Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Función de los opiáceos en el comportamiento defensivo del cangrejo Chasmagnathus Granulatus

Romano, Arturo Gabriel

1991

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:
Romano, Arturo Gabriel. (1991). Función de los opiáceos en el comportamiento defensivo del cangrejo Chasmagnathus Granulatus. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2397_Romano.pdf

Cita tipo Chicago:
Romano, Arturo Gabriel. "Función de los opiáceos en el comportamiento defensivo del cangrejo Chasmagnathus Granulatus". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2397_Romano.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

FUNCION DE LOS OPIACEOS EN EL COMPORTAMIENTO DEFENSIVO DEL CANGREJO *Chasmagnathus granulatus*

Autor: ARTURO GABRIEL ROMANO

Director: Dr. HECTOR MALDONADO

LABORATORIO DE FISIOLOGIA DEL COMPORTAMIENTO ANIMAL

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

1991

Tesis.
2397.
y.2.

RESUMEN

La morfina produjo una inhibición dósis dependiente de la respuesta defensiva de *despliegue lateral del merus*, provocada por un estímulo eléctrico en la superficie dorsal del cefalotórax. El antagonista opiáceo naloxono revirtió dicha inhibición, sugiriendo que están involucrados receptores opiáceos. La potencia de la morfina resultó similar a la observada en vertebrados, pero el tiempo de máxima acción y de vida media resultaron mucho menores. La morfina inhibió también la respuesta de escape provocada por un estímulo de peligro, la presentación de una figura pasante. Dicha inhibición resultó dósis dependiente y naloxono reversible. Un pretratamiento con naloxono redujo la caída de la respuesta de escape producida por una sesión de habituación a la figura pasante, mientras que un pretratamiento con morfina produjo un corrimiento paralelo de la curva hacia niveles menores de respuesta. Estos resultados apoyan la hipótesis de una acción opiácea durante dicho proceso que contribuye al decremento de la respuesta. Conjuntamente con el proceso de habituación de corto término se produciría un proceso contingente que, a diferencia del anterior, tendría efectos post-entrenamiento de poca persistencia y estímulo-inespecíficos. La presentación repetida de una figura pasante o un estímulo eléctrico en los apéndices locomotores provocó un efecto contingente decremental del nivel de respuesta. La estimulación iteractiva con una figura que se desplaza hacia el animal provocó, en cambio, un efecto contingente incremental. El proceso contingente decremental fue revertido por el pretratamiento con naloxono, mientras que la administracion post-entrenamiento no produjo efecto, sugiriendo que el opiáceo endógeno involucrado actúa por activación secundaria.

Dedico esta tesis a

Lili, mi compañera
Esther, Horacio y César
Marian, por la amistad y el trabajo compartidos
Agha y los Amigos

Agradecimientos

a Héctor Maldonado, por haberme iniciado en la investigación

a mis compañeros de trabajo

Angel Vidal por su fundamental ayuda y asistencia técnica. Beatriz Dimant, Ana Rakitin, Alicia Denti, Daniel Tomsic y Gabriela Hermitte por sus consejos y ayuda en la elaboración del manuscrito.

y por la amistad de estos años.

a mi consejero de Tésis, Dr. Josué Núñez.

INDICE.

INTRODUCCION GENERAL

Causas próximas y últimas del comportamiento 2
Aprendizaje en crustáceos 3
Habituación 4
Los opiáceos 6
Papel fisiológico y comportamental de los opiáceos 11
Acción antinociceptiva 12
Autoanalgesia 13
Comportamiento defensivo y opiáceos 17
Objetivos de la Tésis 21

CAPITULO 1
SENSIBILIDAD OPIACEA EN EL CANGREJO *Chasmagnathus granulatus*
Efecto de la morfina y el naloxono sobre una respuesta defensiva ante un estímulo nociceptivo.

INTRODUCCION 25
MATERIALES Y METODOS
Animales 26
Procedimiento y dispositivo experimental 26
Ensayo y respuesta defensiva 28
Sensibilidad nociceptiva básica y porcentaje de inhibición de la respuesta 29
RESULTADOS Y DISCUSION
Efecto de la intensidad del estímulo sobre la SNB 29
Variación de la SNB segun la época del año y el intervalo inyección-choque 31
Efecto de la morfina sobre la SNB 32
Efecto del naloxono 34
Duración de la inhibición de la respuesta inducida por la morfina 36
CONCLUSION 40

CAPITULO 2
ACCION OPIACEA SOBRE LA RESPUESTA A UN ESTIMULO DE PELIGRO
Efecto de la morfina y el naloxono sobre la respuesta de escape

INTRODUCCION 42
MATERIALES Y METODOS
Dispositivo experimental 43
Procedimiento y diseño experimental 45
RESULTADOS Y DISCUSION
Experimento 1 47
Experimento 2 48
CONCLUSION 52

CAPITULO 3
ACCION OPIACEA SOBRE LA RESPUESTA A UN ESTIMULO DE PELIGRO REITERADO. Efecto del pretratamiento con naloxono y morfina sobre la habituación de corto término a un estímulo de peligro.

INTRODUCCION 54
MATERIALES Y METODOS
Procedimiento 55
RESULTADOS Y CONCLUSIONES
Experimento 1. Efecto del naloxono sobre una sesión de habituación de 15 ensayos. 55
Experimento 2. Efecto del naloxono sobre una sesión de habituación de 30 ensayos. 59
Experimento 3. Efecto de la morfina sobre una sesión de habituación de 15 ensayos 62
CONCLUSION 64

CAPITULO 4
PROCESOS CONTINGENTES A LA HABITUACION DE CORTO TERMINO Y SUS EFECTOS INESPECIFICOS.

INTRODUCCION 66
MATERIALES Y METODOS
Dispositivo experimental 68

Procedimiento 68
Experimento 1 70
Experimento 2 73
Experimento 3a 76
Experimento 3b 78
Experimento 3c 80
Experimento 3d 80
Experimento 4 84
Resultados y discusión 86
CONCLUSION 89

CAPITULO 5
PAPEL DE UNA ACCION OPIACEA EN EL PROCESO CONTINGENTE DE EFECTO DECREMENTAL.

INTRODUCCION 91
Experimento 1 92
Experimento 2 94
CONCLUSION 97

CONCLUSIONES Y DISCUSION GENERAL 99

BIBLIOGRAFIA 107

INTRODUCCION GENERAL

Causas próximas y últimas del comportamiento.

Las explicaciones biológicas sobre la causación del comportamiento pueden ser hechas en términos de causas próximas o de causas últimas. El estudio de las causas próximas indaga sobre las motivaciones internas y estados fisiológicos inducidos por estímulos exógenos o endógenos, eventos ecológicos o factores sociales; es decir, intenta explicar el comportamiento en términos de mecanismos mediadores o procesos que influyen inmediatamente sobre las actividades del organismo. El estudio de las causas últimas, en cambio, intenta explicar cómo los comportamientos fueron adquiridos a través de la selección natural, en la historia evolutiva de la especie, haciendo especial hincapié en el valor adaptativo del comportamiento. Puede decirse, usando palabas de Peeke y Petrinovich (1984), que las causas próximas se relacionan con las funciones y partes de un organismo considerado desde el nivel morfológico funcional hasta el nivel molecular; mientras que las causas últimas con las razones históricas que explican por que un organismo es como es.

Los dos niveles de explicación requieren métodos diferentes de estudio. Para dilucidar las causas próximas, el experimento constituye el método de elección, con el propósito de aislar el fenómeno de las complejidades del organismo. A este nivel, el trabajo del biólogo es similar al de un químico o de un físico. Para entender las causas últimas, el método comparativo es el principalmente utilizado, lo que implica estudios descriptivos, detallados y cuidadosos, que incluyan el

examen de similitudes y diferencias del comportamiento en una misma especie o en diferentes especies, en habitats similares o diferentes.

Los trabajos presentados en esta tesis se centraron en el estudio de las causas próximas del comportamiento defensivo del cangrejo *Chasmagnathus granulatus* así como en los cambios en ese comportamiento debidos a la presentación reiterada de un estímulo de peligro.

Aprendizaje en crustáceos.

El primer intento para comprobar la existencia de aprendizaje en crustáceos fue llevado a cabo por A. von Bethe en 1898 experimentando con el cangrejo *Carcinus*, pero obtuvo resultados negativos. Sin embargo, pocos años despues, en 1903, Yerkes y Huggins demostraron claramente que el cangrejo de río *Cambarus* era capaz de resolver un laberinto en "Y", y retener lo aprendido durante varios días. A partir de entonces, la capacidad de aprendizaje en este grupo ha sido demostrada reiteradamente (Taylor, 1971; Abramson, et al., 1988; Abramson y Feinman, 1990; etc.). Teniendo en cuenta dicha capacidad de aprendizaje, los Crustáceos proveen un excelente material de investigación para determinar los aspectos básicos y esenciales del comportamiento, que pueden luego ser comparados con los de organismos que poseen una estructura más compleja.

El desarrollo evolutivo de apéndices complejos ha llevado, en algunos grupos, a un mayor desarrollo y concentración del sistema nervioso, lo que trajo aparejado el aumento en la capacidad sensoriomotora que implica una mayor percepción y manejo del

ambiente. Esto último se ha dado en animales predadores o saprófitos activos como los estomatópodos y cangrejos. El sistema nervioso de los crustáceos evolucionó hacia una concentración progresiva que finalmente constituyó un gran ganglio torácico y otro supraesofágico o ganglio cerebral que reciben la información sensorial y propioceptiva.

Habituación.

