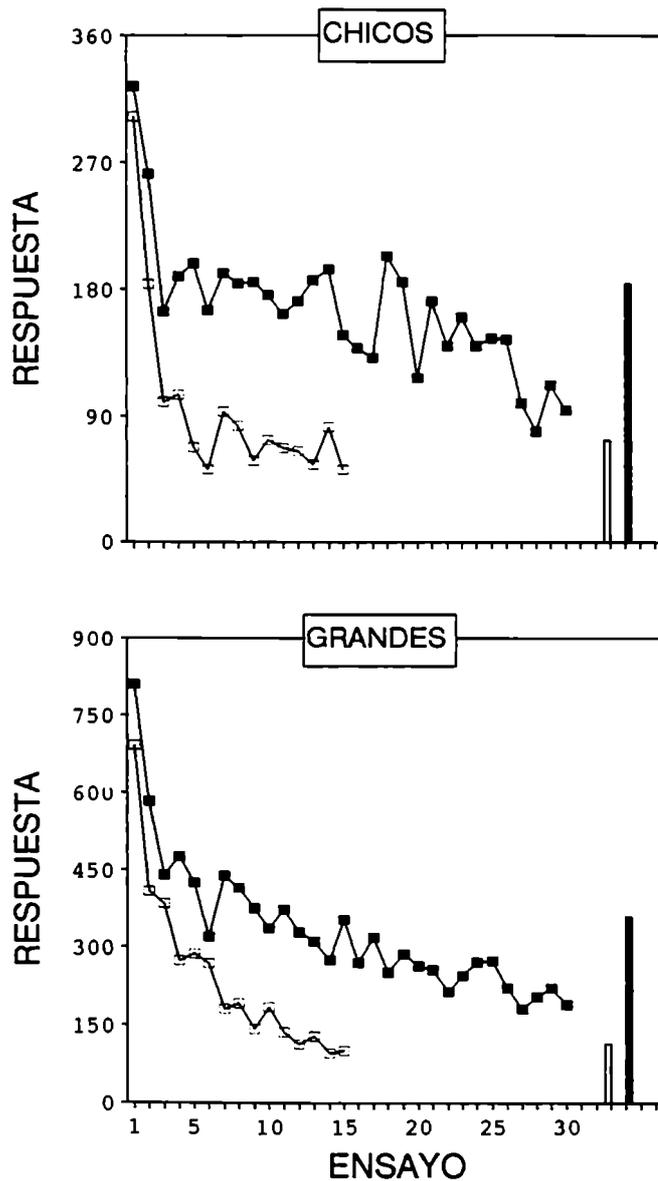


Fig. 15__ Habitación de corto término. Comparación de la respuesta de *Chasmagnathus* (cuadrados blancos) y *Pachygrapsus* (cuadrados negros) chicos y grandes durante una sesión de entrenamiento. La ordenada indica el promedio de los valores de respuesta por ensayo y las barras representan el promedio del valor asintótico.

animales chicos y grandes ($t = 2,53$ $P < 0,01$ para *Chasmagnathus*; y $t = 4,56$ $P < 0,001$ para *Pachygrapsus*), no mostró sin embargo

diferencias significativas entre las pendientes de caída de las curvas calculadas hasta el ensayo límite.

La figura 16 (gráfico superior izquierdo) representa los resultados obtenidos con los *Chasmagnathus* chicos en la sesión de test. Una inspección del gráfico revela las mismas características de retención halladas en los cangrejos medianos. Los valores asintóticos fueron similares en ambos grupos pero nuevamente los animales entrenados alcanzaron la asintota antes que los controles (en los ensayos 4 y 9 respectivamente, $t = 2,99$ $P < 0,025$). Un Anova 2×5 realizado sobre los datos de los 5 bloques de 3 ensayos, reveló un efecto principal significativo, $F(1,78) = 11,7$ $P < 0,005$; y un efecto significativo de la interacción tratamiento \times ensayo, $F(4,312) = 7,78$ $P < 0,001$. Cuando se efectuó una serie de Anovas sucesivos desde el bloque 5 hasta el bloque 1, el valor de significancia del efecto principal aumentaba a la vez que el valor de interacción disminuía. Así, los cangrejos *Chasmagnathus* chicos, al igual que los medianos, son capaces de adquirir con un entrenamiento de 15 ensayos, una respuesta habituada que manifiesta una robusta retención luego de 24 hs.

El gráfico de retención de los *Chasmagnathus* grandes (inferior izquierdo) muestra ser diferente que el de los chicos y medianos. Aunque el esperado desplazamiento hacia adelante del ensayo límite estuvo presente (desde el ensayo 9 al 8), la diferencia no alcanzó el nivel de significancia. Además, la serie de Anovas sucesivos desde el bloque 5 al 1 no reveló diferencias significativas en el efecto principal ni en el factor de interacción en ninguno de los estadios del análisis. Por lo tanto, los *Chasmagnathus* grandes muestran una retención mediocre o una falta total de retención.

La figura 16 (gráfico superior derecho) muestra también el desempeño de los *Pachygrapsus* chicos durante el test de 30 ensayos.

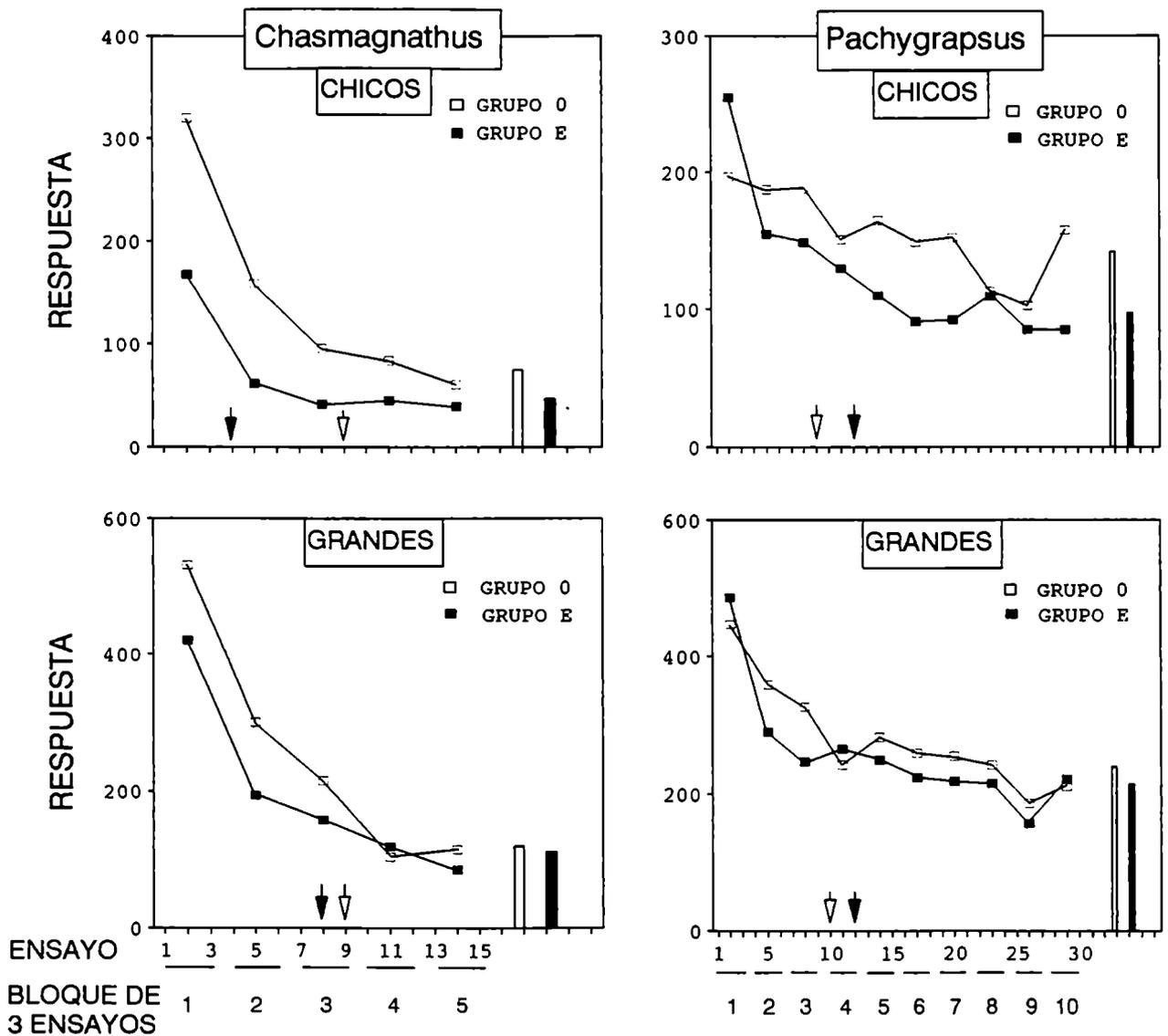


Fig. 16 __ Habitación de largo término de *Chasmagnathus* y *Pachygrapsus* chicos y grandes. Comparación de la respuesta de grupos controles (0) y grupos entrenados (E) durante la sesión de test, 24 hs. luego del entrenamiento. La ordenada indica el promedio de los valores de respuesta calculado a partir del valor medio cada 3 ensayos de cada sujeto. Las barras representan el promedio del valor asintótico y las flechas señalan el ensayo límite de cada grupo. La absisa superior indica los ensayos y la inferior los bloques de 3 ensayos.

Un análisis estadístico de estos datos de acuerdo con los parámetros de retención, mostró un panorama similar al encontrado en los *Pachygrapsus* medianos. El valor asintótico de los animales entrenados fue más bajo que el de los controles ($t = 2,0$ $P < 0,025$) y el desplazamiento hacia atrás del ensayo límite se produjo (desde el 9 al 12) pero, aunque estuvo cerca, la diferencia no llegó a ser significativa. La serie de Anovas sucesivos desde el primer bloque de 3 ensayos hasta el décimo, reveló un efecto principal significativo sólo cuando fue efectuado a partir de los últimos cinco bloques, $F(1,78) = 4,07$ $P < 0.05$. De manera que los *Pachygrapsus* chicos, al igual que los medianos, son capaces de adquirir una respuesta habituada, aunque menos robusta que la que manifiestan los *Chasmagnathus* de esas categorías.

La actuación de los *Pachygrapsus* grandes entrenados y controles durante el test resultó ser casi idéntica (Fig. 16, gráfico inferior derecho). No se encontraron diferencias significativas ni entre los valores asintóticos ni entre los ensayos límites, no obstante producirse el típico desplazamiento hacia atrás del grupo entrenado (desde el 10 al 12). Además, la serie de Anovas sucesivos desde el bloque 1 al 10 no reveló diferencias significativas en el efecto principal ni tampoco en el factor de interacción en ningún estadio del análisis.

Estos resultados en su conjunto sugieren que el desempeño de los cangrejos chicos es similar en todos los aspectos al de los medianos, tanto para *Chasmagnathus* como para *Pachygrapsus*, confirmando que los de la primer especie poseen una mayor capacidad de habituación que los de la segunda y que los perfiles de

retención en el test son notablemente distintos entre ambas especies. La habituación luego de 24 hs. es sumamente pobre o inexistente en los individuos grandes tanto de *Chasmagnathus* como de *Pachygrapsus*. Esto es así a pesar de que la tasa de habituación de corto término es similar en los cangrejos de los diferentes tamaños, un resultado que está de acuerdo con varios informes sobre estudios de habituación en donde se indica que la respuesta del test no puede ser predicha sobre la base del análisis del desempeño durante el entrenamiento (Peeke, 1984; Rescorla, 1988; experimentos 6 y 7 de esta tesis).

Cuando en los métodos se definió la escala de edad en relación al tamaño, cada categoría de edad fue tentativamente adscrita a una categoría de tamaño, por lo que puede concluirse que la capacidad de retención de la habituación a largo término mostrada por los cangrejos jóvenes de ambas especies está disminuida o ausente en los individuos más viejos.

CAPITULO VII

Especie-especificidad de la modulación opiácea

Como ya fuera expresado, *Chasmagnathus* presenta, además de la notable capacidad para habituarse a un estímulo visual de peligro, una modulación opiácea de la respuesta de escape que acelera la habituación de corto término. En el presente capítulo se pretende indagar sobre las posibles diferencias interespecíficas relacionadas con dicha capacidad moduladora.

Una mirada sobre las curvas de entrenamiento de *Pachygrapsus* (Figs. 13 y 15) recuerda la de *Chasmagnathus* luego del pretratamiento con naloxono (Romano y col., 1990). La semejanza aparece evidente en la figura 17a donde se ilustra el resultado correspondiente a tres grupos de animales: *Pachygrapsus*, *Chasmagnathus* y *Chasmagnathus* previamente tratados con 3,2 µg/g de naloxono. El hecho es aún más manifiesto en la figura 17b en donde los valores se expresan normalizados con respecto al primer ensayo para cada grupo.

La similitud entre la curva de *Pachygrapsus* y la de *Chasmagnathus* pre-tratado con naloxono, sugiere que la primera de estas especies carecería del mecanismo opiáceo endógeno atribuido a la última. Esta suposición es consistente con el hecho de que los

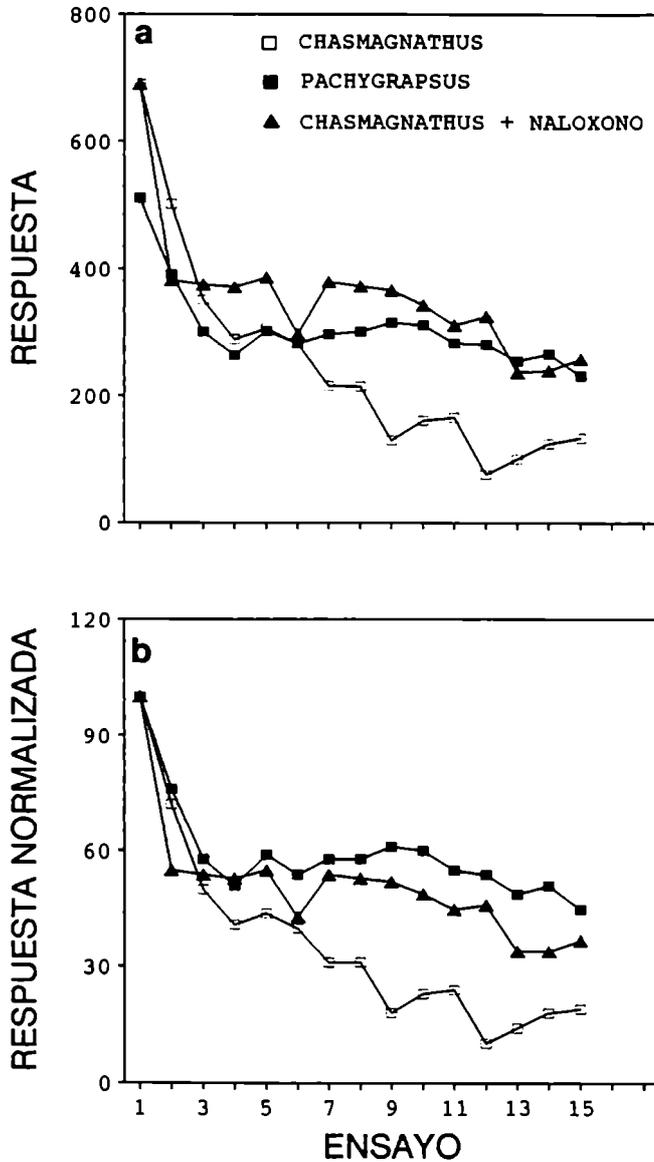


Fig. 17__ Habitación de corto término. (a) Comparación de la respuesta correspondiente a 3 grupos de cangrejos medianos durante una sesión de 15 ensayos. La ordenada indica el promedio de los valores individuales por ensayo. Los datos de los grupos *Chasmagnathus* y *Pachygrapsus* corresponden a la Fig. 13a, los del grupo *Chasmagnathus + naloxono* son tomados de Romano y col. (1990). (b) Normalización de las curvas de (a): el promedio de cada ensayo fue dividido por el valor del primer ensayo del grupo y luego multiplicado por 100.

opiáceos endógenos acentúan la habituación, pues a primera vista parecería incongruente que una especie con poca capacidad de habituación contase con un recurso para acelerarla. Con el fin de evaluar dicha hipótesis se realizaron los siguientes experimentos.