Una característica importante de la adaptación de un organismo a su ambiente es dejar de responder a un gran número de estímulos que no afectan a su supervivencia. Los animales pueden lograr esto a través del proceso de habituación. La habituación clásicamente se define como un decremento en la respuesta debido a la presentación reiterada del estímulo que la desencadena, que no puede ser explicada solamente en términos de adaptación sensorial o fatiga motora (Thompson y Spencer, 1966). Es tal vez la forma de plasticidad comportamental más elemental y ubicua. Fue encontrada en organismos tan simples como el protozoo *Stentor* y tan complejos como el hombre. Un estudio adecuado de este fenómeno puede dar las bases para entender el aprendizaje y otras formas más complejas de comportamiento.

Las bases fisiológicas de la habituación pueden no ser necesariamente las mismas en diferentes organismos, ya que presiones de selección similares pueden conducir a convergencias comportamentales a través de distintos mecanismos. Sin embargo, la existencia de muchas características similares en diferentes especies hace sospechar que pueden estar involucrados principios fisiológicos

semejantes (Treisman, 1984). En efecto, la habituación ha sido estudiada en distintos modelos experimentales, tanto en vertebrados (por ejemplo, la respuesta de flexión de la pata en el "gato espinal", Thompson y Spencer, 1966; la respuesta de sobresalto inducida por un sonido en ratas, Davis, 1972), como en invertebrados (por ejemplo, el reflejo de retracción de la branquia en *Aplisia*, Carew, Pisker y Kandel, 1972; el reflejo de flexión abdominal o "tail-flick" en un camarón de agua dulce, Krasne, 1969) observándose gran constancia en las condiciones paramétricas del proceso, tan es así que Thompson y Spencer (1966) enunciaron nueve criterios para definir habituación mas allá de las diferencias interespecíficas. Sin embargo, hay un criterio que por su importancia definitoria podría ser considerado como el caracter diagnóstico de la habituación: la **estímulo-especificidad**. La disminución de la magnitud de la respuesta a un estímulo que se repite, no debe generalizarse totalmente a estímulos diferentes al inicial, para poder afirmar que se trata de un **proceso de habituación** y no un efecto de fatiga motora, adaptación sensorial o daño causado por la estimulación repetida.

En los estudios de habituación se distingue la habituación a corto plazo (habituación de corto término) de la habituación a largo plazo (habituación de largo término), refiriéndose en el primer caso a la persistencia de la respuesta habituada durante la sesión de entrenamiento o corto tiempo después, y, en el segundo, a la persistencia cuando se la testea luego de un largo período después del entrenamiento. Se ha sugerido que los mecanismos que median la habituación de corto y la largo término son distintos (Hinde, 1970; Davis, 1970, etc.) y que en el caso de los vertebrados implicarían

loci diferentes del sistema nervioso (Leaton y Supple, 1986; Lopiano, Sperati y Montarolo, 1990).

Los opiáceos.

Los opiáceos son conocidos desde hace cientos de años en humanos y otras especies animales por su potente efecto euforizante y analgésico. La morfina es el principal agente activo del opio, muy usado en tratamientos médicos puesto que junto con otros compuestos relacionados es la droga analgésica más efectiva en casos de dolores severos.

Hasta hace algunos años solo se conocían opiáceos de origen vegetal, pero su notable efecto sobre el sistema nervioso hizo suponer la existencia de *opiáceos endógenos* y *receptores específicos* en tejidos animales (Martin, 1967).

La *teoría de los receptores*, propuesta a fines del siglo pasado, postulaba que para que las drogas ejerzan una acción biológica deben unirse a sustancias receptoras. Esta teoría resultó luego ampliada con la *teoría ocupacional* que vino a incorporar cuatro postulados: a) las moléculas libres de la sustancia activa se unen con receptores libres para formar un complejo responsable del efecto, b) a nivel de cualquier receptor la sustancia activa provoca una respuesta de "todo o nada", c) la intensidad del efecto producido es directamente proporcional al porcentaje de receptores ocupados, d) la ocupación de un receptor no afecta a otros receptores. Esta teoría no explica por qué ciertas drogas que se fijan al receptor no producen efecto alguno, ni por qué distintas drogas que se unen al mismo receptor producen distinta intensidad del efecto. Y es así que

surgió el concepto de *afinidad* y el de *actividad intrínseca* o *eficacia* de una sustancia sobre su receptor. Dichos conceptos permiten clasificar a estas sustancias en agonistas, agonistas parciales y antagonistas. Cuando el efecto producido por un agonista es revertido por la administración de un antagonista se tiene la evidencia de que ambos actuan sobre un receptor y que lo hacen de una manera competitiva (el antagonista compite con el agonista por los sitios activos del receptor).

El criterio generalmente aceptado para definir una *acción opiácea* y por lo tanto para clasificar a una sustancia como *opiácea*, es de tipo operacional: accion opiácea es aquella que puede ser revertida por el antagonista naloxono (Leslie, 1987).

Un *receptor opiáceo* es definido entonces, como una entidad que reconoce y une drogas opiáceas desencadenando así una serie de fenomenos bioquímicos y fisiológicos (Miller y Cuatrecasas, 1978). En 1973, tres laboratorios simultáneamente demostraron la existencia de los receptores opiáceos que se postulaban (Terenius, 1973; Pert y Snyder, 1973a,b;Simon et al., 1973). Se comprobó la unión específica y saturable de agonistas y antagonistas marcados en membranas sinápticas de tejido cerebral, con estereoespecificidad (los isómeros D de estas sustancias no producen efecto), demostrándose asimismo que ciertas modificaciones estructurales transformaban dichas moléculas en agonistas parciales o en antagonistas. Posteriormente se comprobó que extractos de cerebro presentaban actividad opioide tanto en bioensayos como en estudios de unión a receptores y que dicha actividad era revertida por el antagonista naloxono. (Hughes, 1975; Hughes et al., 1975a; Pasternak et al., 1975; Terenius y Wahlstrom, 1975). También se encontró actividad opiácea de estos extractos en

ensayos *in vivo* (Pert et al., 1977). Los primeros estudios sobre este factor opiáceo demostraron que se trataba de un péptido y que se encontraba en la fracción sinaptosomal.

En los años posteriores se fueron dilucidando las estructuras y los orígenes biosintéticos de todos los péptidos opiáceos conocidos. Se ha establecido entonces, en mamíferos, la existencia de tres familias a partir de los siguientes precursores:

1) Proencefalina: contiene en su estructura siete peptidos opiáceos, todos con una estructura común activa de 5 aminoácidos denominada [Met]-Encefalina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, ó [Leu]-Encefalina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu.

2) Proopiomelanocortina: precursor de la *beta*-endorfina junto con la hormona ACTH. La *beta*-endorfina es un péptido de 31 aminoácidos cuyos cinco primeros aminoácidos presentan la misma secuencia que la [Met]-Encefalina.

3) Prodinorfina: produce *alfa*-/*beta*-neo-endorfina, dinorfina A y dinorfina B, cuyos cinco primeros aminoácidos presentan la misma secuencia que la [Leu]-Encefalina.

Existen varios tipos de receptores opiáceos, si bien se han clasificado tres tipos principales: *mu* (receptor al cual se une la morfina), *delta* y *kapa*. La *beta*-endorfina presenta gran afinidad por los receptores *delta* y *mu* (Leslie, 1987). La familia de la proencefalina muestra un rango de afinidad que va desde la [Leu]-Encefalina, que es principalmente afín a *delta*, hasta la encefalina octapéptido que es afín tanto a *mu* como a *delta*. La familia de la prodinorfina tambien presenta un rango de actividad para los receptores *kapa*, *delta* y *mu*.

La existencia de varios receptores y de una gama de afinidad por los mismos tendría una implicancia fisiológica: podrían liberarse muchos opiáceos simultáneamente uniéndose a distintos receptores, y puesto que puede ser variable la cantidad de neurotransmisor presente en distintos lugares, solo habría unión con los receptores de mayor afinidad en aquellos *loci* donde existe poca cantidad de neurotransmisor (Akil et al., 1984). Existen también diferencias en la distribución de receptores tanto entre especies como entre distintos tejidos de un mismo organismo.

Se han realizado muchos trabajos en mamíferos sobre la distribución de estos péptidos en el sistema nervioso y en otros tejidos. El principal sitio de producción de *beta*-endorfina está en la hipófisis, tanto en el lóbulo anterior como en el lóbulo intermedio. En el cerebro hay dos grupos de células que la producen, en el hipotálamo medio basal y en el núcleo comisural. Las encefalinas se producen en la médula adrenal, el tracto gastrointestinal y en muchas áreas del sistema nervioso central, desde la médula hasta el cortex. Las neo-endorfinas y dinorfinas se producen en la hipófisis posterior, en el tubo digestivo, en el hipotálamo y en otras áreas cerebrales.

Recientemente se ha podido establecer que los opiáceos tienen una distribución filogenética mucho más amplia de lo que se suponía anteriormente. Han sido detectados péptidos opiáceos a través de técnicas inmunohistoquímicas en distintas especies de invertebrados que incluyen a varios *phyla* como artrópodos (en insectos y crustáceos), moluscos, anélidos y platelmintos (Davenport y Evans, 1986; El-Salhy et al., 1980; Hansen et al., 1982; Pages et al., 1983; Remy y Dubois, 1981; Stefano y Schmarrer, 1981; Verhaert y De Loof, 1985; Gesser y Larsson, 1986; Gustafsson et al., 1986; Leung y

Stefano, 1984; Andersen et al., 1986; Marino et al., 1985; Leung y Stefano, 1987;).

Se demostró también que agonistas y antagonistas opiáceos se unen con alta afinidad y estereoespecíficamente a sitios (receptores) en membranas del ganglio pedal del molusco *Mytilus edulis* (Kream et al., 1980) y del cerebro de *Drosophila melanogaster* (Pert y Taylor, 1979).

Sin embargo, dichas técnicas no aseguran que los opiáceos endógenos de los invertebrados sean exactamente los mismos péptidos hallados en vertebrados. Para determinarlo es necesario conocer su secuencia de aminoácidos. Esta identificación sólo ha sido realizada, en invertebrados, en un limitado número de especies de moluscos, en donde se ha encontrado que las encefalinas extraídas de estos animales son las mismas que en mamíferos (Leung y Stefano, 1984; Leung y Stefano, 1987). De todos modos es difícil encontrar exactamente las mismas moléculas en especies distintas, e incluso puede haber diferencias dentro de una misma especie (Kavaliers, 1988).

Greenberg y Price (1983) en una revisión sobre neuropéptidos en invertebrados clasificaron a los mismos en "nativos" y "naturalizados". Los neuropéptidos "naturalizados" son aquéllos que primeramente fueron encontrados y estudiados en vertebrados (tales como todos los opiáceos conocidos) y luego han sido también detectados y/o identificados en invertebrados por los métodos antes mencionados. Los "nativos", en cambio, son péptidos que fueron hallados en invertebrados y cuya función fue estudiada en estos organismos. La presencia de opiáceos "naturalizados" que posean accion biológica en invertebrados es aun discutida. En crustáceos no se han podido detectar dichos péptidos, mientran que en el camarón

Squilla mantis existen evidencias de un opiáceo "nativo"; es decir con función opiácea como la descripta para otros neuropéptidos de vertebrados pero estructuralmente diferentes (Marino, Palmisano, Di Marzo, Melck y Miralto, 1985; Palmisano, Marino, Di Marzo, Morris, Howlett y Tomlin, 1986).

Papel fisiológico y comportamental de los opiáceos.

Existe una variedad de fenómenos fisiológicos en los cuales están involucrados los péptidos opiáceos, sobre todo en aquellos relacionados con los estados de estrés.

Durante situaciones estresantes que aumentan la frecuencia y el volumen respiratorio, es posible que tengan una acción inhibitoria sobre la respiración. (Olson et al., 1983). También se conocen efectos de regulación sobre el sistema cardiovascular y sobre la liberación de insulina.

Los péptidos opiáceos están involucrados en la regulación fisiológica de la ingesta de alimentos (Morley et al., 1983; Morley et al., 1985). Varios estudios han demostrado que la administración de agonistas que tienen acción sobre los receptores *delta, mu* y *kapa* incrementan la ingesta de alimentos. La morfina (agonista de receptores *mu*) tiene efectos estimulatorios sobre la ingesta de sólidos y líquidos en ratones de laboratorio (*Mus musculus*). Estos efectos pueden ser bloquedos por el naloxono (Teskey et al., 1984). Resultados similares se obtubieron con la dinorfina (agonista de receptores *kapa*) en roedores y humanos (Kavaliers et al., 1985;

Morley et al., 1983, 1984, 1985). Se ha hallado también que estos agonistas tienen influencia sobre las actividades de alimentación en condiciones naturales, en roedores (Billington et al., 1984; Morley et al., 1983, 1984; Kavaliers y Hirst, 1985), como así también en invertebrados (Kavaliers et al., 1985). Los mecanismos ligados al receptor *mu* están relacionados con la iniciación de la búsqueda y recolección de alimentos, mientras que los agonistas *kappa* directamente estimulan la ingesta.

Accion antinociceptiva.

La característica más reconocida y estudiada de los opiáceos es su papel como antinociceptivos. La nocicepción fue definida como un tipo de percepción que permite a los animales detectar estímulos que pueden comprometer su integridad y reaccionar ante ellos (Sherrington, 1906). Esta capacidad implica la presencia de receptores sensoriales, denominados nociceptores, que permiten determinar la naturaleza nociva de ciertos estímulos y la naturaleza aversiva de otros que pueden volverse nocivos, así como determinar la intensidad de los mismos.

Ha sido bien establecido que la administración en mamíferos de opiáceos endógenos (endorfinas, encefalinas y dinorfinas), y de agonistas como la morfina, provocan un efecto analgésico. Dicho efecto es revertido por antagonistas como el naloxono y el naltrexono.

Este fenómeno se ha podido comprobar también en invertebrados. La morfina provoca efectos antinociceptivos reversibles por naloxono en el camarón de mar *Squilla mantis* (Maldonado y Miralto, 1982) y

en el mántido *Stagmatoptera biocellata* (Zabala et al., 1984). Este mismo efecto se ha observado ante la administración de opiáceos endógenos en *Apis mellifera* (Núñez et al., 1983) y en *Periplaneta americana* (Hentschel y Penzlin, 1982).

Autoanalgesia.

La comprobación de que había opiáceos endógenos en animales, condujo a postular la existencia de mecanismos de autoanalgesia inducida por estimulación nociceptiva, suponiéndose que ella estaría mediada por la liberación endógena de ese tipo de compuestos. Una primera comprobación de esta hipótesis resultó de estudios en los que se informaba sobre autoanalgesia provocada por la estimulación eléctrica de sitios específicos del cerebro (Mayer et al., 1971), la que era revertida por naloxono (Akil et al., 1972; 1976b) y presentaba tolerancia cruzada con la morfina (Mayer y Hayes, 1975).

En trabajos posteriores se demostró que una amplia gama de estímulos ambientales eran también capaces de inducir autoanalgesia, acuñándose entonces el término *analgesia inducida por estrés* (*stress induced analgesia*) para encuadrar todos estos casos. En efecto, en 1976, tres laboratorios independientemente informaron por primera vez sobre este fenómeno (Akil et al., 1976a; Hayes et al., 1976; Rosecrans y Chance, 1976).

En una primera serie de experimentos, realizados en ratas, se demostró que la exposición repetida a estímulos eléctricos inescapables en las extremidades, conducía a una elevación del umbral del dolor, efecto que es parcialmente revertido por la administración de naloxono (Akil et al., 1976a; Madden et al., 1977).

En una segunda serie de experimentos, Rosecrans, Chance y colaboradores utilizaron la estimulación eléctrica en las extremidades como estímulo incondicionado en un paradigma de condicionamiento clásico y comprobaron que el estímulo condicionado *per se* era capaz de elevar el umbral de dolor cuando se lo presentaba luego de una sesión de condicionamiento. Este aumento en el umbral de dolor fue correlacionado con un incremento de la unión de [Leu]-Encefalina marcada en el cerebro (Rosecrans et al., 1976; Chance et al., 1978a; Chance et al., 1978b).

En una tercera serie de experimentos se utilizó una variedad de estímulos estresantes (choque eléctrico en las extremidades, rotación centrífuga, etc.) capaces de elevar el umbral del dolor. En estos trabajos, sin embargo, la administración de naloxono no revertía el efecto analgésico (Hayes et al., 1976; Hayes et al., 1978).

La *analgesia inducida por estrés* puede ser desencadenada por una gran variedad de estímulos, pero parece ser que el mecanismo mediador del fenómeno variaría según el estímulo usado o según las condiciones en que se estimula. Se llegó así a diferenciar una autoanalgesia de naturaleza opiácea de otra no-opiácea. Los criterios para determinar si una analgesia es mediada por sustancias opiáceas son fundamentalmente cuatro:

a) Reversión de la autoanalgesia por antagonistas.

b) Desarrollo de tolerancia por la repetición de las sesiones de estimulación.

c) Tolerancia cruzada con agonistas (ej.: morfina).

d) Tolerancia cruzada con la analgesia de naturaleza opiácea producida por otro inductor.

El estímulo más usado para inducir autoanalgesia es el choque

eléctrico inescapable en las extremidades. Se ha podido determinar que una estimulación continua produce un aumento de los umbrales de dolor que no es mediada por opiáceos, mientras que la presentación intermitente del estímulo provoca una analgesia opiácea (Lewis et al., 1980; Lewis et al., 1981; Ross y Randich, 1984). Torman et al. (1984) indicaron que la interacción entre la intensidad del estímulo eléctrico, la duración de cada uno y el período de exposición a los mismos (por ende el número de estímulos recibidos), determina si el sustrato para la analgesia es de naturaleza opiácea o no.

Otro estímulo muy usado como inductor de analgesia en ratas es el baño inescapable en agua. A una temperatura de 2 oC este tratamiento produce una profunda analgesia no opiácea, mientras que a temperaturas mayores (15 y 21 oC) produce una analgesia que es bloqueada con naloxono y presenta tolerancia cruzada con la morfina (Bodnar et al., 1978a; Bodnar et al., 1978b). También en este caso ocurre un cambio en el sustrato de la analgesia cuando se modifica el precedimiento, desde una estimulación continua a una intermitente (Girardot y Holloway, 1984a,b).

La privación de ingesta, la administración de insulina o de un análogo antimetabólico de la glucosa, incrementan los umbrales de dolor frente a varios tests (Bodnar et al., 1978c; Bodnar et al., 1978d; Bodnar et al., 1979; McGivern et al., 1979). En general, los estudios de privación de glucosa indican que, al igual que con los estímulos anteriores, la intensidad (dosis o grado de privación) y la duración (tratamientos crónicos o agudos) son variables importantes para determinar la naturaleza de la analgesia.

Se ha demostrado que la hipotermia e hipertermia son también inductores en experimentos realizados con el gasterópodo *Cepaea nemoralis*. Cuando estos animales fueron sometidos a una

temperatura de 38 oC se produjo una analgesia que fue bloqueada por antagonistas opiáceos. Por el contrario, la exposición a una temperatura inferior (7 oC) presentó una analgesia que no fue afectada por antagonistas opiáceos. La presencia de ambos tipos de analgesia en invertebrados sugiere un desarrollo filogenético temprano de los mecanismos antinociceptivos (Kavaliers, 1987).