Experimento 12

Método

Se formaron cuatro grupos de 40 cangrejos *Pachygrapsus* medianos cada uno, tratados con dosis de 0,0 (control); 1,6; 3,2 y 6,6 $\mu\text{g/g}$ de naloxono, administradas 15 min. antes de una sesión de entrenamiento de 15 ensayos, con intervalos entre ensayos de 180 seg. La elección de dichas dosis se basó en trabajos anteriores donde se investigó la relación de la respuesta con la dosis en *Chasmagnathus* (Romano y col., 1990; Valeggia y col.; 1989).

Resultados y discusión

Un Anova de medidas repetidas (4 x 15) efectuado sobre los datos de los cuatro grupos no reveló efectos significativos ni del factor principal entre grupos ni del factor de interacción grupo x ensayo.

Así, a diferencia de *Chasmagnathus*, no se encontró en *Pachygrapsus* ninguna alteración en la curva de habituación por efecto del pretratamiento con naloxono.

Experimento 13

Siguiendo la misma línea experimental, se estudió el efecto

de diferentes dosis de morfina sobre la reactividad de *Pachygrapsus* a la presentación de la pantalla pasante.

Método

El diseño experimental fue el mismo utilizado previamente con *Chasmagnathus* (Maldonado y col., 1989), esto es, se conformaron cinco grupos de cangrejos inyectados con solución salina (control), o con 25, 50, 75 ó 100 µg/g de morfina, 30 min. antes de un ensayo de test.

Resultados y discusión

No se encontró ninguna diferencia significativa en el nivel de respuesta entre ninguno de los grupos de morfina y el grupo control. Este resultado contrasta fuertemente con los obtenidos en *Chasmagnathus* donde se halló una clara inhibición con dosis de 25 µg/g y una inhibición de aproximadamente el 50% con 60 µg/g (Maldonado y col., 1989).

Cuando se efectuó otro experimento de la mismas características pero empleando dosis mayores, se obtuvo un efecto inhibitorio significativo sólo a partir de dosis de 175 µg/g. Los resultados están ilustrados en la figura 18 donde se reproducen, además, los obtenidos por Maldonado y colaboradores (1989) con *Chasmagnathus*.

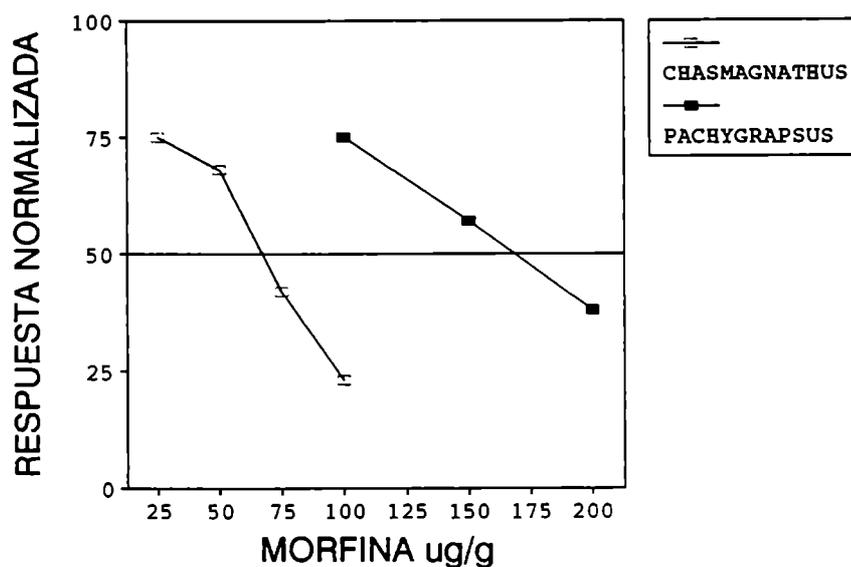


Fig. 18_ Efecto del pretratamiento con morfina sobre el nivel de respuesta durante un ensayo de test. Los datos correspondientes a *Chasmagnathus* fueron tomados de Maldonado y col. (1989). La respuesta media de cada dosis fue calculada como porcentaje del valor promedio del respectivo control inyectado con solución salina.

Experimento 14

Si la acción de las altas dosis de morfina que probaron afectar la respuesta de escape fuese ejercida a través de receptores opiáceos, entonces se esperaría que el naloxono revirtiese dicha acción (Leslie, 1987). Para investigarlo se realizó esta serie de experimentos con *Pachygrapsus*.

Método

Se utilizó el mismo diseño del experimento anterior. En la serie 1 se comparó el efecto de 175 $\mu\text{g/g}$ de morfina con el de esa misma dosis preparada en una solución con 1,6; 3,2 ó 6,4 $\mu\text{g/g}$ de

naloxono. En la **serie 2** el efecto de 150 $\mu\text{g/g}$ de morfina se comparó con el de dicha dosis en solución con 0,5; 1,0; 1,6 ó 3,2 $\mu\text{g/g}$ de naloxono. En la **serie 3** se comparó el efecto de 150 $\mu\text{g/g}$ de morfina administrada 15 min. después de una inyección de 1,6 ó 3,2 $\mu\text{g/g}$ de naloxono. En todos los casos la inyección de morfina fue suministrada 30 min. antes del ensayo de test.

Resultados y discusión

Los resultados de *Pachygrapsus* correspondientes a este experimento se representan con los obtenidos previamente con *Chasmagnathus* (Maldonado y col., 1989) en la figura 19.

Como puede observarse, en tanto que en *Chasmagnathus* la inhibición provocada por una dosis de 70 $\mu\text{g/g}$ de morfina fue completamente bloqueada por 3,2 $\mu\text{g/g}$ de naloxono, en *Pachygrapsus*, no se halló ningún indicio de reversión a pesar del amplio rango de dosis de naloxono empleado, ya sea conjuntamente con la morfina (Fig. 19, Pachygrapsus 1, 2) o precediéndola (Pachygrapsus 3).

Como consecuencia de los experimentos presentados en este capítulo, se concluye que *Pachygrapsus*, a diferencia de *Chasmagnathus*, parece no poseer un mecanismo opiáceo endógeno que, por interferir con la decodificación de la señal de peligro, contribuya a acelerar la habituación de corto término. En otras palabras, la disminución de la respuesta en *Pachygrapsus* reflejaría exclusivamente el resultado de una habituación a corto término en

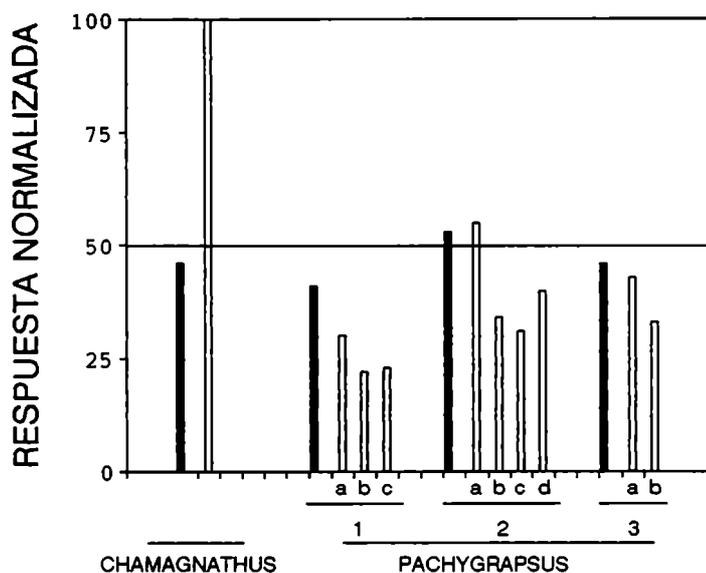


Fig. 19 __ Reversibilidad del efecto de la morfina por el pretratamiento con naloxono. *Chasmagnathus*: la barra negra representa el nivel de respuesta durante un ensayo de test luego de la administración de 70 µg/g de morfina; la barra blanca, luego de 70 µg/g de morfina más 3,2 µg/g de naloxono. *Pachygrapsus* 1: la barra negra indica 175 µg/g de morfina; las barras blancas señalan: (1a) 175 µg/g de morfina más 1,6 µg/g de naloxono, (1b) más 3,2 µg/g, (1c) más 6,4 µg/g. *Pachygrapsus* 2: barra negra, 150 µg/g de morfina; barras blancas: (2a) 150 µg/g de morfina más 0,5 µg/g de naloxono, (2b) más 1,0 µg/g, (2c) más 1,6 µg/g, (2d) mas 3,2 µg/g. *Pachygrapsus* 3: barra negra, 150 µg/g de morfina; barras blancas: (3a) 150 µg/g de morfina 15 min. después de una inyección de 1,6 µg/g de naloxono, (3b) después de 3,2 µg/g de naloxono.

la vía estímulo-respuesta, sin la asistencia adicional de ningún mecanismo modulador que reduzca la percepción del significado de peligro a lo largo de los ensayos.

No obstante, ello no implica que los opiáceos no podrían estar sirviendo a otras funciones en *Pachygrapsus*, tales como la inhibición de la respuesta ante estímulos nociceptivos actuales (Lozada y col., 1988), la regulación de la migración de pigmentos en los cromatóforos (Martinez y col., 1986) o las relacionadas con la liberación de la neurohormona hiperglucémica desde la glándula del seno (Jaros, 1990).

CAPITULO VIII

Contexto-especificidad

La diferencia de respuesta más importante durante el test, entre los grupos entrenados y controles en *Chasmagnathus*, se verifica muy al comienzo de la sesión (Fig. 8a, 14 y 16). En *Pachygrapsus*, por el contrario, la primera parte de la curva del test de los cangrejos entrenados se superpone completamente con la de los animales controles (Fig. 14 y 16). Los primeros ensayos del test parecerían actuar en los *Pachygrapsus* entrenados como un recordatorio cuyos efectos se manifiestan posteriormente a lo largo de la sesión, como un ejemplo más de **reinstalación** (en el sentido de Campbell y Jaynes, 1966). En *Chasmagnathus*, la respuesta del primer ensayo del test aparece ya atenuada, como si los 30 min. previos de adaptación en el actómetro hubiesen producido *per se* una inhibición. En otras palabras, podría pensarse que el proceso de recuperación de la memoria en el test depende, en *Pachygrapsus* principalmente de la presentación iterativa del estímulo habituante, mientras que en *Chasmagnathus* de la reexposición a los estímulos contextuales que estuvieron presentes durante el entrenamiento. De ser así, las diferencias en la retención manifestadas en estas dos especies podrían atribuirse a una diferencia en el peso de las claves contextuales sobre la habituación de largo término.

Podría argüirse, sin embargo, que el simple análisis de las

curvas de retención no es suficiente evidencia para atribuirle al contexto un papel crítico en la habituación de largo término de *Chasmagnathus*, habida cuenta de que en varios experimentos con otros animales no ha sido posible hallar tal influencia (ej. Marlin y Miller, 1981; Davis y File, 1984). Por tal razón, se efectuaron dos experimentos con el propósito de estimar el peso de las claves contextuales sobre la actuación de *Chasmagnathus* en el test.

Experimento 15

Método

El experimento incluyó cuatro grupos de 30 *Chasmagnathus* cada uno: ACTOMETRO-0, ACTOMETRO-E, CILINDRO-0 y CILINDRO-E. Los dos grupos controles fueron mantenidos en los recipientes correspondientes durante todo el período de entrenamiento pero sin ser entrenados, mientras que los dos grupos entrenados recibieron el típico entrenamiento de 15 ensayos. Sin embargo, mientras los grupos ACTOMETRO-0 y ACTOMETRO-E fueron alojados en el recipiente móvil de cada actómetro, los grupos CILINDRO-0 y CILINDRO-E fueron alojados durante el período de entrenamiento, en recipientes estáticos. La base de ambos tipos de contenedores, es decir el piso sobre el cual los animales podían correr, se encontraba a igual distancia del plano de desplazamiento de la figura. No obstante, diferencias contextuales conspicuas distinguían ambos recipientes, puesto que mientras el móvil consistía en una palangana plástica opaca de paredes con pendiente cóncava y un piso central sólo

cubierto por la capa de agua, el estático era un cilindro plástico transparente cuyo piso se hallaba cubierto con una delgada capa de arena por debajo del agua. A las 24 hs. del entrenamiento todos los grupos recibieron una sesión de test de 6 ensayos.

Resultados y discusión

La actuación de los grupos ACTOMETRO-0 y ACTOMETRO-E durante el test se ilustra en la figura 20a; la de los grupos CILINDRO-0 y CILINDRO-E en la figura 20b. La inspección de estas curvas sugiere que mientras los animales del grupo ACTOMETRO-E muestran el nivel habitual de retención, los del grupo CILINDRO-E manifiestan una falta completa de la misma. Un análisis estadístico de los resultados confirmó esta impresión. En efecto, un Anova de medidas repetidas (2 x 6) realizado sobre los datos de los grupos ACTOMETRO-0 y ACTOMETRO-E (Fig. 20a), arrojó un efecto principal significativo, $F(1,58) = 4,33$ $P < 0,05$ y ausencia de interacción grupo x ensayo $F(5,290) = 0,32$. Por otra parte, un análisis similar de los datos de los grupos CILINDRO-0 y CILINDRO-E (Fig. 20b), no reveló efecto significativo del factor principal o de la interacción.

En consecuencia, sólo los cangrejos entrenados y testeados en el mismo contexto mostraron una retención de la habituación de largo término. Tal resultado puede interpretarse en apoyo de la idea de que la habituación de largo término en *Chasmagnathus* es específica del contexto, más allá de si éste funciona como un estímulo condicionado (Wagner, 1976, 1978, 1979), como un

componente adicional del estímulo incondicionado (Korn y Moyer, 1966) o como un factor que aumenta la recuperación de la información durante el test (Boulton y Swartzentruber, 1986).