Existe una amplia variedad de estímulos capaces de desencadenar autoanalgesia, inclusive aquellos que no son necesariamente de naturaleza aversiva. Trabajando principalmente en roedores, se ha demostrado que la breve exposición a una placa caliente (Galina et al., 1983), el sometimiento a una rotación centrífuga (Hayes, 1978), la resticción de los movimientos (Amir y Amit, 1978), la estimulación vaginal (Komisaruk y Larson, 1971) o una presión aguda superficial (Amir et al., 1981), pueden aumentar los umbrales de dolor. Más aun, la exposición a estímulos novedosos como la introducción de claves ambientales o situaciones de aprendizaje nuevas, causa una analgesia mediada por opiáceos (*beta*-endorfina) (Izquierdo y McGaugh, 1985; Izquierdo y Netto, 1985a,b; Izquierdo et al. 1984; Siegfried et al., 1987). También se ha observado este fenómeno en el molusco *Lepaea nemoralis* ante la exposición a olores novedosos (Kavaliers y Tepperman, 1988).

Los conflictos sociales y la agresión intraespecífica provocan estados de estrés que son inducidos por estímulos menos artificiales que los comúnmente utilizados en el laboratorio. La situación típica es la de un encuentro entre un ratón residente, que adopta una actitud agresiva, y un intruso que despliega una variedad de posturas defensivas y desarrolla una analgesia cuya intensidad, duración y naturaleza dependen del tiempo de exposición al ataque (Siegfried, Frischknecht, Kulling y Gaudenz Waser, 1987).

Comportamientos defensivos y opiáceos.

Izquierdo y colaboradores, han desarrollado un modelo para explicar el papel de mecanismos opiáceos activados por la presentación de una amplia variedad de situaciones experimentales y sus efectos sobre los procesos de memoria. Han comprobado que la exposición a nuevos ambientes y a una serie de estímulos y tareas, que solo tienen en común el hecho de ser novedosos para el animal, provocan la depleción de la *beta*-endorfina hipotalámica. Estos mismos estímulos presentados posteriormente no provocan dicho efecto, dado que ya no resultan novedosos. La liberación de *beta*-endorfina causa por un lado una autoanalgesia mientras que, por otro lado, tiene una acción sobre la memoria. Efectivamente, la administración post-entrenamiento de naloxono u otros bloqueantes de los receptores opiáceos, facilita la retención de tareas aprendidas cuyo entrenamiento ha sido acompañado por la liberación de esta sustancia. Por el contrario, la administración post-entrenamiento de *beta*-endorfina, encefalinas o un choque electroconvulsivo (que provoca una liberación masiva de *beta*-endorfina) reduce o impide la retención. Estos resultados son interpretados a la luz de la teoría de la dependencia de estado. Diferencias en el estado interno del animal entre el momento del entrenamiento y el test, dificultan la evocación mnésica. Dado que la experiencia es novedosa en el entrenamiento pero no en el test, se crea una asimetría en cuanto a la presencia interna de *beta*-endorfina y dicha incongruencia puede ser aumentada o reducida por administracion exógena u otros tratamientos. Estos investigadores han informado que la habituación (consistente en la

reducción del comportamiento de exploración entre el entrenamiento y el test) a una arena de observación ("open field"), causa una liberación de *beta*-endorfina cerebral. Se atribuye este efecto a alguno de los elementos presentes en la tarea, tales como el reconocimento de la novedad, la reacción a la novedad o la inhibición de dicha reacción (Neto, Dutra Días e Izquierdo, 1986).

Una serie de estudios realizados por Maier y colaboradores demostraron que la exposición de ratas a situaciones de estrés inescapable (por ejemplo, choques eléctricos en la cola en condiciones de restricción de movimientos), causan deficiencias en aprendizajes posteriores. Este fenómeno ha sido denominado aprendizaje de la inescapabilidad (en ingles "learned helplessness") y fue observado también en humanos, perros, gatos, peces, ratones, aves e insectos. De acuerdo con estos autores, no es directamete el estrés el responsable del déficit en el aprendizaje, sino que los animales aprenden que no tienen control sobre el agente estresor y por lo tanto cualquier respuesta resulta inútil (Maier y Seligman, 1976). Además de dicho efecto, estos investigadores han observado que la exposición a estímulos incontrolables provoca inactividad ante la presencia de eventos aversivos y reducción en la agresión y la dominancia social.

Otras posiciones teóricas fueron postuladas para intentar explicar el fenómeno, tales como el aprendizaje de los animales a permanecer inactivos durante la presencia de un choque eléctrico para reducir la cantidad de corriente que pasa por su cuerpo (Glazer y Weiss, 1976), la depleción de la norepinefrina cerebral que provoca una reducción en la motilidad (Weiss, Stone y Harrell, 1970) y la autoanalgesia producida por opiáceos endógenos en respuesta a un choque eléctrico

incontrolable, que reduce el aprendizaje al reducir la percepción del estímulo incondicionado (Whitehouse, Walker, Margules y Bersh, 1983).

En exhaustivos trabajos posteriores Maier y colaboradores (revisión en Maier, 1986) sugirieron que el establecimiento de una analgesia opiácea depende del grado de controlabilidad del estresor, dado que en todos los casos existentes de analgesia inducida por estrés el estímulo estresor usado ha sido incontrolable. De esta manera, la analgesia no resultaría de la exposición al estímulo *per se*, sino de lo que el organismo aprende acerca del estímulo. La estimulación inescapable, al contrario de la escapable, activaría el sistema opiáceo involucrado en la analgesia inducida por estrés. Experimentalmente se ha observado (Maier, Sherman, Lewis, Terman y Liebeskind) que animales a los cuales se les presenta una serie de choques eléctricos, primero desarrollan una analgesia no opiácea que luego desaparece a medida que surge una analgesia opiácea.

Este fenómeno sólo se observa en el caso que los estímulos sean inescapables, mientras que aquellos que recibieron el mismo número de estímulos escapables no muestran la analgesia opiácea. Por otro lado, la presentación de unos pocos estímulos, 24 horas después, produce una reinstalación de la analgesia mediada por opiáceos, únicamente en aquellos animales que tuvieron una experiencia anterior inescapable.

En resumen, según estos investigadores, el choque inescapable conduce al organismo a aprender que no tiene control sobre el estímulo y este aprendizaje activa un sistema analgésico de naturaleza opiácea.

Otro modelo de comportamiento defensivo que involucra la acción de opiáces endógenos, en este caso relacionado con estímulos de

peligro, ha sido desarrollado por Fansellow y colaboradores (Fansellow, 1986). Esta basado en experimentos realizados con ratas utilizando el paradigma de condicionamiento al miedo. El modelo ha sido denominado recuperativo-defensivo-perceptual y se puede resumir en los siguientes términos:

La presencia de señales de peligro, tanto innatas como aprendidas (estímulos neutros que han sido asociados a situaciones aversivas), tienen la habilidad de activar *el sistema defensivo* que desencadena reacciones que son características de cada especie. En el caso de las ratas un comportamiento típico de defensa es permanecer inmóviles ("freezing"), para reducir así la probabilidad de ser detectadas. Por otro lado, los estímulos nociceptivos, a través de un *detector de intensidad nociceptiva*, provocan respuestas incondicionadas, muchas de las cuales son reflejos de evitación. Cuando los estímulos nociceptivos causan un daño duradero en los tejidos, traen como consecuencia comportamientos más complejos dirigidos hacia el lugar del daño, denominados *comportamientos recuperatorios*. Ejemplos de ellos son lamerse las heridas, inmovilizar las zonas dañadas, etc.

Las respuestas desencadenadas por los estímulos nociceptivos pueden interferir con los comportamientos defensivos, comprometiendo su efectividad, ya que, por ejemplo, una respuesta refleja o un comportamiento recuperatorio interfieren con el "freezing". Estos autores sugieren que la presencia de señales de peligro activan procesos analgésicos que reducen el impacto que los estímulos nociceptivos tienen sobre el animal, favoreciendo así la defensa. Esta analgesia es revertida con antagonistas opiáceos como el naloxono y el naltrexono.

De esta manera, un estímulo de peligro suprime, a través de la acción de un mecanismo opiáceo, la percepción del dolor y por lo tanto reduce las respuestas incondicionadas y los comportamientos recuperativos. Como consecuencia de este efecto antinociceptivo, se reduce la posibilidad de asociar la señal de peligro con el el estímulo nociceptivo. Por el contrario, se ha demostrado que la administración de naloxono a ratas, incrementa la fuerza asociativa entre el estímulo condicionado (señal de peligro: la cámara experimental) y el incondicionado (estímulo nociceptivo: choque eléctrico). Este fenómeno tiene lugar porque al antagonizarse la acción opiácea endógena que media la autoanalgesia, se incrementa la percepción del estímulo doloroso como si se tratase de un aumento en la intensidad del choque (Fansellow, 1981).

Objetivos de la Tesis

En los modelos teóricos anteriormente mencionados, así como en la mayoría de los estudios realizados sobre el tema, el papel de los opiáceos en relación con el comportamiento defensivo queda limitado a su conocida acción sobre la percepción del dolor. Sin embargo, algunos resultados experimentales (Davis, 1979; Grevert y Goldstein, 1977) sugieren que también la percepción del miedo y las respuestas a estímulos de peligro podrían estar moduladas por la acción de mecanismos similares. Con este marco teórico, el objetivo general de esta Tesis ha sido estudiar la posible acción de los opiáceos sobre el comportamiento defensivo desencadenado por un estímulo de peligro,

concretamente por un estímulo que en la naturaleza presagia la aproximación de un predador.