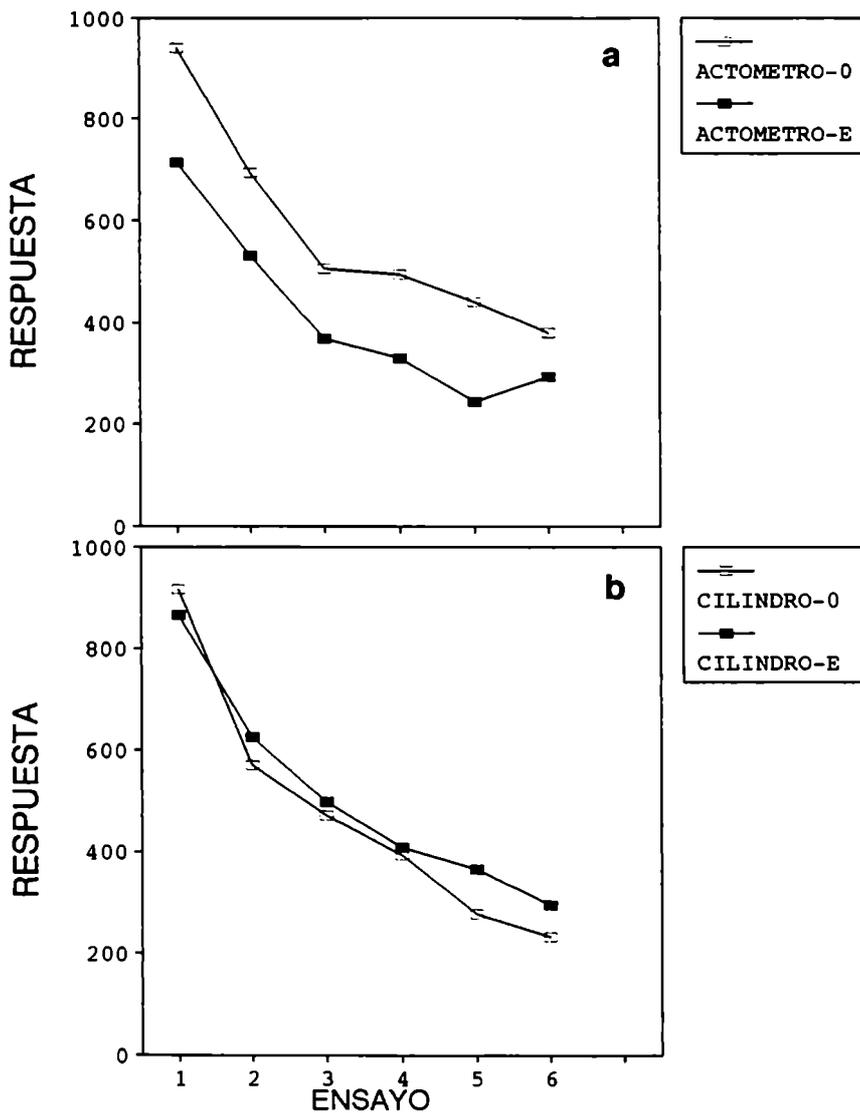


Fig. 20_ Memoria del contexto en *Chasmagnathus medianus*. La habituación de largo término es evaluada comparando la respuesta de grupos controles (0) y entrenados (E) durante una sesión de test de 6 ensayos, 24 hs. después de una sesión de entrenamiento de 15 ensayos. (a) Respuesta de los grupos alojados en los contenedores usuales durante la sesión de entrenamiento. (b) Respuesta de los grupos alojados en cilindros estáticos con piso de arena durante la sesión de entrenamiento.

Experimento 16

Si el contexto es realmente un factor determinante en la habituación de largo término de *Chasmagnathus*, un cambio en el ambiente del test significaría una novedad que de acuerdo a Marlin y Miller (1981) podría producir una sensibilización, aumentando el nivel de respuesta. Si esta predicción fuese correcta, cangrejos no entrenados y sin experiencia previa con las claves contextuales (grupo CILINDRO-0) debería mostrar una mayor reactividad que aquellos no entrenados pero que ya hubiesen experimentado las claves del test (grupo ACTOMETRO-0). Los resultados del experimento 15 están en contra de esta predicción debido a que no muestran diferencias evidentes entre las curvas de los grupos controles. Sin embargo, pareció pertinente ahondar esta cuestión aumentando el contraste entre las claves contextuales y acortando el período previo de adaptación al comienzo del test para evitar una habituación al recipiente movable del actómetro.

Método

Para este experimento se conformaron dos grupos de *Chasmagnathus* de 25 animales cada uno: el grupo ACTOMETRO y el grupo CILINDRO. Ninguno de los grupos recibió entrenamiento durante la primera sesión, pero mientras que los animales del grupo ACTOMETRO fueron alojados en los recipientes movibles de los mismos actómetros, los animales del grupo CILINDRO estuvieron alojados en los cilindros transparentes del experimento anterior, los cuales

se ubicaron ahora dentro de cajas con iluminación tenue. Todos los cangrejos fueron, luego de 24 hs., sometidos a una sesión de test de 6 ensayos en los recipientes movibles usuales, pero con 5 en lugar de 30 min. de tiempo de adaptación en los mismos.

Resultados y discusión

El nivel de respuesta del test del grupo CILINDRO fue claramente más alto que el del grupo ACTOMETRO (Fig. 21). Un Anova (2 x 6) realizado sobre estos datos reveló un efecto principal significativo, $F(1,48) = 6,6$ $P < 0,025$ y falta de interacción grupo x ensayo, $F(5,240) = 1,06$. Este resultado indica que la memoria del

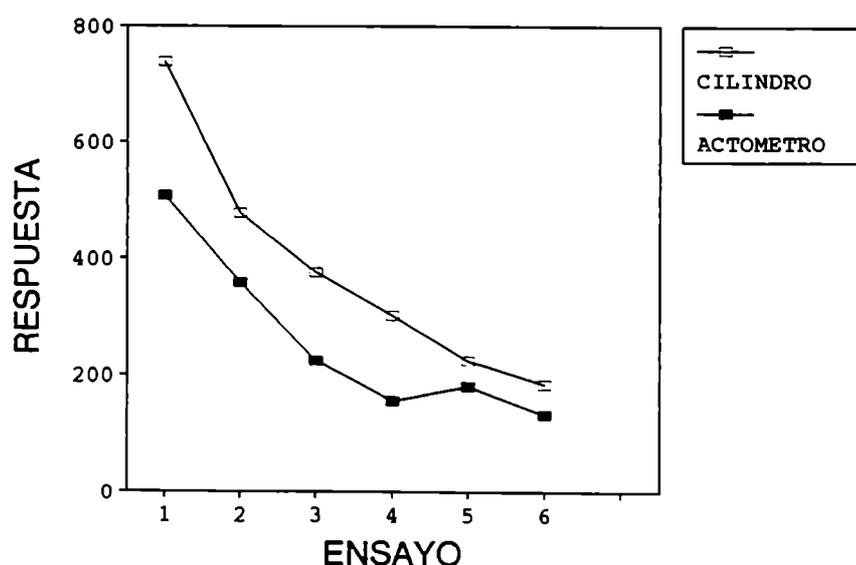


Fig. 21 __ Memoria del contexto en *Chasmagnathus medianus*. Respuesta de grupos no entrenados durante una sesión de test de 6 ensayos en el actómetro, 24 hs. después de haber estado alojados por 2 hs. en los actómetros o en los cilindros.

contexto puede ser adquirida independientemente de la habituación a la presentación iterativa del estímulo, y que dicha memoria reduce la reactividad si el test es realizado en el mismo contexto. Otros resultados de nuestro laboratorio conducen a la misma conclusión (Pedreira, comunicación personal), sugiriendo además que el efecto amnésico de la cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, sobre la habituación de largo término de *Chasmagnathus*, sería debido principalmente a la acción de esta droga sobre la memoria del contexto.

Los resultados de los experimentos 15 y 16 proporcionan evidencias convergentes en favor de la hipótesis sugerida anteriormente por el análisis de las figuras 8a, 14 y 16 acerca de que los estímulos contextuales son un factor determinante para la habituación de largo término en *Chasmagnathus*. En otras palabras, que la habituación de largo término en este animal es contexto específica.

Experimento 17

En virtud de los resultados anteriores, indicativos de la importancia del contexto en la habituación de *Chasmagnathus*, y teniendo en cuenta el escaso conocimiento que se posee acerca de las características poblacionales de la especie, resulta interesante preguntarse si existen diferencias regionales en el nivel de respuesta de estos cangrejos que pudiesen estar determinadas por diferencias ambientales poco aparentes. Por lo

tanto, la intención del presente experimento ha sido estudiar el nivel de respuesta al estímulo visual de peligro de *Chasmagnathus* que habitan en zonas diferentes.

Método

Los *Chasmagnathus* machos medianos fueron recolectados, durante un mismo día, en sitios distantes entre sí (aproximadamente 30 km.) del sistema de rias del extremo sur de la bahía de Samborombón. Dichas capturas se realizaron en: Faro San Antonio (lugar de recolección común del laboratorio), Canal 1, Gral. Lavalle y arroyo Tijeras. Para evaluar el nivel de reactividad se formaron grupos de 40 animales de cada procedencia a los que se les realizó un test de 6 ensayos.

Resultados y discusión

Como puede observarse en la figura 22, parece no existir diferencia en los niveles de reactividad de los cangrejos procedentes de los sitios estudiados. Un Anova de medidas repetidas (4 x 6) confirmó tal impresión.

Este resultado indica que, al menos en lo que a la respuesta de escape se refiere, la población de *Chasmagnathus* de la bahía de Samborombón sería homogénea.

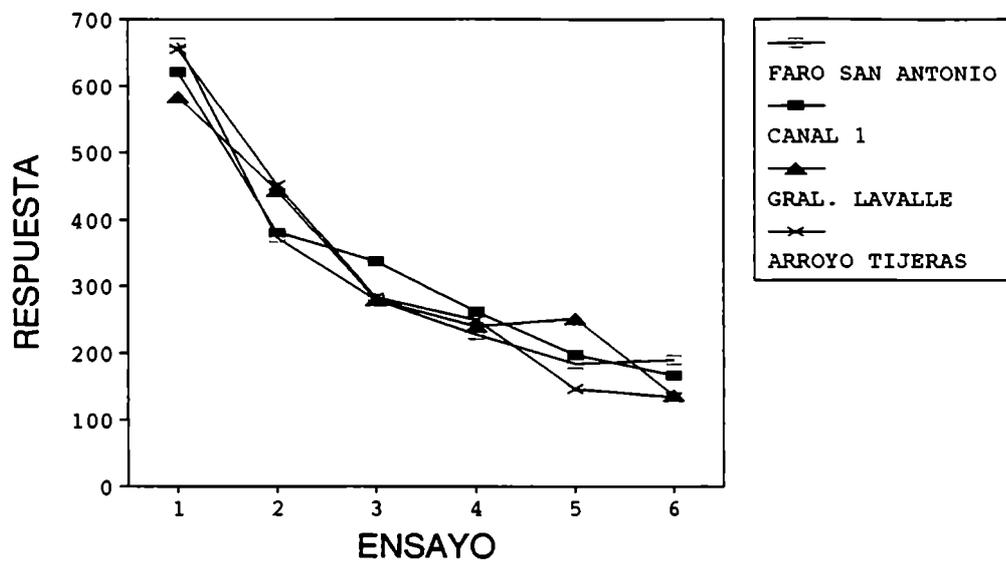


Fig. 22__ Niveles de respuesta de *Chasmagnathus medians* procedentes de diversas zonas de la bahía de Samborombón. La ordenada indica el promedio de los valores individuales por ensayo.

CAPITULO IX

DISCUSION GENERAL

Causas próximas: aspectos fisiológicos

Una primera conclusión que surge de los resultados de esta tesis (experimentos 1 y 2) es que las dosis de morfina que afectan la respuesta de escape de *Chasmagnathus* a la pantalla pasante 30 minutos después de la inyección, no perjudican ni el nistagmus ni los movimientos de rotación evaluados bajo las mismas condiciones. Este hecho sugiere que la inhibición de la respuesta a estímulos visuales de peligro por parte de la morfina, es provocada por una acción a nivel del sistema nervioso central y no por un efecto detrimental de dicha droga sobre la agudeza visual o la capacidad locomotora general. En otras palabras, el efecto sería específico de aquellas señales visuales que comportan un significado de peligro.

De acuerdo al modelo propuesto por Davis y File (ver pág. 10 y 33) se considera que una droga actúa sobre la vía refleja (habituaación intrínseca) si produce un cambio en la pendiente de la curva, y que actúa sobre un sistema modulador (habituaación extrínseca) si produce un desplazamiento paralelo de toda la curva. Por lo tanto, el hecho de que una dosis de morfina de 75 $\mu\text{g/g}$ cause un desplazamiento paralelo (Exp. 3b), permite suponer que los resultados observados en *Chasmagnathus* son debidos a un efecto

modulador.

La falta de retención de largo término registrada en los animales tratados antes del entrenamiento con dosis de 100 µg/g de morfina (experimentos 4 y 7) apoya la hipótesis de que el efecto depresivo es causado por la acción de la droga sobre la relación entre la señal y su significado. La administración previa de GABA bloquea, al igual que la morfina, la respuesta de escape al peligro, pero a diferencia de ésta, no reduce la habituación de largo término (experimentos 6 y 7), concluyéndose que el GABA deprime la respuesta sin interferir con la percepción.

La adquisición por el cangrejo de una habituación de largo término, a pesar de la supresión de la respuesta durante el entrenamiento debido al pretratamiento con GABA, ofrece un nuevo ejemplo del fenómeno conocido como habituación independiente de la respuesta (Peeke, 1984). Este fenómeno ha sido observado en otros animales (Applewhite y col., 1969; Curio, 1969; Davis y Wagner, 1967; Peeke y Veno, 1976) y apoya la idea de que la estimulación, y no la respuesta, es el factor crítico para adquirir la habituación de largo término. Sin embargo, es importante advertir que el concepto "habituación independiente de la respuesta", no implica adquisición sin ningún tipo de respuesta, sino adquisición sin la respuesta específica bajo estudio, es decir, en el presente trabajo, sin la bien caracterizada respuesta de escape. La prescindibilidad de la respuesta en *Chasmagnathus*, descarta la explicación del efecto amnésico de la morfina por una acción sobre el umbral de respuesta.

La falta de amnesia observada con la administración de la morfina post-entrenamiento (experimento 8), hace razonable concluir

que el efecto de dicha droga sobre la habituación de largo término, cuando es administrada antes del entrenamiento, no es causado por una falla en los procesos de almacenamiento o recuperación de la memoria.

Los resultados de estos experimentos junto a otros obtenidos en nuestro laboratorio (Lozada y col., 1988; Maldonado y col., 1989; Romano y col., 1990; Romano, 1991; Valeggia y col., 1989) proporcionan fuertes evidencias en favor de la hipótesis de que la morfina induce en *Chasmagnathus* una interrupción transitoria entre el estímulo (un objeto pasante) y su significado innato (la amenaza inminente del ataque de un predador).

De acuerdo al punto de vista más aceptado, el efecto inhibitorio de la morfina, así como el efecto hiperactivante del naloxono, estarían restringidos a los comportamientos inducidos por estímulos nociceptivos actuales [ej. en ratas, la explosión de actividad que sigue a un choque eléctrico (Fanselow, 1984a); el boxeo defensivo (Fanselow y Sigmundi, 1982); el reflejo de levantamiento de la cola (Watkins y col., 1982); la evitación activa de un choque eléctrico (Galizio y col., 1983)]. En modo consistente con esta idea, Warren e Ison (1982) no encontraron ningún tipo de efecto modulador opiáceo sobre reacciones evocadas por estímulos no dolorosos. Estos investigadores calibraron sonidos y choques eléctricos para que produjesen, por separado, un mismo grado de respuesta de espanto (del inglés startle response) en ratas y encontraron que la administración exógena de morfina tan sólo redujo la respuesta inducida por los choques eléctricos. El modelo recuperativo-defensivo-perceptual de Fanselow (ver pág. 20)

contempla una interacción entre el miedo y el dolor, pero admite que tan sólo el dolor y no el miedo, puede ser disminuído por la acción de un mecanismo opiáceo endógeno.