Se utilizó como modelo experimental el comportamiento defensivo del cangrejo *Chasmagnathus granulatus* que presenta las siguentes ventajas:

i) Muestra respuestas defensivas conspicuas y estereotipadas evocables con facilidad, principalmente cuando se trata de estímulos visuales, lo que facilita su observacion y cuantificación;

ii) Los cangrejos carecen, a diferencia de los insectos y los vertebrados, de barrera hematocerebral (Abbott, 1970), por lo que las drogas pueden actuar más directamente y más rápidamente sobre el tejido ganglionar. Poseen, además, una elaborada red capilar en el cerebro y en el ganglio torácico (Sandeman, 1967)

iii) Ejemplares de *Chasmagnathus* pueden ser coleccionados en gran cantidad en las rías de San Clemente del Tuyu durante prácticamente todo el año;

iv) Demuestra mantenerse en muy buenas condiciones experimentales por períodos de al menos veinte días después de su captura, conservándose en el laboratorio con bajo costo de mantenimiento;

v) Es posible obtener una habituación de corto y largo término de una respuesta defensiva con un entrenamiento breve.

vi) Comparte una virtud generalmente atribuida a los "invertebrados": la posibilidad de que debido a su menor complejidad organizativa, comparada con la de los vertebrados, se haga mas fácil el acceso a estudiar los mecanismos que median fenómenos muy complejos como el aprendizaje y la memoria.

Los objetivos particulares incluidos en el propósito general de la

tesis, pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Determinación de la sensibilidad opiácea en estos animales. Estudio de los efectos de agonistas y antagonistas opiáceos sobre el comportamiento defensivo provocado por un estímulo nociceptivo.

2. Estudio de los efectos agonistas y antagonistas opiáceos sobre el comportamiento defensivo provocado por un estímulo de peligro.

3. Estudio de los efectos agonistas y antagonistas opiáceos sobre el comportamiento defensivo ante la presentación reiterada de un estímulo de peligro.

CAPITULO 1

SENSIBILIDAD OPIACEA EN EL CANGREJO *CHASMAGNATHUS GRANULATUS*

Efecto de morfina y naloxono sobre una respuesta defensiva ante un estímulo nociceptivo.

INTRODUCCION

De acuerdo con el objetivo de esta tesis, el primer paso del presente trabajo ha sido indagar acerca de la existencia de receptores opiáceos en *Chasmagnathus*, mediante un estudio sistemático de los efectos antinociceptivos de los opiáceos, con particular énfasis en la acción de la morfina en función del tiempo y la dosis. Dichos efectos se estudiaron a través de la inhibición de una respuesta provocada por un choque eléctrico.

Estudios previos han sugerido que la potencia de la morfina en artrópodos es mucho menor que en vertebrados. Los valores de dosis efectivas DE-50 (dosis que produce un efecto antinociceptivo en el 50 % de la población) obtenidos en artrópodos varían entre 90 y 930 ug/g mientras que en vertebrados varían entre 0,3 y 10 ug/g (Smits y Takemori, 1970). Los altos niveles de DE-50 en artrópodos han merecido diversas explicaciones: baja difusión de la droga debido al sistema circulatorio abierto, rápida degradación de la droga en la hemolinfa, una cinética peculiar de los receptores opiáceos en artrópodos. Sin embargo, para una correcta evaluación de la potencia de la droga es indispensable un análisis de la respuesta en función del tiempo y de la dosis. Desafortunadamente, ese tipo de estudio no se ha realizado en los trabajos que informan altos valores de DE-50 en artrópodos, de tal manera que la supuesta menor potencia de las drogas podría explicarse por el hecho de que los registros no se obtuvieron en los niveles máximos de acción de la morfina.

MATERIALES Y METODOS.

Animales.

Los animales utilizados fueron cangrejos machos adultos de la especie *Chasmagnathus granulatus*, de un tamaño tal que el ancho del caparazón estuvo comprendido entre 2,8 y 3,0 cm. Estos animales fueron capturados en las aguas salobres de poca profundidad y zonas intertidales de las rías de San Clemente del Tuyu, Provincia de Buenos Aires, y transportados al laboratorio en recipientes especialmente diseñados, donde fueron alojados en la sala de mantenimiento en contenedores plásticos de paredes opacas (40 x 60 x 30 cm) con 1 a 2 cm. de profundidad de agua traída del mismo lugar de captura. El peso de los animales fue inicialmente determinado y la cantidad de droga administrada se calculó en base a la media obtenida (17,3 g +/- 0,2; n=60).

Tanto la sala mantenimiento como la experimental se mantuvieron a 20-22^{0}C. Los animales eran alimentados cada tres días con pellets de conejo (Nutrientes SA). Cada cangrejo era usado en un solo experimento a partir del 3er. día de arribo al laboratorio y hasta el 15to. día de permanencia.

Procedimiento y dispositivo experimental.

Se implantaban 2 agujas de acero inoxidable (Figura 1, E y E') en la parte dorsal del caparazón (Figura 1, puntos A y A') a una profundidad de 3 mm. Dichos puntos son depresiones fijas y fácilmente

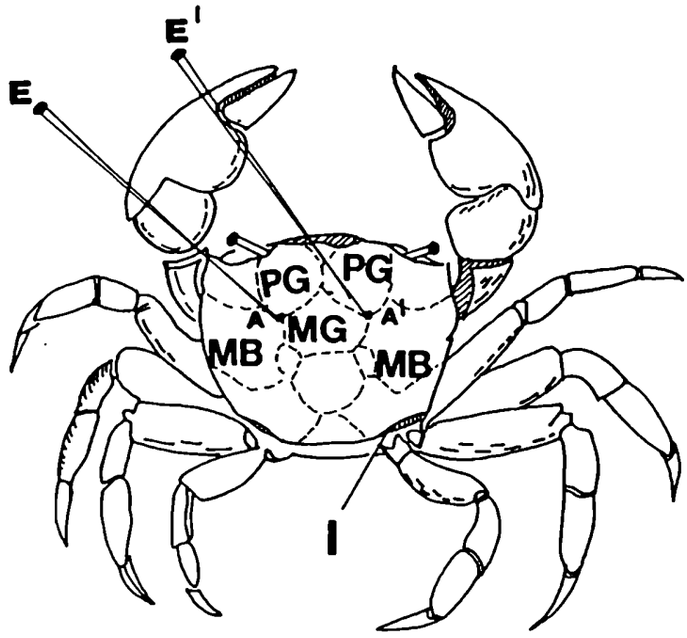


FIGURA 1. Diagrama de un cangrejo macho *Chasmagnathus granulatus*. **A, A'**: Puntos de implantación de los electrodos **E** y **E'**. Se indican las regiones que convergen en los puntos **A** y **A'**. **PG**: regiones protogástricas, **MG**: región mesogástrica, **MB**: regiones mesobranquiales. **I**: Lugar por donde se aplicaba la inyección.

visibles en la confluencia de 3 regiones del caparazón: la región protogástrica, mesogástrica y mesobranquial (Boschi, 1972). Las agujas eran fijadas a la cutícula y conectadas a un estimulador eléctrico. Se ubicaba a los animales así implantados en recipientes de plástico con un fondo de 1 cm. de agua, iluminados por una lámpara de 10 w. Había 40 recipientes en la sala de experimentación.

Luego de 30 min. de adaptación en los recipientes, cada cangrejo era inyectado rápidamente (1 a 2 seg.) mediante una jeringa Hamilton a través de la membrana que separa dorsalmente el cafalotórax del abdomen (Figura 1, I). La aguja era introducida en el costado derecho de dicha membrana, al lado de la base de la última pata derecha. De

este modo el líquido resultaba inyectado dentro del seno pericárdico, laguna sanguínea donde se acumula la hemolinfa antes de entrar en el corazón. Así se aseguraba que las drogas administradas llegasen rápidamente a los tejidos nerviosos, ricamente irrigados. La inyección consistía en 100 ul. de vehículo (agua destilada) o de una solución de la droga a ser testeada. En experimentos preliminares se comprobó que no existen diferencias en los resultados si se usa agua destilada en lugar de una solción salina, hecho que está de acuerdo con lo que ocurre en otros artrópodos (Maldonado y Miralto, 1982; Núñez et al., 1983; Zabala et al. 1984).

Ensayo y respuesta defensiva.

Cada ensayo consistía en un único choque eléctrico (estímulo nociceptivo) de 1 seg., 50 Hz, que según el experimento era de 4, 6, 8 o 10 Volts, aplicados a 2, 7, 15, 30, 45 o 75 minutos después de la inyección.

Ante este estímulo, el animal realiza una respuesta defensiva que consiste en levantar ambas quelas abiertas por encima de los pedúnculos oculares, mientras que el cuerpo es elevado mostrando su parte ventral de pigmentación rojiza. Esta respuesta es una reacción bien conocida del cangrejo ante un estímulo aversivo fuerte y se la denomina en la literatura *despliegue lateral del merus*, DLM (Schone, 1968; Wright, 1968). En el laboratorio se computaba respuesta toda vez que ante el choque el cangrejo desplegaba un DLM completo, es decir un despliegue como el que se describió anteriormente. El cómputo de respuesta se hacía por simple observación, encontrandose un alto nivel de confiabilidad interobservador (98 %).

Sensibilidad nociceptiva básica y porcentaje de inhibición

de la respuesta.

Se definió como *sensibilidad nociceptiva básica* (SNB) el porcentaje de animales control (inyectados con agua destilada) que desplegaban la respuesta, conforme a la ecuación

$$SNB = RC/N \times 100$$

donde RC es el numero de animales control respondientes y N el total de animales control.

El *porcentaje de inhibición de la respuesta defensiva* debido a la acción de la droga se definió como:

$$\% IR = [\ 1 - (RE/RC)\ ] \times 100$$

donde RE es el número de respondientes del grupo experimental (inyectados con la droga).

En todos los casos en que se determinó el % IR, los grupos experimentales y el grupo control (inyectado con agua destilada) fueron corridos simultáneamente en la misma sala experimental y todos tuvieron el mismo número de animales, de manera tal que el grupo control incluía entre 20 y 25 cangrejos respondientes (RC).

RESULTADOS Y DISCUSION.

Efecto de la intensidad del estímulo sobre la SNB.

Ciento veinticuatro cangrejos inyectados con agua destilada fueron distribuidos al azar en 4 grupos de 31 animales cada uno.

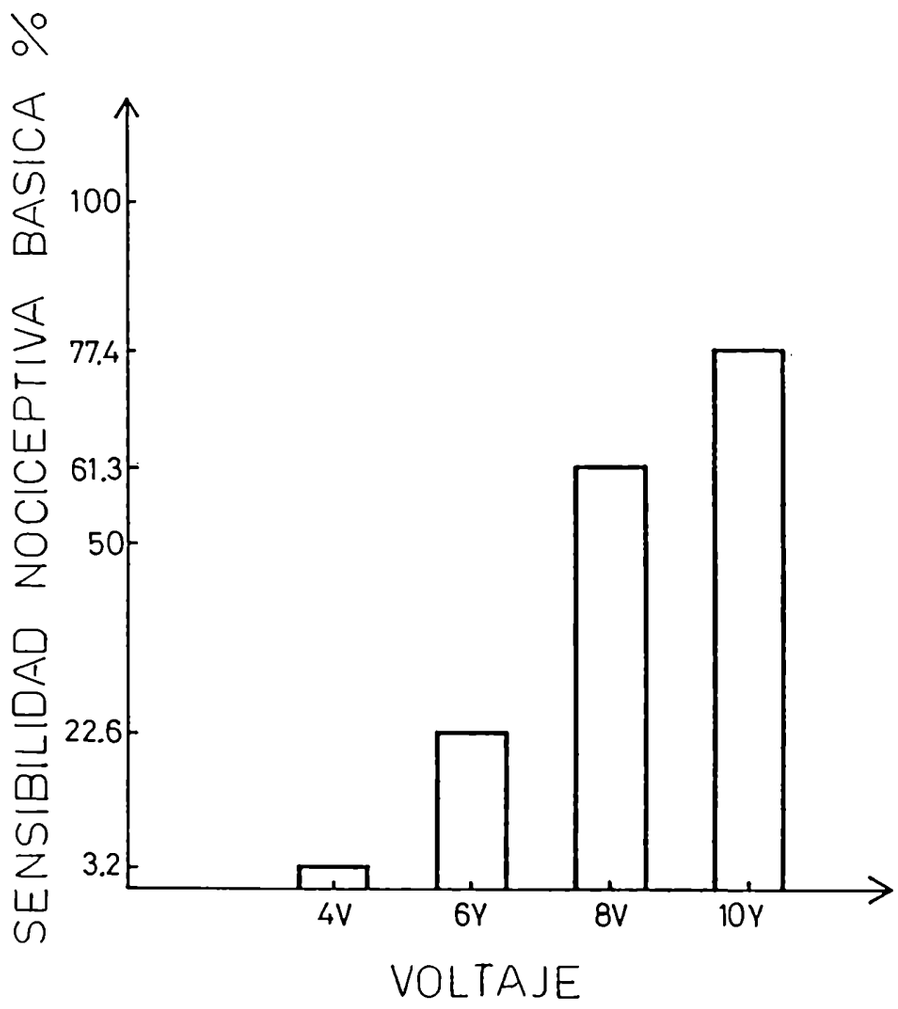


FIGURA 2. Sensibilidad nociceptiva básica en función del voltaje.

Treinta minutos después de la inyección un grupo recibió un choque eléctrico de 4 V.; un segundo grupo, 6 V.; un tercer grupo, 8 V y un último grupo, 10 V.

Como se muestra en la Figura 2, la reactividad ante el choque eléctrico aumentó al incrementar el voltaje, es decir al aumentar la fuerza del estímulo. Este hecho sugiere que la medida de la reactividad refleja variaciones en la sensibilidad nociceptiva, lo cual permite usar la respuesta como un modelo para el estudio de los

efectos de agonistas y antagonistas opiáceos sobre dicha sensibilidad nociceptiva.

Variacion de la SNB segun la época del año y el intervalo inyección-choque.

Dado que los experimentos se realizaron en base a 18 capturas diferentes a lo largo de 3 estaciones, se estudió la relación que guarda la SNB con la estación de captura, al mismo tiempo que se analizó la influencia del intervalo entre la inyección y el ensayo con el choque eléctrico.

Grupos de 30 cangrejos fueron analizados según una distribución factorial de 2 factores, Estación de Captura (otoño, invierno, primavera) e Intervalo Inyección-Choque (2-15 min., 30-45 min., 60-75 min).

La Figura 3 ilustra la correlación entre la SNB y la estación de captura. Una regresión lineal reveló una disminución significativa de la respuesta en función de las estaciones del año. Un ANOVA de 3x3 realizado sobre los valores de SNB mostró que la Estación de Captura probó ser una fuente de variación significativamente mayor que las diferencias individuales ($F(2,9)=5,26$; $p<0,025$). Por otro lado, el factor Intervalo Inyección-Choque no mostró diferencias significativas, como tampoco existió interacción entre los dos factores.

Es decir que la sensibilidad nociceptiva disminuyó linealmente desde otoño a primavera, mientras que el intervalo entre la inyección y el ensayo no afectó la respuesta al estímulo nociceptivo.

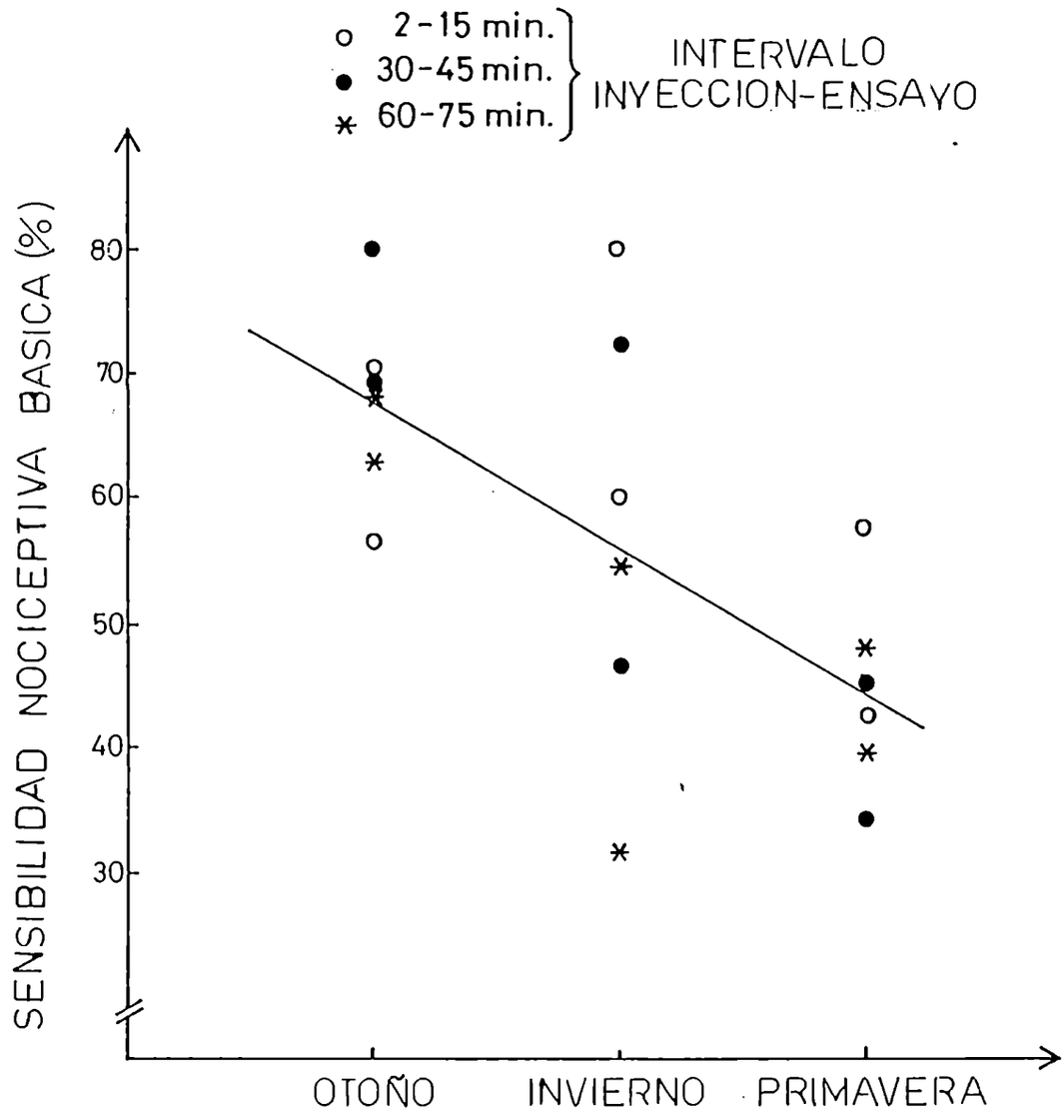


FIGURA 3. Sensibilidad nociceptiva básica y época del año. Regresión lineal: r^2= 0,41; t= 3,25; p < 0,005.

Efecto de la morfina sobre la sensibilidad nociceptiva.