Sin embargo, Davis (1979) informa que la morfina produce una reducción de la respuesta de espanto potenciada en ratas, es decir, actúa sobre el aumento del espanto ante el estímulo sonoro, producido por la presencia de una luz previamente apareada con un choque (Brown y col., 1951). De esta manera, la morfina inhibe una respuesta provocada por un estímulo originalmente inocuo, que por medio de un condicionamiento pavloviano adquirió una connotación de peligro.

En un primer análisis, este último resultado aparenta ser similar a los obtenidos con *Chasmagnathus*, dado que en ambos casos la morfina demuestra modular la respuesta a un estímulo de peligro. Por lo tanto, los resultados alcanzados con el cangrejo podrían ser interpretados como en el trabajo de Davis, esto es, que la morfina atenúa la respuesta de escape del cangrejo al estímulo de peligro porque reduce su miedo o ansiedad. Sin embargo, hay una serie de razones que hacen preferible la explicación de una interferencia en el proceso de decodificación incluida como hipótesis de esta tesis.

Primero, el término "miedo" es empleado para definir un estado emocional que en las ratas es inferido a partir de una serie de cambios comportamentales concomitantes con la respuesta incondicionada bajo estudio. Así, el llamado estímulo de miedo condicionado ha mostrado provocar una amplia variedad de respuestas, incluyendo cambios en la frecuencia cardíaca (Black y Toledo, 1972), supresión del comportamiento apetitivo (Bouton y

Bolles, 1980), aumento de los comportamientos evitativos (Rescorla y Lolordo, 1965) y congelamiento (Sigmundi y col., 1980). Por el contrario, ninguna evidencia de cambios en el comportamiento, concomitantes con los cambios en la respuesta de escape, fueron identificados en *Chasmagnathus* ante la presentación del objeto pasante. Coincidentemente, en estudios de condicionamiento efectuados con el cangrejo verde *Carcinus maenas* utilizando un estímulo aversivo (Abramson y Feinman, 1987; Abramson y col., 1988; Feinman y col., 1990) tampoco se describen cambios comportamentales concomitantes con la respuesta incondicionada. En consecuencia, hasta el presente parece injustificado suponer que la respuesta de escape a estímulos aversivos o peligrosos en *Chasmagnathus* se encuentre mediada por un estado emocional analogable al miedo.

Segundo, existe una notable diferencia entre la preparación de Davis y la descrita aquí: en la primera, la luz se convierte en una señal de peligro debido al apareamiento con choques eléctricos, y es debido a esa experiencia previa que más tarde la luz aumenta la respuesta de espanto a un estímulo sonoro; en la última en cambio, el objeto pasante es interpretado como una amenaza de daño innata (Krasne, 1972; Hiatt, 1948). A este respecto, la respuesta de escape del cangrejo se asemeja al reflejo normal de espanto acústico de la rata, el cual no es afectado por el pretratamiento con morfina (Davis, 1979; Warren e Ison, 1982).

Tercero, las evidencias provenientes de esta tesis indican que los opiáceos alteran la percepción de los estímulos visuales de peligro por provocar un debilitamiento de la conexión entre la señal y su significado. Tales conclusiones no pueden ser extraídas de los experimentos de Davis debido a que en dicho estudio no se

evaluó la posibilidad de que el efecto inhibitorio de la morfina sobre la respuesta de espanto potenciada de la rata, se deba a una alteración sobre el vínculo entre la luz y su significado adquirido de peligro.

Cuarto, el enfoque interpretativo de que la morfina actúa interfiriendo el normal procesamiento de decodificación del estímulo, implica un modelo (ver más adelante pág. 133) bastante aproximado al esquema circuital sugerido por Nalbach para explicar cómo los cangrejos detectan el acercamiento de un objeto e inician la reacción de escape (Nalbach, 1990).

Causas últimas: aspectos evolutivos

Las diferencias interespecíficas en la capacidad de habituación de la respuesta de escape a la presentación iterativa de un estímulo visual de peligro pueden resumirse en los siguientes términos: *Chasmagnathus* presenta una capacidad mucho mayor que *Pachygrapsus* para habituarse, mostrando una habituación de corto término más profunda mediada parcialmente por un mecanismo opiáceo endógeno, y una adquisición más rápida de una mayor habituación de largo término, mediada al menos parcialmente por la representación mnésica de las claves del contexto. Estas diferencias, tienen lugar a pesar de la estrecha relación filogenética entre las especies estudiadas, ambas pertenecen a la familia Grapsidae, y a pesar de tratarse en ambos casos de cangrejos corredores semiterrestres que despliegan una similar respuesta de escape. En consecuencia, resulta razonable buscar algún tipo de correlación entre las

diferencias en la capacidad de habituación y las diferencias en las presiones ecológicas que pudiesen haber favorecido la selección de uno u otro fenotipo (Peeke y Petrinovich, 1984; Petrinovich, 1984; Treisman, 1984).

Es un hecho evidente que *Chasmagnathus* y *Pachygrapsus* son claramente dispares en lo que se refiere a las condiciones ecológicas impuestas por sus respectivos hábitats. *Chasmagnathus* es un cangrejo de estuario, vive sobre un sustrato fangoso blando y se refugia en cuevas que él mismo construye, en tanto *Pachygrapsus* es marino, vive sobre sustratos de roca sólida y busca refugio en las grietas y cavidades de las piedras. No obstante, la diferencia ecológica más importante en relación al presente estudio concierne al universo de objetos y sombras móviles que circundan a cada cangrejo y que podrían ser confundidas con un predador.

Chasmagnathus integra populosas comunidades cuya densidad alcanza valores de hasta 120 cangrejos por m² (Botto e Irigoyen, 1979) ocupando cuevas individuales, o a veces compartidas, ubicadas muy cerca unas de otras. La especie habita en el mesolitoral superior y supralitoral, un ámbito colonizado por una densa vegetación representada principalmente por *Spartina densiflora* y *Spartina alterniflora*. Estas especies vegetales presentan largas hojas erectas que van desde 0,3 a 2 m. de altura y se las encuentra en densidades que algunas veces sobrepasan los 8 Kg/m² (Olivier y col., 1969 I; Botto e Irigoyen, 1979). La figura 23a ilustra una vista general del terreno y la figura 23b un detalle en el que se observa un ejemplo de la relación espacial del cangrejo, su refugio y la vegetación. Por otra parte, los individuos de la especie *Pachygrapsus* viven de manera bastante aislada unos de otros,

ocupando el mesolitoral superior, en terrenos rocosos desprovistos de vegetación halófila, es decir que habitan en un biotopo desnudo en comparación al de *Chasmagnathus*. La figura 23c ilustra ese ambiente.

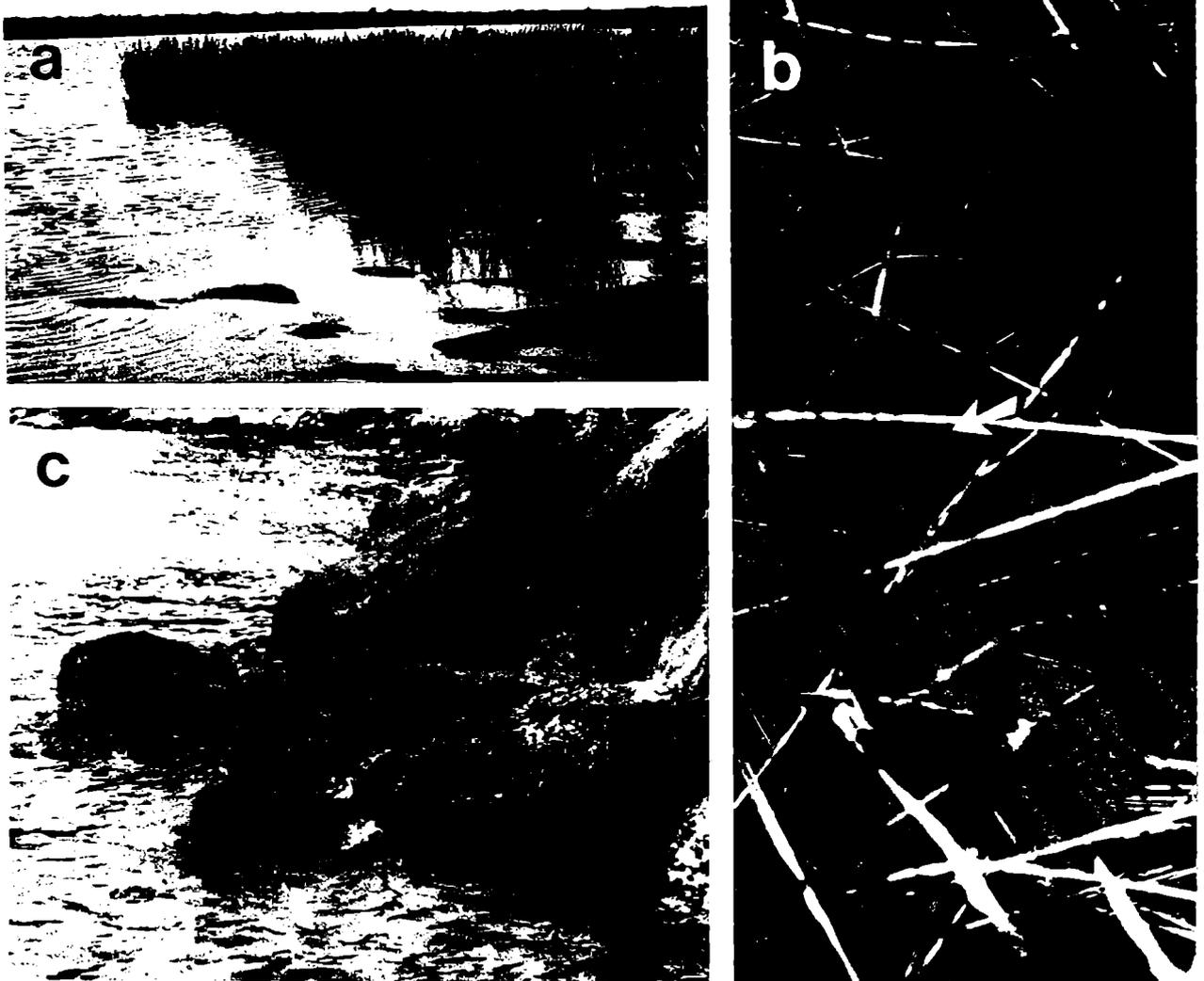


Fig 23__ a) Vista del "cangrejal" de la bahía de Samborombón, donde viven miríadas de *Chasmagnathus granulatus*. b) Detalle del hábitat de *Chasmagnathus*. la flecha indica un cangrejo justo delante de su cueva. c) Panorama de los promontorios rocosos en el golfo de Nápoles, cerca de la Stazione Zoologica, donde fueron capturados los *Pachygrapsus marmoratus*.

Cualquier organismo que ante un estímulo determinado es capaz de ejecutar respuestas diferenciadas, se enfrenta al problema de obtener suficiente información acerca de su ambiente para realizar la elección del comportamiento más conveniente. Algunos estímulos portan información precisa que no requiere interpretación sino tan sólo respuesta, otros en cambio, informan acerca de una consecuencia que no siempre se produce, por lo que requieren ser evaluados. Es dable preguntarse que comportamiento favorecería la selección natural en respuesta a una secuencia de señales repetidas que porten uno u otro tipo de información. Se puede suponer que, si el significado de la señal no cambia a lo largo de las presentaciones se favorecería una ausencia de habituación, tales señales son conocidas como **indicadores determinísticos**. Por el contrario si el tipo de señal puede corresponder con una probabilidad variable a un número diferente de causas, las señales se denominan **indicadores probabilísticos** y conducirían a procesos de habituación (Treisman, 1984). Consecuentemente, en relación a los estímulos que en la naturaleza señalizan peligros se postula que cuanto mayor es la ambigüedad de la señal mayor es el grado de habituación a ese estímulo (Fantino y Logan, 1979). Así, cuando un estímulo que de manera innata señala un posible daño, cambia su información probando ser invariablemente inocuo, se espera que produzca una profunda habituación [ej. la habituación de poliquetos a la proyección súbita de sombras, dentro de un contexto lleno de plantas marinas flotantes (Clarck, 1960; 1960a ; Nicol, 1950), o la habituación de *Aplysia* a estímulos táctiles, dentro de un biotopo de aguas turbulentas (Carew and Kupfeermann, 1974)]. Por el contrario, no se espera habituación alguna, cuando la relación

que vincula el estímulo y el daño se mantiene unívoca [ej. el reflejo pupilar inducido por relámpagos de luz (Lehner, 1941)]. Por consiguiente, el alto grado de habituación de *Chasmagnathus* al pasaje iterativo de un objeto, podría explicarse por la gran ambigüedad que posee esta señal para dicho animal. En efecto, *Chasmagnathus* vive inmerso en un ambiente repleto de objetos pasantes, representados fundamentalmente por las oscilaciones de las largas hojas de *Spartina* provocadas por el viento, las cuales, aunque puedan inducir la respuesta de escape, obviamente no son seguidas por daño alguno. En contraste, la mediocre habituación de *Pachygrapsus* podría explicarse por la alta probabilidad de que un objeto pasante señale realmente un predador, ya que este animal habita un biotopo escaso en estímulos ambiguos de esas características.

Si dicha interpretación es correcta, el valor adaptativo de las diferencias en la habituación entre ambas especies puede ser puesto en los siguientes términos.

Cuando *Chasmagnathus* se enfrenta reiteradamente y sin consecuencias con un estímulo visual de peligro dentro de un contexto reconocible, esto significa, conforme a lo que resulta de la historia natural de la especie, que ese estímulo no comporta riesgo y que puede abolirse la respuesta de escape, lo que le permite ahorrar tiempo y esfuerzos; por el contrario, la historia natural de *Pachygrapsus*, para quien casi todo objeto pasante es un predador, le determina un

sostenido nivel de reactividad ante un estímulo visual iterativo de peligro, lo que le permite mantenerse a salvo de los enemigos.

Lozada y col. (1990) demostraron que *Chasmagnathus* habituados al pasaje de una pantalla movida horizontalmente, recuperan su respuesta de escape cuando son evaluados con la misma pantalla pero movida verticalmente. Por lo tanto, la habituación de largo término en *Chasmagnathus* es estímulo-específica, es decir, depende de la constancia en las variables espaciales de la estimulación, un resultado coincidente con los obtenidos en condiciones naturales con otros animales, donde la habituación de largo término no se observa cuando los estímulos aparecen en sitios o con movimientos diferentes a los iniciales (Shalter, 1984; Falls, 1969; Hale y Almquist, 1960). Además, los resultados de esta tesis sugieren la existencia de una especificidad del contexto (experimentos 16 y 17). Por lo tanto, pese a que la respuesta de escape de *Chasmagnathus* puede ser eficazmente habituada, el cangrejo mantiene la capacidad de reaccionar con esa misma respuesta ante cualquier novedad, sea en el estímulo habituante como en el entorno.