Se estudió el efecto sobre la SNB de 3 dosis de morfina : 50 ug/g , 100 ug/g y 150 ug/g de morfina-HCl (Saporiti, Argentina).

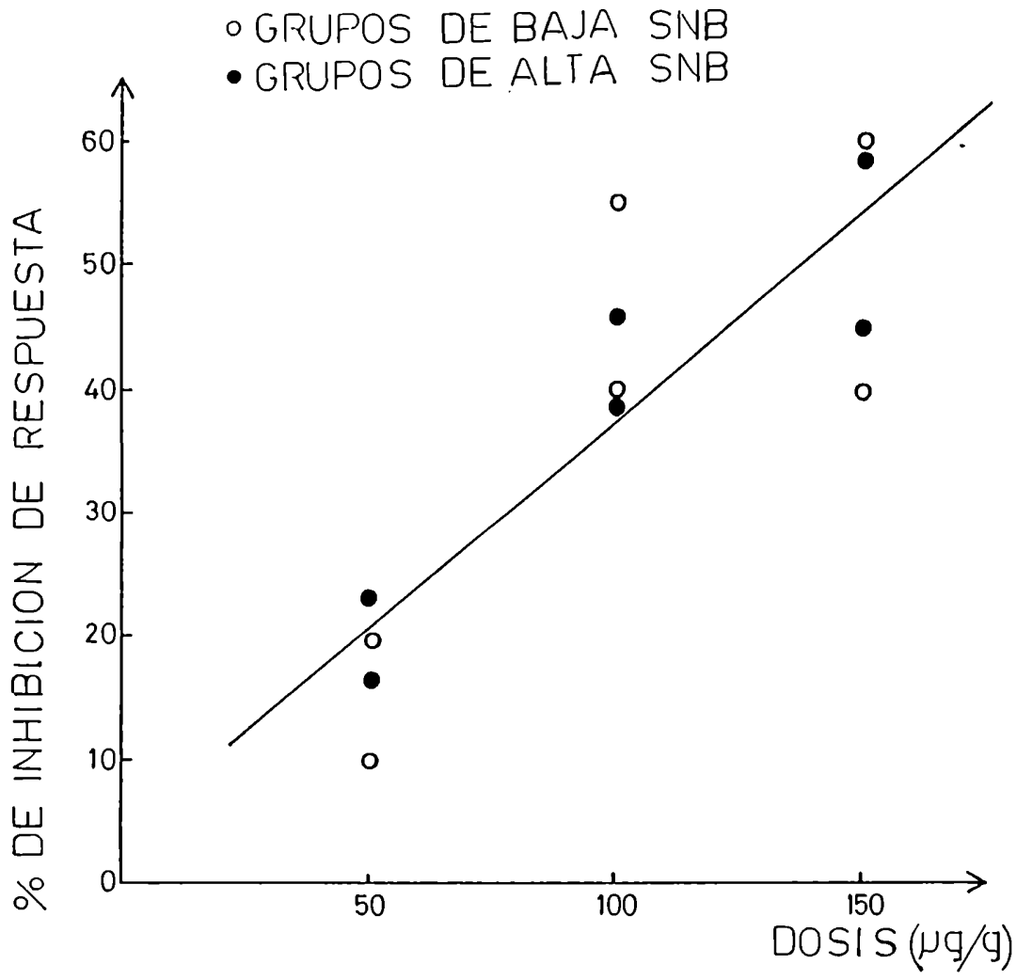


FIGURA 4. Porcentaje de inhibición de la respuesta en función de la dosis de morfina. Regresión lineal: r^2= 0,72; t= 5,07; p < 0,001.

Para cada dosis se establecieron 4 grupos de 30 animales cada uno, 2 de los grupos pertenecientes a capturas de baja SNB (35-50 %) y otros 2 pertenecientes a capturas de alta SNB (65-80 %). También se establecieron 4 grupos controles con las mismas características.

Treinta minutos despues de la inyección se realizo un ensayo con un choque eléctrico de 8 V.

La Figura 4 muestra los resultados. Un ANOVA de 2x3 sobre los porcentajes de inhibición de la respuesta indicó que el factor dosis de morfina es una fuente de variación significativamente mayor que las diferencias individuales ($F(2,6)=15,23$; $p<0,01$), mientras que no hubo diferencias significativas debido a las diferentes SNB ni interacción entre los dos factores. Una regresión lineal realizada sobre estos valores ilustra la reducción dosis dependiente de la reactividad, es decir, un aumento en la inhibición de la respuesta.

Esta reducción de la sensibilidad nociceptiva inducida por la morfina demostró ser independiente de los distintos niveles de SNB. Por lo tanto, animales que provienen de diferentes capturas pueden ser usados para un mismo experimento teniendo en cuenta que los valores de SNB de los controles sean cuidadosamente evaluados para cada captura.

Efecto del Naloxono.

El diseño experimental incluía 3 conjuntos de grupos. El conjunto A comprendía un grupo **Control** y un grupo **Nx 18** inyectado con 18 ug/g de solución de naloxono-HCl (Sigma, St. Luis, USA); el conjunto B comprendía un grupo **Control** y un grupo **Nx 1,6** inyectado con 1,6 ug/g de solución de naloxono y el conjunto C comprendía un grupo **control**, un grupo **Mf 100**, inyectado con 100 ug/g de morfina, y un grupo **Mf 100 + Nx 1.6**, inyectado con 100 ug/g de morfina más 1.6 ug/g de naloxono. En todos los casos se dio un choque de 8 V., 30 min. después de la inyección. En este experimento se utilizaron 30 animales respondientes en el grupo control (RC) para cada conjunto de grupos.

TABLA 1

EFECTO DEL NALOXONO SOBRE LA SENSIBILIDAD NOCICEPTIVA Y LA INHIBICION DE LA RESPUESTA INDUCIDA POR LA MORFINA

CONJUNTO	GRUPOS	No. DE RESPONDIENTES	% I R
A	a. CONTROL	30	---
	b. 18 NX	29	3,4%
B	a. CONTROL	30	---
	b. 1,6 NX	30	0,0%
C	a. CONTROL	30	---
	b. 100 MF	17	43,4%
	c. 100 MF + 1,6 NX	29	3,4%

La Tabla 1 muestra los resultados. A pesar de administrar una alta dosis de naloxono (18 ug/g), no hubo efecto estadístico en el nivel de sensibilidad nociceptiva (test de diferencia de proporciones) (conjunto A). Una inyección de morfina de 100 ug/g (grupo C,b) produce una reducción en la sensibilidad que no difiere estadísticamente del 50 %. Una dosis de naloxono de 1,6 ug/g revirtió el efecto de inhibición de la respuesta producido por dicha dosis de morfina. La diferencia entre los grupos C,b y C,c fue altamente significativa ($z=3,66$; $p<0,001$).

El naloxono no presentó actividad agonistíca en ninguna de las

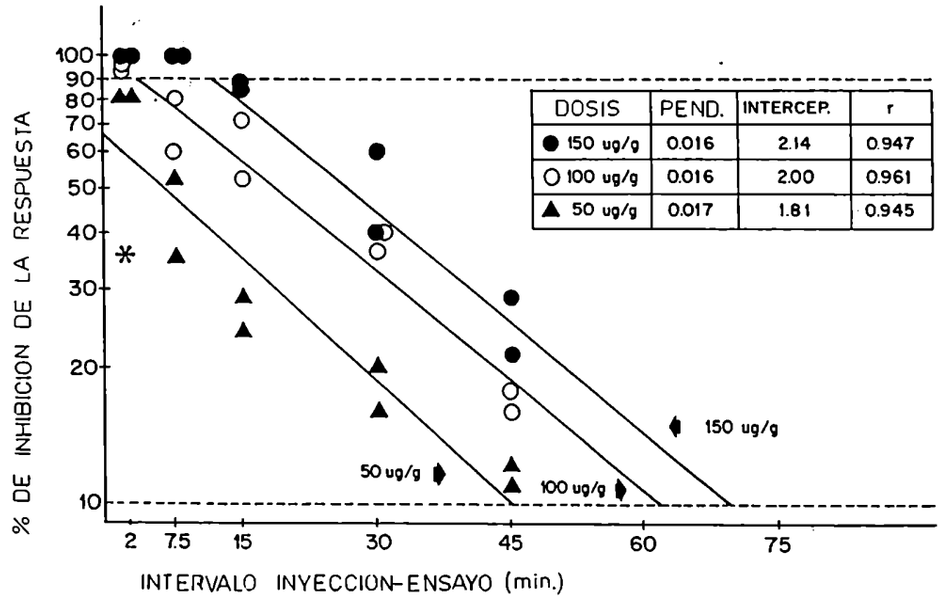
dosis, pero fue capaz de antagonizar el efecto de la morfina, de modo que esta última droga parece actuar a través de receptores opiáceos. Este hecho es consistente con resultados previos en otros artrópodos, lo que sugiere que el sistema opiáceo puede estar presente en todo el filum.

Duración de la inhibición de la respuesta inducida por la Morfina.

Los experimentos siguientes se realizaron para estudiar el efecto de la morfina sobre la sensibilidad nociceptiva en función del tiempo, es decir, del intervalo entre la inyección y el choque eléctrico.

Se estudiaron 6 intervalos inyección-choque: 2 - 7,5 - 15 - 30 - 45 y 75 min. Para cada intervalo se establecieron 2 conjuntos de cuatro grupos; cada conjunto estuvo conformado por los siguientes grupos: un grupo **Control**, un grupo **Mf 50** (inyectados con 50 ug/g de morfina-HCl), un grupo **Mf 100** (inyectados con 100 ug/g de morfina HCl) y un grupo **Mf 150** (inyectados con 150 ug/g de morfina-HCl). Finalmente, para el intervalo de 2 minutos se establecieron otros 2 grupos: un grupo **Control** y un grupo **Mf 25** (inyectados con 25 ug/g de morfina-HCl). Quedaron constituidos, entonces, 50 grupos; todos ellos recibieron un choque eléctrico de 8 V. y se estimó para cada uno de ellos el $\overline{\%\ IR}$.