La hipótesis que se viene exponiendo implica suponer que las oscilaciones de las hojas de *Spartina* son efectivamente capaces de evocar una respuesta de escape habituable. El resultado de un test realizado bajo condiciones de laboratorio permite tal suposición. En efecto, cuando la pantalla pasante se reemplazó por un conjunto de hojas de *Spartina* (simulando las características del follaje en la naturaleza) que se hicieron oscilar por sobre el actómetro

durante 9 seg. en una sesión de 15 ensayos con un intervalo entre ensayos de 180 seg., se obtuvo una fuerte reacción de escape que se atenuó como de costumbre (Fig. 24).

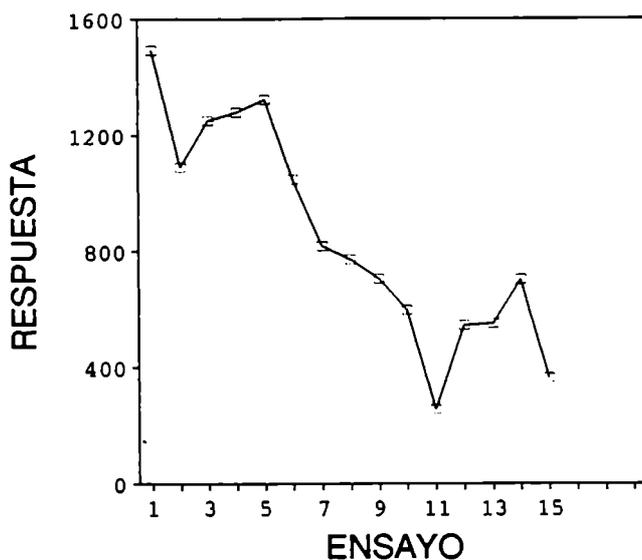


Fig. 24__ Respuesta de un cangrejo *Chasmagnathus* durante una sesión de 15 ensayos con 180 seg. de intervalo entre estímulos, donde el estímulo consistió en movimientos oscilantes de un conjunto de hojas de *Spartina* por sobre el actómetro, en lugar de la típica pantalla.

Las diferencias que conciernen al mecanismo opiáceo endógeno que asiste la habituación de corto término en *Chasmagnathus* y no lo haría en *Pachygrapsus*, deben también ser entendidas como una consecuencia de procesos de selección natural. En efecto, varios autores han explicado las diferencias halladas en las respuestas antinociceptivas y en la actividad opiácea endógena, en términos de adaptaciones genéticas a las condiciones ambientales experimentadas por diferentes linajes de una misma especie (Moskowitz y col., 1985; Oliverio y col., 1983; Panocaka y col., 1986), por diferentes poblaciones de la misma especie [como las del

ratón *Peromyscus maniculatus* que ocupan áreas geográficas de ambientes diferentes (Innes y Kavaliers, 1987; Kavaliers e Innes, 1987)], o por los diferentes morfos del caracol de tierra *Cepea nemoralis* (Kavaliers, 1988; 1988a; 1989; 1989a; 1992).

Los estudios acerca de la participación de un mecanismo opiáceo endógeno en la modulación de la habituación en *Chasmagnathus* estuvieron restringidos a la habituación de corto término. Sin embargo, podría ser que este mecanismo tuviese una función moduladora también en la habituación de largo término, aunque activado por un estímulo diferente. Es decir, mientras en el entrenamiento, los opiáceos endógenos serían liberados por la presentación iterativa del estímulo; en el test, podrían ser liberados por la sola exposición a las claves contextuales durante el período de adaptación, reduciendo así el nivel de respuesta desde los primeros ensayos. A este respecto, es interesante hacer notar que la retención se manifiesta como un descenso paralelo de la curva de respuesta de los animales entrenados en relación a los controles (Fig. 20a y primeros bloques de las Fig. 8a, 14 y 16), de una manera semejante al descenso provocado por la preadministración de 75 $\mu\text{g/g}$ de morfina (Fig. 7). Esta proposición se enmarca aproximadamente dentro del fenómeno conocido como analgesia condicionada (Fanselow y col, 1988; Fanselow y col, 1991; ver pág. 20). Sin embargo, pese a que tres de los hallazgos de esta tesis se ajustan a esa hipótesis, es decir, la memoria del contexto, la especificidad del contexto de la habituación de largo término y el bajo nivel de respuesta desde el primer ensayo, no existen aún evidencias de que el naloxono administrado antes del test suprima el decremento inicial de la respuesta en *Chasmagnathus*

habitados.

Se ha argumentado que el valor adaptativo de la SIA de tipo opiácea, consiste en permitirle al animal sustraerse ante situaciones comportamentalmente incontrolables, de modo de ahorrar así energías (ver pág. 23).

Tomando en consideración que en *Chasmagnathus* funciona un mecanismo opiáceo endógeno que contribuye a alcanzar una más rápida y profunda habituación de corto término, la posesión de tal mecanismo tendría un valor adaptativo que puede ser descrito en los siguientes términos.

Quando *Chasmagnathus* se enfrenta reiteradamente y sin consecuencias con un estímulo visual de peligro dentro de un contexto reconocible, esto significa, conforme a lo que resulta de la historia natural de la especie, que ese estímulo no comporta riesgo. En tales circunstancias, la activación de un sistema opiáceo endógeno, interfiriendo el significado de peligro del estímulo, inhibe la respuesta de escape, permitiéndole ahorrar tiempo y esfuerzos.

Los resultados obtenidos con ambas especies demuestran que los animales más viejos poseen menor capacidad para adquirir una habituación de largo término (Experimento 11). A pesar de las abundantes investigaciones realizadas en vertebrados que indican una disminución de la capacidad de aprendizaje y memoria por efecto de la edad, existen muy pocos estudios de esta índole en

invertebrados.

Un trabajo reciente (Chichery y Chichery, 1992) informa que los individuos viejos del cefalópodo *Sepia officinalis*, a diferencia de los jóvenes, muestran una seria incapacidad en lo referido a la memoria de largo término, acompañada por defectos en la coordinación visual-motora, falta de comportamiento apetitivo y señales de degeneración en algunas áreas del sistema nervioso central, síntomas que en conjunto anticipan la muerte inminente del animal. Sin embargo, no necesariamente los cambios ocurridos en el comportamiento con la edad deben estar relacionados con la decadencia senil; en muchos casos, podrían estar determinados por cambios en las presiones ecológicas. Tal posibilidad parece ser especialmente viable en lo que respecta a los comportamientos de evitación de predadores, ya sea a causa de la selección del tamaño del alimento por parte del predador (Morse, 1980; Alford, 1989) de modo que el sólo tamaño constituye un refugio para la presa (Richards, 1992) o debido a los cambios fisiológicos y morfológicos que tienen lugar en los animales mayores y que favorecen la adopción de nuevas estrategias de evitación. Dos ejemplos ilustran este tipo de cambio ontogénico del comportamiento. En el estado juvenil de la langosta *Homarus americanus*, la respuesta de escape prevalece sobre la respuesta defensiva, mientras que en los animales mayores, la última reemplaza casi totalmente a la primera (Lang y col., 1977). En el mántido *Stagmatoptera biocellata*, se conocen dos estrategias de evitación del predador, el congelamiento y la reacción para espantar, pero mientras que la primera es la única respuesta defensiva en los individuos del primer estadio larval, la segunda es la única en los adultos (Balderrama y

Maldonado, 1973).

Considerando que los *Chasmagnathus* y *Pachygrapsus* grandes poseen intactas sus aptitudes para escapar y no manifiestan síntomas de incapacidades físicas, parece indicado buscar alguna correlación entre la reducción ontogénica en la capacidad de habituación de largo término y cambios ontogénicos en las presiones ecológicas. En otras palabras, preguntarse cuales podrían ser los cambios ecológicos en la vida de los cangrejos grandes, que hacen que la capacidad de habituación de largo término deje de resultar adaptativa.

A diferencia de los individuos jóvenes, los *Chasmagnathus* más grandes se encuentran preferencialmente en áreas de escasa vegetación (Bond-Buckup y col, 1991) de modo que no se hallan sumergidos en el típico universo de hojas de *Spartina* movidas por el viento. Por lo tanto, de acuerdo con las ideas expresadas anteriormente para interpretar los resultados entre las especies, podría decirse que el cambio ontogénico de ambiente implica para *Chasmagnathus* un aumento en la probabilidad de que un objeto pasante este señalizando efectivamente la presencia de un verdadero predador, y en consecuencia, una disminución del valor adaptativo de la habituación de largo término.

Un rasgo que parece caracterizar el comportamiento de los individuos mayores, tanto de *Chasmagnathus* como de *Pachygrapsus*, es un marcado decaimiento en su actividad exploratoria. Esta observación es coincidente con la apuntada por Hiatt (1948) para *Pachygrapsus crassipes* y con resultados obtenidos en nuestro laboratorio trabajando con *Chasmagnathus* en un dispositivo de elección de doble cámara (Dimant y Maldonado, 1992) donde los

cangrejos grandes instalados en uno de los compartimientos, mostraron latencias de pasaje a la otra cámara, significativamente superiores a la de cangrejos mas jóvenes (jóvenes: $X= 181,53$ seg. $EE= 27,73$; viejos: $X= 340.25$ seg. $EE= 37,89$; $P < 0,005$; datos del autor). Si este cambio ontogénico, es entendido como una tendencia a pasar largos períodos de tiempo dentro de cuevas o grietas, una habituación de larga duración a un objeto pasante parecería ya no representar un rasgo de valor adaptativo.

En resumen, la preferencia por áreas sin vegetación en el caso de los grandes *Chasmagnathus* y la fuerte tendencia en la reducción de la exploración en el caso de los individuos grandes de *Chasmagnathus* y *Pachygrapsus*, podrían hacer de su capacidad juvenil para adquirir una habituación de largo término ante un objeto pasante reiterado, un carácter de escaso valor adaptativo. La hipótesis que relaciona reducción de la memoria en los animales viejos con cambios en las presiones ecológicas ligadas a la edad, está de acuerdo con observaciones sobre cambios ontogénicos en el nicho ecológico, sin embargo, es necesaria una mayor información sobre los ambientes y el tiempo que transcurren en cuevas y grietas los animales jóvenes y viejos de cada especie.

Un modelo de valor heurístico

La teoría evolutiva ofrece una explicación general acerca del comportamiento animal, con un doble enfoque; uno evolutivo propiamente dicho, que abarca el conjunto de interrogantes que giran en torno de una misma pregunta: qué rasgos del mundo real,

(qué constreñimientos ambientales) hacen del patrón comportamental que observamos el mejor para la sobrevivencia del animal; y un enfoque fisiológico, que ocupa las cuestiones acerca de las disposiciones anatómicas y fisiológicas que adecuan las aptitudes del animal a los requisitos de su situación evolutiva. Durante el desarrollo de la presente tesis se han transitado ambos aspectos, obteniéndose resultados que han permitido las interpretaciones hasta aquí referidas. A partir de allí, y en base a una serie de modelos propuestos por otros autores tendientes a explicar diferentes aspectos de los procesos de habituación y de modulación nociceptiva, se propone una adaptación del esquema general ideado por Davis y File (1984), para interpretar el funcionamiento de la habituación a un estímulo visual de peligro en *Chasmagnathus*. El mismo se ilustra en la figura 25, donde puede verse que el estímulo visual de peligro evoca la respuesta de escape a través de la vía refleja estímulo-respuesta, a la vez que por una vía distinta activa el mecanismo opiáceo modulador cuya acción se manifiesta, a medida que el estímulo se reitera, como una inhibición pre y/o postsináptica sobre la vía refleja. La disminución de la eficiencia sináptica en la vía refleja a lo largo de los ensayos corresponde a la habituación intrínseca, en tanto que la inhibición producida por la activación del sistema modulador corresponde a la habituación extrínseca. Ambos procesos conducen en igual sentido a la reducción de la respuesta de escape. Ha sido sugerido que la presentación apareada de un estímulo con la activación de un sistema modulador puede conducir a la activación condicionada de ese sistema (Fanselow y col., 1988; Fanselow y col., 1991; Davis, 1979). En la teoría de SOP (pág. 20) se propone que en la

habituaación subyace un proceso de condicionamiento en el que las claves del contexto ambiental se asocian de manera de convertirse en un estímulo condicionado. Teniendo en cuenta estas dos últimas consideraciones, puede verse en el esquema que el sistema modulador opiáceo de *Chasmagnathus* podría ser activado tiempo después, por la sola exposición a las claves contextuales que estuvieron presentes durante la percepción del estímulo aversivo.

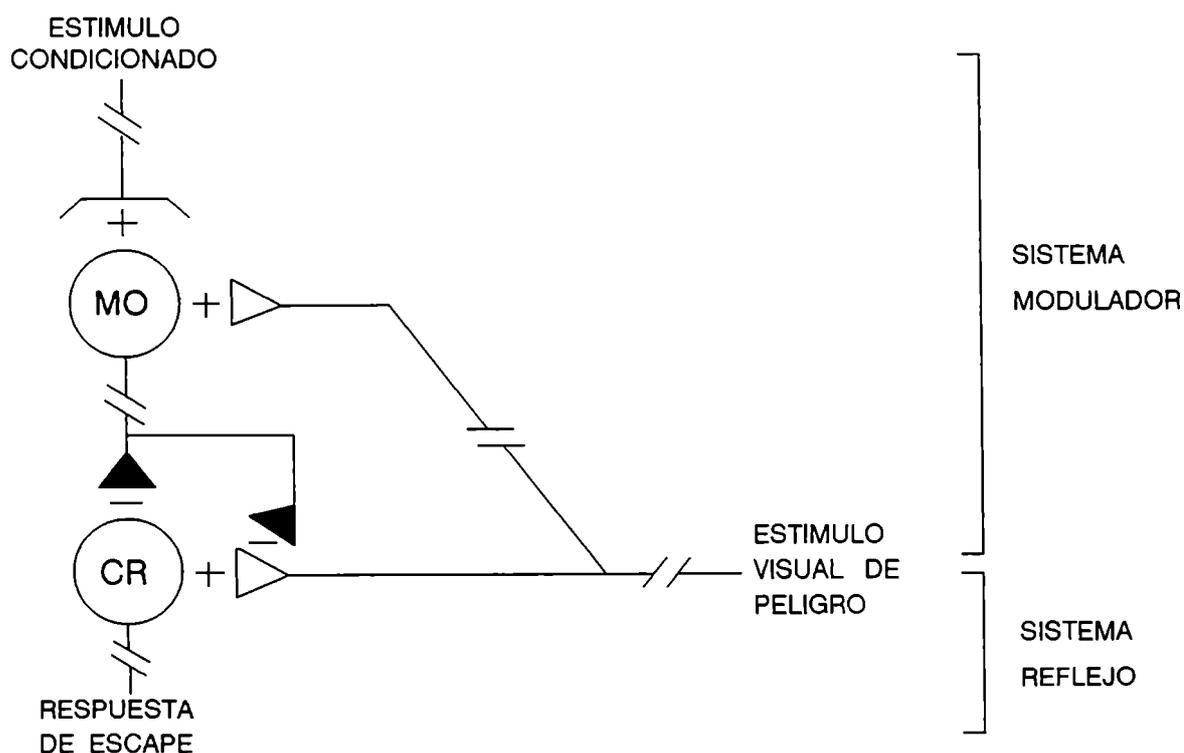
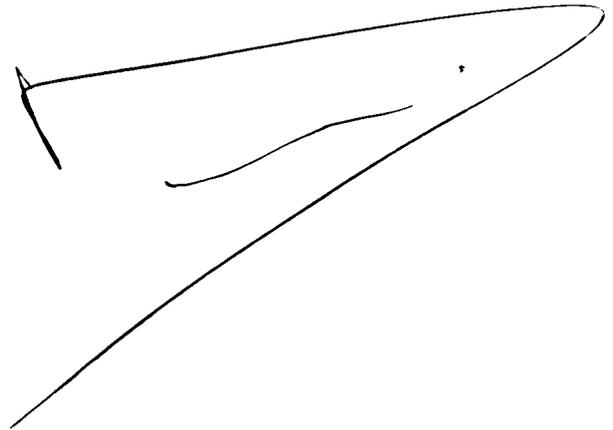


Fig. 25 — Esquema de un posible modo de funcionamiento de la habituación a un estímulo visual de peligro en *Chasmagnathus*. CR: células reflejantes, MO: células del sistema modulador opiáceo. Los signos + indican sinapsis excitatorias, los - sinapsis inhibitorias. Las líneas interrumpidas sugieren la posibilidad de un número indeterminado de neuronas intermedias.

Debe observarse que la referencia a una vía o sistema reflejo no implica suponer que las complejas relaciones neurológicas que se activan desde la estimulación, pueden reducirse a un "arco reflejo". Treisman (1984), sugiere que es mejor considerar separadamente tres aspectos de ese sistema: a) el sistema perceptual, b) los efectores que pueden ser activados por éste y c) el mecanismo de decisiones que debe elegir entre las respuestas posibles; y propone un modelo teórico de interacción entre esas tres partes. Es evidente que aún la vía refleja más simple que pueda concebirse para explicar la respuesta de escape a un estímulo visual en *Chasmagnathus*, involucra un gran procesamiento de la información que ingresa, antes de la toma de decisión de la respuesta más conveniente. El modelo propuesto por Nalbach (ver pág. 29) proporciona una idea de la magnitud de tal complejidad. El enfoque interpretativo de que la morfina actúa interfiriendo el normal procesamiento de decodificación del estímulo, implica un modelo bastante aproximado al esquema circuital sugerido por Nalbach para explicar cómo los cangrejos detectan el acercamiento de un objeto e inician la reacción de escape. En ese modelo la toma de decisión entre las opciones escapar o no escapar, la llevarían a cabo las células reflejantes de la médula interna. De acuerdo al esquema aquí propuesto, la generación de potenciales de acción de estas células puede ser modulada en *Chasmagnathus*, por la acción de un sistema opiáceo endógeno.

El posible interés del esquema que aquí se propone radica en su poder heurístico. En efecto, éste permite realizar algunas predicciones capaces de ser puestas a prueba. Dos de ellas tienen relación con los resultados de la presente tesis. a) En estudios

electrofisiológicos, partiendo de la base de que el parámetro crítico del estímulo para evocar la respuesta es un nivel de excitación supraumbral en las células reflejantes, debería esperarse que la morfina, pero no el GABA, fuese capaz de disminuir la frecuencia de disparo de potenciales de acción de dichas células ante la presentación de estímulos visuales de peligro. b) En estudios farmacológicos, admitiendo que las claves contextuales pueden condicionarse de manera de activar el mecanismo opiáceo endógeno, se esperaría que la administración pre-test de naloxono redujese al menos parcialmente la retención.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. Carr', written in a cursive style.A large, stylized handwritten signature in black ink, possibly 'J. Carr', written in a cursive style.

Referencias:

_Abrams T. W. y Kandel E. R. (1988). Is contiguity detection in classical conditioning a system or a cellular property? Learning in *Aplysia* suggests a possible molecular site. *TINS*, 11, 128-135.

_Abramson C. L., Feinman R. D. (1987). Operant punishment of the eye elevation in the green crab, *Carcinus maenas*. *Behav. Neur. Biol.*, 48: 259-277.

_Abramson C. I. y Feinman R. D. (1988). Classical conditioning of the eye withdrawal reflex in the green crab. *J. Neurosci.*, 8: 2907-2912.

_Akil H., Madden J., Patrick R. L. y Barchas J. D. (1976). Stress induced increase in endogenous opiate peptides: Concurrent analgesia and its partial reversal by naloxone. En: Kosterlitz H. W. y Terenius L. Y. (eds.). *Opiates and endogenous opioid peptides*. Amsterdam: Elsevier, pp.: 63-70.

_Alford R. A. (1989). Variation in predator phenology affects predator performance and prey community composition. *Ecology*, 70: 206-219.

_Amir S. y Amit Z. (1987). Endogenous opioid ligands may mediate stress-induced changes in the affective properties of pain related behavior in rats. *Life Sci.*, 23: 1143-1152.

_Amir S., Brown Z. W. y Amit Z. (1980). The role of endorphins in stress: Evidence and especulations. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 4: 77-86.

_Amit Z. T. y Galina Z. H. (1986). Stress-induced analgesia: Adaptive pain suppression. *Physiol. Rev.*, 66: 1091-1120.

_Amit Z. T. y Galina Z. H. (1986a). Stress induced analgesia plays an adaptive role in the organization of behavioral responding. *Brian Research Bulletin*, 21: 955-958.

_Applewhite B. P. Gardner F. T. y Lapan E. (1969). Physiology of habituation learning in a protozoan. *Ann. New York Acad. Sci.*, 31: 842-849.

_Atwood H. L. (1982). Synapses and neurotransmitters. En: Bliss D. E. (ed.). *The biology of crustacea*. (Vol. 4). New York: Academic Press. pp.: 105-150.

_Balderrama N. y Maldonado H. (1973). Ontogeny of the behavior in the praying mantis. *J. Insect Physiol.*, 19: 319-336.

_Basbaum A. I. y Fields H. L. (1984). Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitri. *Annu. Rev. Neurosci.*, 7: 309-338.

_Bateson P. (1991). Assessment of pain in animals. *Anim. Behav.*,

42: 827-839.

_Benson J. A. (1984). Octopamine alters rhythmic activity in the isolated cardiac ganglion of the crab, *Portunus sanguinolentus*. *Neurosci. Lett.*, 44: 59-64.

_Black A. H. y de Toledo L. (1972). The relationship among classically conditioned responses: Heart rate and skeletal behavior. En: Black A. H. y Prokasy W. F. (eds.). *Classical conditioning II: Current theory and research*. New York: Appleton, Century, Crofts. pp.: 290-311.

_Bloom F. E. (1988). Neurotransmitters: Past, present, and future directions. *FASEB J.*, 2: 32-41.

_Bodnar R. J. (1986). Neuropharmacological and neuroendocrine substrates of Stress-Induced Analgesia. En: Kelly D. D. (ed.). *Stress-Induced Analgesia*. *Annals New York Acad. Science*, 467: 345-360.

_Bond-Buckup G., Ferreira-Fontoura N., Possa-Marroni N., y Kucharski L. C. (1991). O caranguejo. Editora da Universidade. Porto Alegre, R.S. Brasil.

_Boschi E. E. (1972). Los crustaceos decapodos brachyura del litoral bonaerense. *Bol. Inst. Biol. Marina, Mar del Plata*, 6: 1-99.

_Botto J. L. e Irigoyen H. R. (1979). Bioecología de la comunidad del cangrejal. I. Contribucion al conocimiento biologico del Cangrejo de Estuario *Chasmagnathus granulatus* Dana (Crustaceos Decapoda Grapsidae), en la desembocadura del Rio Salado, Pcia. de Buenos Aires. In: UNESCO (ed.) *Memorias del seminario sobre ecología bentónica y sedimentación de la plataforma continental del Atlantico Sur*. UNESCO, Montevideo, pp.: 161-169.

_Boulton M. E. y Swartzentruber D. (1986). Analysis of the associative and occasion-setting properties of contexts participating in a pavlovian discrimination. *J. Exp. Psychol.: Anim. Behav. Process*, 12: 333-350.

_Brown J. S., Kalish H. I. y Farver I. E. (1951). Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *J. Exp. Psychol.*, 41: 317-327.

_Brunner D., Maldonado H. (1988). Habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*: effect of morphine and naloxone. *J. Comp. Physiol. A*, 162: 687-694.

_Bustamante J. y Krasne F. B. (1991). Effect of octopamine on transmission at the first sinapse of the crayfish lateral giant escape reaction pathway. *J. Comp. Physiol.*, 169: 369-377.

_Bouton M. E. y Bolles R. C. (1980). Conditional fear assessed by freezing and by the suppression of the three different baselines. *Anim. Learn. Behav.*, 8: 429-434.

_Campbell B. A. y Jaynes J. (1966). Reinstatement. *Psychological Rev.*, 73: 478-480.

_Carew T. J. (1984). An introduction to cellular approaches used in the analysis of habituation and sensitization in *Aplysia*. En: Peeke H. V. S. y Petrinovich L. (eds.). *Habituation, sensitization, and behavior*. New York: Academic Press, pp. 205-249.

_Carew T. J., Pinsker H. M. y Kandel E. R. (1972). Long-term habituation of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, 175, 451-454.

_Carew T. J. y Kupfermann I. (1974). The influence of different natural environments on habituation in *Aplysia californica*. *Behav. Biol.*, 12: 339-345.

_Cartwright B. A. y Collett T. S. (1987). Landmark maps for honeybees. *Biol. Cyber.*, 57: 85-93.

_Charmantier-Daures M. (1987). Transplantation croisees d'organes y chez des crabes jeunes et ages de l'especie *Pachygrapsus marmoratus* (Crustace, Decapode, Brachyoure). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 103: 43-46.

_Chichery M. P. y Chichery R. (1992). Behavioral and neurohistological changes in aging *Sepia*. *Brian Res.*, 574: 77-84.

_Chrachri A. y Clarac F. (1987). Induction of Rhythmic activity in motoneurons of crayfish thoracic ganglia by cholinergic agonists. *Neurosci. Lett.*, 77: 49-54.

_Clark R. B. (1960). Habituation of the Polychaete *Nereis* to sudden stimuli. I. General properties of the habituation process. *Anim. Behav.*, 8: 82-91.

_Clark R. B. (1960a). Habituation of the Polychaete *Nereis* to sudden stimuli. II. General properties of the habituation process. *Anim. Behav.*, 8: 92-103.

_Cullen E. (1957). Adaptation in the kittiwake to cliff-nesting. *Ibis*, 99: 275-302.

_Curio E. (1969). Funktionsweise und stammesgeschichte des flugfeinderkennens einiger Darwin-finken (Geospizinae). *Z. Tierpsychol.*, 26: 394-487.

_Davis R. C. (1934). Modification of the Galvanic reflex by dialy repetition of a stimulus. *J. Exp. Psychol.*, 17, 504-535.

_Davis M. (1970). Effects of interstimulus interval length and variability on startle-response habituation in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 72, 177-192.

_Davis M. (1979). Morphine and naloxone: effect on conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Eur. J.*

Pharmacol., 54: 341-347.

_Davis M., File S. E. (1984). Intrinsic and extrinsic mechanisms of habituation and sensitization: implication for the design and analysis of experiments. En: Peeke H. V. S., Petrinovich L. (eds.). Habituation, sensitization and behavior. Academic Press, New York, pp. 287-323.

_Davis M. y Wagner A. R. (1967). Habituation of startle response under incremental sequence of stimulus intensities. J. Comp. Physiol. Psychol., 67: 486-492.

_Dimant B. y Maldonado H. (1992). Habituation and associative learning during exploratory behavior of the crab *Chasmagnathus*. J. Comp. Physiol. A, 170: 749-759.

_Doge R. (1923). Habituation to rotation. J. Exp. Psychol., 6, 1-35.

_Domjam M. y Galef. B. (1983). Biological constraints on instrumental and classical conditioning: Retrospect and prospect. Anim. Learn. Behav., 11: 151-161.

_Edwards D. H. (1991). Mutual inhibition among neural command systems as a possible mechanism for behavioral choice in crayfish. J. Neurosci., 11: 1210-1223.

_Eisemann C. H., Jorgensen W. K., Merritt D. J., Rice M. J., Cribb B. W., Webb P. D. y Zalucki M. P. (1984). Do insects feel pain?—A biological view. Experientia, 40: 164-167.

_Erber J y Sandeman D. C. (1990). The modulation of the optokinetic response by serotonin and octopamine in the crab *Leptograpsus variegatus*. En: Wiese K., Kren W. D., Tautz J., Reichert H., Mulloney B. (eds.). Frontiers in crustacean neurobiology. Birkhauser, Zurich, pp.: 388-393.

_Falls J. B. (1969). Functions of territorial song in the White-throated Sparrow. En: Hinde R. A. (ed.). Bird vocalizations. Their relation to current problems in biology and psychology. London and New York: Cambridge University Press, pp. 207-232.

_Fanselow M. S. (1981). Naloxone and pavlovian fear conditioning. Learn. Motiv., 12: 398-419.

_Fanselow M. S. (1984). What is conditioned fear? Trends Neurosci., 7: 460-462.

_Fanselow M. S. (1984a). Opiate modulation of the active and inactive component of the postshock reaction: parallels between naloxone pretreatment and shock intensity. Behav. Neurosci., 98: 269-277.

_Fanselow M. S. (1986). Conditioned fear-induced opiate analgesia: A competing motivational state theory of stress analgesia. En: Kelly D. D. (ed.). Stress-Induced Analgesia. Annals of the New York

Acad. Science, 467: 40-54.

_Fanselow M. S. (1987). Effect of naltrexone on learning and performance of conditional fear-induced freezing and opioid analgesia. *Physiol. Behav.*, 39: 501-505.

_Fanselow M. S., Calcagnetti D. J. y Helmstetter F. J. (1988). Delta opioid antagonist, 16-Me Cyprenorphine, selectively attenuates conditional fear- and DPDPE-induced analgesia on the formalin test. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 32: 469-473.

_Fanselow M. S., Kim J. J., Young S. L., Calcagnetti D. J., DeCola J. P., Helmstetter F. J. y Landeira-Fernandez J. (1991). Differential effects of selective opioids peptide antagonists on the acquisition of pavlovian fear conditioning. *Peptides*, 12: 1033-1037.

_Fanselow M. S. y Sigmundi R. A. (1982). The enhancement and reduction of defensive fighting by naloxone pretreatment. *Physiol. Psychol.*, 10: 313-316.

_Fantino E. y Logan C. A. (1979). The experimental analysis of behavior. San Francisco: Freeman.

_Farel P. B. y Thomson R. F. (1976). Habituation of the monosynaptic response in frog spinal cord: Evidence for a presynaptic mechanism. *J. Neurophysiol.* 39, 661-666.

_Feinman R. D., Abramson C. I. y Forman R. R. (1990). Classical conditioning in crustaceans. En: Wiese K., Kren W. D., Tautz J., Reichert H., Mulloney B. (eds.). *Frontiers in crustacean neurobiology*. Birkhauser, Zurich, pp.: 215-222.

_Fingerman M., Hanumante M. M., Kulkarni G. K., Ikeda R. y Vacca L. L. (1985). Localization of substance P-like, leucine-enkephaline-like, methionine-enkephalin-like, γ FMRamide-like immunoreactivity in the eyestalk of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Cell Tissue Res.*, 241: 473-477.

_Fiorito G. (1986). Is there "pain" in invertebrates? *Behavioural Processes*, 12: 383-388.

_Fitzgerald M. (1987). Pain and analgesia in neonates. *Trends Neurosci.*, 10: 344-346.

_Formanowics D. R. Jr. y Brodie E. D. Jr. (1988). Predation risk and forager escape tactics. *Anim. Behav.*, 36: 1836-1860.

_Galizio M., Gore S. y Sanderson P. (1983). Effect of naloxone on acquisition and extinction of jump-up avoidance behavior in rats. *Learn. Motiv.*, 14: 48-57.

_Getting P. A. (1988). Comparative analysis of invertebrate central pattern generators. En: Cohen A. H., Rossignol S. and Grillner S. (eds.). *Neural control of rhythmic movements*. Wiley, New York. pp. 101-127,

_Gibb J. A. (1960). Populations of tits and goldcrests and their food supply in pine plantations. *Ibis*, 102, 163-168.

_Glantz R. M. (1977). Visual input and motor output of command interneurons of the defense reflex pathway in the crayfish. En: Hoyle G. (ed.). *Identified neurons and behavior of arthropods*. New York: Plenum. pp.:259-274.

_Glanzman D. L. y Krasne F. B. (1983). Serotonin and octopamine have opposite modulatory effects on the crayfish's lateral giant escape reaction. *J. Neurosci.*, 3: 2263-2269.

_Glanzman D. L. y Krasne F. B. (1986). 5, 7-Dihydroxytryptamine lesions of crayfish serotonin-containing neurons: Effect on the lateral giant escape reaction. *J. Neurosci.*, 6: 1560-1569.

_Gold P. E. (1986). The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behav. Neural Biol.*, 46: 87-98.

_Groves P. M., Thompson R. F. (1970). Habituation: a dual-process theory. *Psychol. Rev.*, 77: 419-450.

_Groves P. M. y Thompson R. F. (1973). Dual-process theory of habituation: Neural mechanisms. En: Peeke H. V. S. y Herz M. J. (eds.). *Habituation*. (Vol. 2). Physiological substrates. New York: Academic Press. pp.: 175-206.

_Groves P. M., Wilson C. J. y Miller S. W. (1976). Habituation of the acoustic startle response: A neural systems analysis of habituation in the intact animal. En: Riesen A. H. y Thompson R. F. (eds.). *Advances in psychobiology*. (Vol 3). New York: Wiley, pp. 327-379.

_Guilbaud G., Benoist J. M. y Gautron M. (1991). Electrophysiological evidence that morphine can exert an antinociceptive effect in a neuropathic state: a study in the ventrobasal thalamus of rats after moderate ligation of one sciatic nerve. *Brian Res.*, 551: 346-350.

_Hale E. B. y Almquist J. O. (1960). Relaxation of sexual behavior to germ cell output in farm animals. *J. Dairy Sci.*, 43: 145-169.

_Harris J. D. (1943). Habitatory response decrement in the intact organism. *Psychol. Bull.*, 40: 385-422.

_Harris-Warrik R. M., Flamm R. E., Johnson B. R. y Katz P. S. (1989). Modulation of neural circuits in crustacea. *Amer. Zool.*, 29: 1305-1320.

_Hartshorne C. (1956). The monotony threshold in singing birds. *Auk*, 73, 176-192.

_Hassenstein B. (1954). *Über die sehscharfe von superpositionsäugen (versuche an Lismata seticaudata und leander serratus)*. *Pubbl. Stn. Zool. Napoli*, 25: 1-18.

_Hayes R. L., Bennett G. J., Newlon P. y Mayer D. J. (1976). Analgesic effects of certain noxious and stressful manipulations in the rat. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 2: 1350.

_Hayes R. L. y Katayama Y. (1986). Range of environmental stimuli producing nociceptive suppression: implication for neural mechanisms. En: Kelly D. D. (ed.). *Stress-Induced Analgesia*. *Annals of the New York Acad. Science*, 467: 1-13.

_Hermitte G., Maldonado H. (1991). Conditioned Facilitatory modulation of the response to an aversive stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Physiol. Behav.*, 51, 17-25.

_Hiatt R. W. (1948). The biology of the lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes* Randall. *Pacific Science*, 2: 135-213.

_Hilgard E. R. y Marquis D. G. (1940). *Conditioning and learning*. New York: Appleton-Century-Crofts.

_Hinde R. A. (1954). Factors governing the changes in strength of a partially inborn response, as shown by the mobbing behaviour of the Chaffinch *Fringilla coelebs*. I. The nature of response and an examination of its course. *Proc. Roy. Soc. Lond., Series B.*, 142, 306-331.

_Hinde R. A. (1954a). Factors governing the changes in strength of a partially inborn response, as shown by the mobbing behaviour of the Chaffinch *Fringilla coelebs*. II. The waning of the response. *Proc. Roy. Soc. Lond., Series B.*, 142, 331-358.

_Hinde R. A. (1952). The behaviour of the Great Teet *Parus major* and some other related species. *Behaviour, Supplement*, 2, 1-201.

_Hinde R. A. (1970). Behavioural habituation. En Horne G. y Hinde R. A. (eds.). *Short-term changes in neural activity and behaviour*. London y New York: Cambridge University Press, pp. 3-40.

_Horridge G. A. y Sandeman D. C. (1964). Nervous control of optokinetic response in the crab *Carcinus*. *Proc. R. Soc. (B)*, 161: 216-246.

_Humphrey G. (1933). *The nature of learning*. Kegan Paul (ed.). London: Trench, Trubner.

_Immelmann K. (1976). *Einführung in die Verhaltensforschung*. Berlin: Parey.

_Innes D. G. L. y Kavaliers M. (1987). Opiates and deer mouse behavior: differences between island and inland populations. *Can. J. Zool.*, 65: 2504-2512.

_Iversen L. L. (1986). Chemical signalling in the nervous system. *Prog. Brain Res.*, 68: 15-21.

_Izquierdo I. y Dias R. D. (1983). Endogenous state-dependency:

memory regulation by post-training and pre-testing administration of ACTH, B-endorphin, adrenaline and tyramine. *Braz. J. Med. Res.*, 16: 55-64.

_Izquierdo I. y Netto A. (1985). Role of the brain B-endorphin system and hormonal mechanism on the regulation of retrieval at 0, 3, 6 or 24 hs. from training. En: McGaugh J. (ed.). *Contemporary psychology: Biological processes and theoretical issues*. North-Holland: Elsevier Science Publishers B. V. pp.: 95-108.

_Jaros P. P. (1990). Enkephalins, biologically active neuropeptides in invertebrates, with special reference to crustaceans. En: Wiese K., Krenz W. D., Tautz J., Reichert H. y Mulloney B. (eds.). *Frontiers in crustacean neurobiology*. Basel. Boston. Berlin.

_Jaros P. P., Dirksen H, y Keller R. (1985). Occurrence of immunoreactive enkephalins in a neurohemal organ and other nervous structures in the eyestalk of the shore crab, *Carcinus maenas* L. (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res.*, 241: 111-117.

_Kaczmarek L. K. y Levitan I. B. (1987). What is neuromodulation? En: Kaczmarek L. K. y Levitan I. B. (eds.). *Neuromodulation the biochemical control of neural excitability*. Oxford Press, New York. pp: 3-17.

_Kandel E. R. (1978). *A cell-biological approach to learning*. Bethesda, Maryland: Grass Lecture Monograph.

_Kandel E. R. (1979). *Behavioral biology of Aplysia*. San Francisco: Freeman.

_Kandel E. R. (1979a). Microsistemas de neuronas. En: *El cerebro* (cuarta edición). Libros de Investigacion y Ciencia. Barcelona.

_Kandel E. R. y Schwartz J. H. (1981). Molecular biology of learning: Modulation of transmitter release. *Science* 218, 433-443.

_Kavaliers M. (1987). Evidence for opioid and non-opioid form of stress-induced analgesia in the snail *Cepaea nemoralis*. *Brain Res.*, 410: 111-115.

_Kavaliers M. (1988). Novelty-induced opioid analgesia in the terrestrial snail, *Cepaea nemoralis*. *Physiol. Behav.*, 42: 29-32.

_Kavaliers M. (1988a). Evolutionary and Comparative aspects of nociception. *Brain Res. Bull.*, 21: 923-931.

_Kavaliers M. (1989). Evolutionary aspects of the neuromodulation of nociceptive behaviors. *Amer. Zool.*, 29: 1345-1353.

_Kavaliers M. (1989a). Polymorphism in opioid modulation of the thermal response of the land snail *Cepaea nemoralis*. *Can. J. Zool.*, 67: 2721-2724.

_Kavaliers M. (1992). Opioid systems, behavioral thermoregulation and shell polymorphism in the land snail, *Cepaea nemoralis*. *J.*

Comp. Physiol. B, 162: 172-178.

_Kavaliers M. e Innes D. G. L. (1987). Stress-induced opioid analgesia and activity in deer mouse: sex and population differences. Brain Res., 425: 49-56.

_Kavaliers M. y Tepperman F. S. (1988). Exposure to novelty odors induces opioid-mediated analgesia in the land snail *Cepaea nemoralis*. Behav. Neural. Biol., 50: 285-299.

_Kelly D. D. (ed.) (1986). Stress-Induced Analgesia. Annals of the New York Acad. Science, 467: 55-71.

_Kincheck I. B., Watkins L. R. y Mayer D. J. (1984). Fear is not critical to classically conditioned analgesia: The effect of periaqueductal gray lesions and the administration of chlordiazapoxide. Brain Res., 298: 33-44.

_Klopfer P. (1973). Behavioral aspects of ecology. (segunda edición). Englewood Cliffs (ed.). N. J.: Prentice-Hall.

_Konorski J. (1967). Integrative activity of the brain: An interdisciplinary approach. Chicago: University of Chicago Press.

_Korn J. H. y Moyer K. E. (1966). Habituation of the startle response and of heart rate in the rat. Can. J. Psychol., 20: 182-190.

_Krasne F. B. (1972). Learning in crustacea. En: Corning W., Dyal J. y Willows A. D. D. (eds.). Invertebrate learning. (Vol. 2). New York: Plenum. pp: 49-129.

_Krasne F. B. (1976). Invertebrate systems of gaining insight into the nature of learning and memory. En: Rosenzweig M. R. y Bennett (eds.). Neural mechanisms in learning and memory. Cambridge, Mass.: MIT Press, pp.: 401-429.

_Krasne F. B. y Lee S. C. (1988). Response-dedicated trigger neurons as a control point for behavior action: Selective inhibition of lateral giant command neurons during feeding in crayfish. J. Neurosci. 8: 3708-3712.

_Krasne F. B., Vu E. T. y Lee S. C. (1990). The excitability of the crayfish lateral giant escape reaction: Inhibitory control of the lateral giant dendrites. En: Wiese K., Kren W. D., Tautz J., Reichert H., Mulloney B. (eds.). Frontiers in crustacean neurobiology. Birkhauser, Zurich, pp.: 316--323.

_Kravitz E. A. (1988). Hormonal control of behavior: Amines and the biasing of behavioral output in lobsters. Science, 241: 1775-1781.

_Labhart T. y Wiersma C. A. G. (1976). Habituation and inhibition in class a of visual interneurons of the rock lobster, *Panulirus interruptus*. Comp. Biochem. Physiol., 55A: 219-224.

_Lang F., Govind C. K., Costello W. J. y Green S. I. (1977).

Developmental neuroethology: Changes in escape and defensive behavior during growth of the lobster. *Science*, 197: 682-685.

_Leaton R. L. y Supple W. F. Jr. (1986). Cerebellar vermis: essential for long-term habituation of the acoustic startle response. *Science*, 232, 513-515.

_Lehner G. F. J. (1941). A study of the extinction of unconditioned reflexes. *J. Exp. Psychol.*, 29: 435-456.

_Leslie F. M. (1987). Methods used for the study of opioid receptors. *Pharmacol. Rev.*, 39: 197-249.

_Lewis D. J. (1979). Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol. Bull.*, 86: 1054-1083.

_Lorenz K. (1939). Vergleichende verhaltensforschung. *Zoologische Anzeiger*, 12: 69-102.

_Lorenz K. (1950). The comparative method in studying innate behaviour patterns. *Sym. Soc. Exp. Biol.*, 4: 221-268.

_Lorenz K. (1982). *The foundation of Ethology*. New York: Simon y Schster.

_Lothshaw D. P., Levitan P. S. y Fine I. B. (1986). Fine tuning of neuronal electrical activity: Modulation of several ion channels by intracellular messengers in a single identified nerve cell. *J. Exp. Biol.*, 124: 307-322.

_Lozada M., Romano A. y Maldonado H. (1988). Effect of morphine and naloxone on a defensive response of the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 30: 635-640.

_Lozada M., Romano A., Maldonado H. (1990). Long term-habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiol. Behav.*, 47: 35-41.

_Luschen W., Buck F., Willig A. y Jaros P. P. (1991). Isolation, sequence analysis, and physiological properties of enkephalins in the nervous tissue of the shore crab *Carcinus maenas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 8671-8675.

_Maier S. F. (1986). Stressor controlability and stress-induced analgesia. En: Kelly D. D. (ed.). *Stress-Induced Analgesia*. *Annals of the New York Acad. Science*, 467: 55-71.

_Maldonado H. y Miralto A. (1982). Effect of morfine and naloxone on a defensive response of the mantis shrimp, *Squilla mantis*. *J. Comp. Physiol.*, 147: 455-459.

_Maldonado H., Romano A., Lozada M. (1989). Opioid action on response level to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Behav. Neurosci.*, 103: 1139-1143.

_Mancillas J. R., McGinty J. F., Selverston A. I., Karten H. y

Blomm F. E. (1982). *Nature*, 293: 576-578.

_Margules D. L. (1979). Beta-endorphin and endoloxone: Hormones of the autonomic nervous system for the conservation of expenditure of bodily resources and energy in anticipation of famine or feast. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 3: 115-162.

_Marlin N. A. y Miller R. R. (1981). Associations to contextual stimuli as a determinant of long-term habituation. *J. Exp. Psychol.: Anim. Behav. Process*, 7: 313-333.

_Martinez E. A., Vassell D. y Stefano G. B. (1986). Opioid potentiated chromatophorotropin regulation of pigment migration in the land crab *Geocarcinus lateralis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83C: 77-82.

_Martinez E. A., Murray M., Leung M. K. and Stefano G.B. (1988). Evidence for dopaminergic and opioid involvement in the regulation of locomotor activity in the land crab *Geocarcinus lateralis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90C: 89-93.

_Martinez J. L., Jensen R. A. y McGaugh J. L. (1983). Facilitation on memory consolidation. En: Deutsch J. A. (ed.). *The physiological basis of memory*. New York: Academic Press. pp.: 49-70.

_McKay D. C. G. (1942). The pacific edible crab *Cancer magister*. *Fisheries Res. Bd. Can.*, 62: 1-32.

_Merskey D. M. (1983). Classification of chronic pain. *Pain Suppl.*, 3: S217.

_Meyrand P., Simmers J. y Moulins M. (1991). Construction of a pattern-generating circuit with neurons of different networks. *Nature*, 351: 60-63.

_Miller R. C. (1921). The flock behavior of the Coast Bush-Tit. *Condor*, 23: 121-127.

_Morley A. (1953). Field observations on the biology of the Marsh Tit. *British Birds*, 46: 233-238; 273-287; 332-346.

_Morse D. H. (1970). Ecological aspects of some mixed-species foraging flocks of birds. *Ecological monographs*, 40: 119-168.

_Morse D. H. (1980). *Behavioral mechanisms in ecology*. Cambridge, Mass. Harvard University Press.

_Moskowitz A. S., Terman G. W. y Liebeskind J. C. (1985). Stress-induced analgesia in the mouse: strain comparison. *Pain*, 23: 67-72.

_Nailton Y. (1982). Protozoa. En: Shelton G. A. B. (ed.). *Electrical conduction and behaviour in "simple" invertebrates*. Oxford: Clarendon Press, pp: 1-48.

_Nalbach H. O. (1987). *Neuroethologie der Flucht von Krabben (Decapoda: Brachyura)*. Doct. Thesis. University of Tübingen.

_Nalbach H. O. y Nalbach G. (1987a). Distribution of optokinetic sensitivity over the eyes of crabs: its relation to habitat and possible flow-field analysis. *J. Comp. Physiol. A.* 160: 127-135.

_Nalbach H. O. (1990). Visually elicited escape in crabs. En: Wiese K., Kren W. D., Tautz J., Reichert H., Mulloney B. (eds.). *Frontiers in crustacean neurobiology*. Birkhauser, Zurich, pp.: 165-173.

_Nalbach H. O. (1990a). Discontinuous turning reaction during escape in soldier crabs. *J. Exp. Biol.*, 148: 483-487.

_Neil D. M. (1982). Compensatory eye movements. En: Sandeman D. C. y Atwood H. L. (eds). *The biology of crustacea*. (Vol. 4). Neural integration and behavior. New York: Academic Press, pp.: 133-163.

_Nicol J. A. C. (1950). Response of *Branchioma vesiculosum* (Montagu) to photic stimulation. *J. Marine Biol. Assoc. U. K.*, 29: 303-320.

_Nishimoto R. T. y Herrnkind W. (1978). Directional orientation in blue crabs, *Callinectes sapidus* Rathbun: Escape responses and influence of wave direction. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 33: 93-112.

_Oliverio A., Castellano C. y Puglisi-Allegra S. (1983). Psychopharmacogenetics of opioids. *Trends Pharmacol. Sci.*, 4: 350-353.

_Olivier S. R., Escofet A., Penchaszadeh P. y Orensanz J. M. (1969). Estudios ecologicos de la region estuarial de Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina). I. Las comunidades bentonicas. *Anales Soc. Cientif. Argentina*, 193: 237-262.

_Olivier S. R., Escofet A., Penchaszadeh P. y Orensanz J. M. (1969). Estudios ecologicos de la region estuarial de Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina). II. Relaciones troficas interespecificas. *Anales Soc. Cientif. Argentina*, 194: 89-104.

_Panocaka I., Marek P. y Sadowski B. (1986). Inheritance of stress-induced analgesia in mice: selective breeding study. *Brian Res.*, 397: 152-155.

_Peeke H. V. S. (1984). Habituation and maintenance of territorial boundaries. En: Peeke H. V. S. y Petrinovich L. (eds.). *Habituation, sensitization, and behavior*. New York: Academic Press, pp. 393-421.

_Peeke H. D. S. y Veno A. (1973). Stimulus specificity of habituated aggression in the stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Behav. Biol.*, 8: 427-432.

_Peeke H. V. S. y Veno A. (1976). Response independent habituation of territorial aggression in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Zeitschrift fur Tierpsychologie*, 40, 53-54.

_Petrinovich L. (1973). A species-meaningful analysis of habituation. En: Peeke H. V. S. y Herz M. J. (eds.). Habituation (Vol. 1) New York: Academic Press.

_Petrinovich L. (1984). A two-factor dual-process theory of habituation and sensitization. En: Peeke H. V. S. y Petrinovich L. (eds.). Habituation, sensitization, and behavior. New York: Academic Press, pp. 17-55.

_Petrinovich L. y Patterson T. L. (1981). Field studies of habituation. IV. Sensitization as a function of the distribution and novelty of song playback to White-crowned Sparrows. J. Comp. Physiol. Psychol., 95: 805-812.

_Petrinovich L. y Widaman K. F. (1984). An evaluation of statistical strategies to analyze repeated-measures data. En: Peeke H. V. S. y Petrinovich L. (eds.). Habituation, sensitization, and behavior. New York: Academic Press, pp. 155-201.

_Popper K. R. y Eccles J. C. (1985). El yo y su cerebro. Editorial Labor S. A. Barcelona.

_Quackenbush L. S. y Fingerman M. (1984). Regulation of neurohormone release in the fiddler crab, *Uca pugilator*: Effect of gamma-aminobutyric acid, octopamine, met-enkephalin, and beta-endorphin. Comp. Biochem. Physiol., 79C: 77-84.

_Rescorla R. A. (1988). Behavioral studies of pavlovian conditioning. Ann. Rev. Neurosci., 1: 329-352.

_Rescorla R. A. y LoLordo V. M. (1965). Inhibition of avoidance behavior. J. Comp. Physiol. Psychol., 59: 406-412.

_Riccio D. C. y Concannon J. T. (1981). ACTH and the reminder phenomenon. En: Martinez J. L. Jr., Jensen R. A., Messing R. B., Rigter H. y McGaugh J. L. (eds.). Endogenous peptides and learning and memory processes. New York: Academic Press. pp.: 117-142.

_Richards R. A. (1992). Habitat selection a predator avoidance: ontogenic shifts in habitat use by the Jonah crab *Cancer borealis* (Stimpson). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 156: 187-197.

_Rodríguez E. M. y Amin O. A. (1993). Acute toxicity of Paration and 2,4-D to larval and juvenil stages of *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura). Arch. Envir. Contam. Toxicol., 22: 140-145.

_Rodríguez E. M. y Lombardo M. J. (1991). Acute toxicity of parathion and 2,4-D to estuarine adult crab. Bull. Envir. Contam. Toxicol., 46: 576-582.

_Romano A., Lozada M., Maldonado H. (1990). Effect of naloxone pretreatment on habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. Behav. Neural Biol., 53: 113-122.

_Romano A., Lozada M., Maldonado H. (1991). Non habituation

processes affect stimulus specificity on the response habituation in the crab *Chasmagnathus*. Behav. Neurosci., 105: 542-552.

_Romano A. (1991). Funcion de los opiáceos en el comportamiento defensivo del cangrejo *Chasmagnathus granulatus*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.

_Rosecrans J. A. y Chance W. T. (1976). Emotionality induced antinociception. Soc. Neurosci. Abstr., 2: 919.

_Rossi J. B. (1982). Aspectos hidrobiológicos del arroyo San Clemente (bahía Samborombón). Revista del Museo de La Plata. Zoología, 132: 29-38.

_Rothe H., Luschen W, Asken A., Willing A. y Jaros P. P. (1991). Purified crustacean enkephalin inhibits release of hyperglycemic hormone in the crab *Carcinus maenas* L. Comp. Biochem. Physiol., 99C: 57-62.

_Russel E. M. (1967). Changes in the behavior of *Lebistes reticulatus* upon a repeated shadow stimulus. Animal behavior, 15: 574-585.

_Russel R. W. (1951). The comparative study of behavior. An inaugural lecture delivered at University College London, 7 may 1951. Published for the College by Lewis H. K. London.

_Sandeman D. C. (1977). Compensatory eye movements in crabs. En: Hoyle G. (ed.). Identified neurons and behaviour of arthropods. New York: Plenum Press. pp.: 131-147.

_Sandeman D. C. (1990). Structural and functional levels in the organization of decapod crustacean brains. En: Wiese K., Kren W. D., Tautz J., Reichert H., Mulloney B. (eds.). Frontiers in crustacean neurobiology. Birkhauser, Zurich, pp.: 223-239.

_Santos E. A., Nery L. E. M. y Manzoni G. C. (1988). Action of the crustacean hyperglycemic hormone of *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (Decapoda: Grapsidae). Comp. Biochem. Physiol., 89A: 329-332.

_Santos E. A. y Stefanello T. M. (1991). The hemolymph of *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) as a target tissue of the crustacean hyperglycemic hormone. Brazilian J. Med. Biol. Res., 24: 267-270.

_Scarratt A. M. y Godin J-G. J. (1992). Foraging and antipredator decisions in the hermit crab *Pagurus acadianus* (Benedict). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 156: 225-238.

_Schleidt W. M. (1961). Reaktionen von Truthühnern auf fliegende raubvogel und versuche zur analyse ihrer AAM's. Zeitschrift für Tierpsychologie, 18, 534-560.

_Shalter M. D. (1975). Lack of spatial generalization in habituation test of fowl. J. Comp. Physiol. Psychol., 89: 258-262.

_Shalter M. D. (1984). Predator-prey behavior and habituation. En: Peeke H. V. S. y Petrinovich L. (eds.). Habituation, sensitization, and behavior. New York: Academic Press, pp. 349-391.

_Sharpless S. y Jasper H. (1956). Habituation of the arousal reaction. *Brain*, 79, 655-680.

_Shelton G. A. B. (1982). Anthozoa. En: Shelton G. A. B. (ed.). Electrical conduction and behaviour in "simple" invertebrates. Oxford: Clarendon, pp.203-242.

_Sherrington C. (1906). The integrative action of the nervous system. Segunda edición (1947), New Haven. Conn.: Yale University Press.

_Sigmundi R. A., Bouton M. E. y Bolles R. C. (1980). *Bull. Psychonomic Soc.*, 15: 254-256.

_Sokolov E. N. (1963). Perception and conditioned reflex. Oxford: Pergamon.

_Thompson R. F., Groves P. M., Teyler T. J. y Roemer R. H. (1973). A dual-process theory of habituation: Theory and behavior. En: Peeke H. V. S. y Herz M. J. (eds.). Habituation (Vol. 1). New York: Academic Press., pp. 239-271.

_Thompson R. F., Spencer W. A. (1966). Habituation: a model phenomenon for study of neural substrates of behavior. *Psychol. Rev.*, 173: 16-43.

_Thorpe W. H. (1956). Learning and instinct in animals. Cambridge, Mass.: Harvard University Press.

_Thorpe W. H. (1963). Learning and instinct in animals. (segunda edición). London: Methuen.

_Timbergen N. (1951). The study of instinct. Oxford: Clarendon.

_Tinbergen N. (1965). Animal behavior. New York: Time.

_Treisman M. (1984). A theory of the mechanism of habituation: The assignment of responses to stimuli. En: Peeke H. V. S. y Petrinovich L. (eds.). Habituation, sensitization, and behavior. New York: Academic Press, pp. 57-101.

_Valeggia C., Fernandez Duque E., Maldonado H. (1989). Danger stimulus-induced analgesia in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Brain Res.*, 481: 304-308.

_Varju D. y Sandeman D. C. (1989). Tactile learning in a new habitat and spatial memory in the crayfish *Cherax destructor*. En: Elsner n. y Singer W. (eds.). Dynamics and plasticity in neural Systems. Stuttgart: Thieme. pp.: 21.

_Von Buddenbrock W. y Friedrich H. (1933). Neue beobachtung uber die kompensatorischen augenbewegung und der farbenninn der taschenkraben *Carcinus maenas*. *Z. Vergl. Physiol.*, 19: 747-761.

_Wagner A. R. (1976). Priming in STM: An information-processing mechanism for self-generated or retrieval-generated depression of performance. En: Tighe T. J. y Leaton R. M. (eds.). *Habituation: Perspectives from child development, animal behavior and neurophysiology*. Hillsdale, N. J.: Lawrence Erlbaum Associates. pp. 95-128.

_Wagner A. R. (1978). Expentacies and the priming of STM. En: Hulse S. H., Fowler H. y Honig W. K. (eds.). *Cognitive processes in animal behavior*. Hillsdale: Erlbaum N. J.

_Wagner A. R. (1979). Habituation and memory. En: Dickinson A. y Boakes R. (eds.). *Mechanisms of learning and motivation*. Hillsdale: Erlbaum N. J.

_Wagner A. R. (1981). SOP: A model of automatic memory processing in animal behavior. En: Spear N. E. y Miller R. R. (eds.). *Information processing in animals: Memory mechanisms*. Hillsdale, N. J.: Lawrence Erlbaum Associates. pp. 5-47.

_Warren P. H. e Ison J. R. (1982). Selective action of morphine on reflex expression to nociceptive stimulation in the rat: Contribution to the assessment of analgesia. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 16: 869-875.

_Waterman T. H. y Wiersma C. A. G. (1963). Electrical responses in decapod crustacean visual systems. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 61: 1-16.

_Waterman T. H., Wiersma C. A. G. y Bush B. M. H. (1964). Afferent visual responses in the optic nerve of the crab, *Podophthalmus*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 63: 153-155.

_Watkins L. R., Cobelli D. A. y Mayer D. H. (1982). Classical conditioning of front paw and hind paw footshock induced analgesia (FSIA): Naloxone reversibility and descending pathways. *Brian Res.*, 243: 119-132.

_Werner E. E. y Gilliam J. F. (1984). The ontogenic niche and species interaction in size-structured populations. *Annu. Rev. Ecol. Sist.*, 15: 393-425.

_Whitlow J. W. Jr. y Wagner A. R. (1984). Memory and habituation. En: Peeke H. V. S. y Petrinovich L. (eds.). *Habituation, sensitization, and behavior*. New York: Academic Press, pp. 104-153.

_Wiersma C. A. G. y Yamaguchi T. (1966). The neuronal components of the optic nerve of the crayfish as studied by Single unit analysis. *J. Comp. Neur.*, 128: 333-358.

_Wiersma C. A. G. y Yamaguchi T. (1967). Integration of visual stimuli by the crayfish central nervous system. *J. Exp. Biol.*, 47: 409-431.

_Wiersma C. A. G. y Yamaguchi T. (1967a). The integration of visual

stimuli in the rock lobster. *Vision Res.*, 7: 197-204.

_Wiersma C. A. G. y York B. (1972). Properties of the seeing fibers in the rock lobster: field structure, habituation, attention and distraction. *Vision Res.*, 12: 627-640.

_Wine J. J. y Krasne F. B. (1982). The cellular organization of crayfish escape behavior. En: Sandeman D. C. y Atwood H. L. (eds.). *The biology of crustacea. Neural integration and behavior.* New York: Academic Press. pp.:241-292.

_Woodbury P. B. (1986). The geometry of predator avoidance by the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Anim. Behav.*, 34: 28-37.

_Zavala N. A. y Gómez M. A. (1991). Morphine analgesia, tolerance and addiction in the cricket *Pteronemobius* sp. (Orthoptera, Insecta). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 40: 887-891.

_Zeil J., Nalbach G. y Nalbach H. O. (1986). Eyes, eyes stalks and the visual World of semiterrestrial crabs. *J. Comp. Physiol.*, 159: 801-811.

_Zimmerman M. (1986). Behavioural investigations of pain in animals. En: Duncan I. J. H. y Molony V. (eds.). *Assessing pain in farm animals.* Luxembourg: Commission of the European Communities, pp.: 30-35.