La Figura 5 presenta la regresión lineal del logaritmo decimal del $\overline{\%\ IR}$ vs. el intervalo inyección-choque para cada dosis realizado sobre los valores de inhibición de la respuesta comprendidos entre el 10 y el 90 %, esto es, excluyendo los valores que no difirieron estadísticamente de 0 y 100 % (test de diferencia de proporciones) respectivamente. Esto último, evita que el "efecto techo" -debido al



DOSIS	PEND.	INTERCEP.	r
● 150 ug/g	0.016	2.14	0.947
○ 100 ug/g	0.016	2.00	0.961
▲ 50 ug/g	0.017	1.81	0.945

FIGURA 5. Inhibición de la respuesta en función del tiempo para distintas dosis de morfina. Se realizaron regresiones lineales del logaritmo de % IR vs. intervalo inyección-choque para valores de % IR comprendidos entre 10 y 90 %. (*) indica el % IR de un grupo que recibió 25 ug/g de morfina con un intervalo de 2 min.

exceso de droga- y el "efecto piso" -debido a la reducción de la velocidad de eliminación por la baja concentración de la droga al final de la curva- afecten en los cálculos sobre la parte recta de la curva. Efectivamente, en esta parte de la curva, la bondad de ajuste fue alta para las 3 rectas (0,82 - 0,92), sugiriendo una inhibición de la respuesta en función del tiempo de forma monoexponencial. Un test de homogeneidad de los coeficientes de regresión indicó una pendiente común para las tres curvas (F=0,18). Esto implica que cuando se eliminan los valores asintóticos existe un efecto aditivo de la dosis.

De estas curvas se deduce que el máximo de acción de la

morfina se da a los 2 min. después de la inyección. Datos comparables en vertebrados indican que el pico de acción se alcanza entre los 20 y los 30 min. (Smits y Takemori, 1970; Tallaride et al., 1978). Sin embargo, cuando compuestos solubles en lípidos tales como el fentanilo son administrados en vertebrados, el máximo efecto de la droga se obtiene segundos después de la inyección (Hug y Murphy, 1981). Estos últimos datos se compadecen con la idea de que los cangrejos carecen de barrera hematocerebral (Abbott, 1970) o sugieren que de existir, ella sería más permeable a la morfina.

De acuerdo con las respectivas ecuaciones de las rectas de regresión de la Figura 5, se llega a un 50 % de inhibición 6 min. después de la inyección de una dosis de 50 ug/g, 18,8 min. después de una dosis de 100 ug/g, y 27 min. después de una inyección de 150 ug/g.

La DE-50 fue de aproximadamente 33 ug/g, valor estimado que surge de extrapolar el 50 % de inhibición utilizando el valor obtenido para 50 ug/g y el valor obtenido para 25 ug/g. a un intervalo de 2 min. (Figura 5).

El tiempo de duración del efecto (TD), que surge de la intercepción de las rectas con las abscisas, fue calculado de 45 min. para 50 ug/g, 61,4 min. para 100 ug/g y 69,8 min. para 150 ug/g.

Si se grafica TD vs. el logaritmo de la dosis se obtiene una recta (Figura 6) cuya ecuación es TD = 52,3 x log(dosis) - 43,7. En un modelo mono-compartamental, se sabe que la duplicación de la dosis causa un alargamiento del TD igual a la vida media (Verbeke y Jacquim, 1985), de modo tal que una estimación de este valor se puede calcular desde la ecuación de regresión de la Figura 6:

T1/2 = TD(100 ug/g) - TD(50 ug/g) = 15,7 minutos.

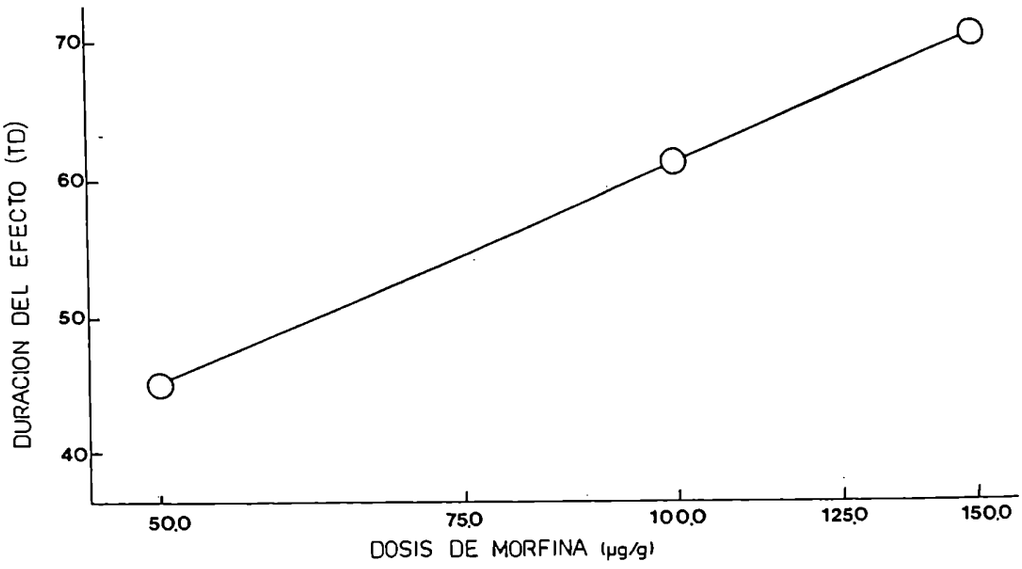


FIGURA 6. Duración del efecto (TD) vs. log. de la dosis de morfina.

Esta ecuación nos permite estimar además la dosis mínima (Qmin), la que se obtiene en la intersección de la recta con las abscisas:

Qmin = antilog 43,7/52,3 = 6,8 ug/g.

Cuando se administra a vertebrados dosis inferiores a 50 ug/g la duración del efecto es en promedio de 4 a 5 horas (Lasagna, 1964; Reynolds y Randall, 1957; Tallaride et al., 1978). Mediciones en la concentración plasmática indican que la vida media de la morfina en humanos es de 3 horas vía intracerebroventricular y de 2 horas con administración epidural. Estos hechos sugieren fuertemente que los artrópodos tienen una velocidad de eliminación de esta droga mucho mayor que los vertebrados.

De acuerdo con las ecuaciones de las Figuras 5 y 6, los valores de DE-50 y de la dosis umbral Qmin (33 ug/g y 6,8 ug/g

respectivamente) son similares a los obtenidos en vertebrados. Estos resultados están en desacuerdo con las conclusiones de trabajos anteriores en artrópodos (Maldonado y Miralto, 1982; Núñez et al., 1983; Zabala et al., 1984).

CONCLUSION

El cangrejo *Chasmagnathus granulatus* tiene sensibilidad opiácea, es decir, es sensible a la acción opiácea exógena, definida como la acción de una droga que administrada externamente tiene un efecto que es reversible por el naloxono (Leslie, 1987).

CAPITULO 2

ACCION OPIACEA SOBRE LA RESPUESTA A UN ESTIMULO DE PELIGRO

Efecto de la morfina y el naloxono sobre la respuesta de escape

INTRODUCCION

El pasaje de una figura o la proyección de una sombra sobre este animal provoca una rápida corrida que lo aleja de la señal. Dicha respuesta de escape es adaptativa pues en la naturaleza este estímulo presagia la aproximación de un predador y puede ser considerado como una señal innata de peligro (Krasne, 1972).

En el capítulo anterior se comprobó la existencia de una inhibición de la respuesta ante un estímulo nociceptivo provocado por la acción de un opiáceo (morfina); la explicacion más probable es que dicha inhibición tiene lugar por una reducción en la percepción del estímulo. Existen muchos antecedentes de este hecho en otros animales y es conocida la existencia de opiáceos endógenos que cumplen este papel en el sistema nervioso. Sin embargo, como se mencionó en la Introduccion General, ha sido muy poco considerada la hipótesis de la existencia de una acción opiácea análoga sobre la respuesta a estímulos de peligro. Mientras algunos trabajos han informado acerca del efecto de la morfina sobre el nivel de respuesta a estímulos no dolorosos (ej.: Davis, 1979), otros apoyan la idea de que la acción opiacea es relativamente específica a estímulos dolorosos (Fanselow, 1984; Warren e Ison, 1982).

Los experimentos del presente capítulo se realizaron para poner a prueba la acción de los opiáceos sobre las respuestas a señales de peligro.

MATERIALES Y METODOS.

Animales.

Idem Capítulo 1

Dispositivo experimental.

La unidad experimental utilizada fue el *actómetro* (Figura 7). Consistía en un recipiente plástico (R), de paredes cóncavas, con un piso de 10 cm. de diámetro, donde era alojado el animal. Estaba suspendido de una estructura de madera (23 x 23 x 30) a través de 3 hilos de nylon. El piso estaba cubierto a una profundidad de 0,5 cm. con agua del lugar de captura. En dicho piso había 2 electrodos (E y E') de acero inoxidable en contacto con un estimulador eléctrico, que permitían transmitir una corriente eléctrica a través del agua. La base del recipiente estaba unida a una aguja de acero inoxidable que a su vez se insertaba en una capsula fonográfica (P). Todo el aparato era iluminado por una lámpara (L) de 10 W. ubicada 30 cm. por arriba del mismo. Un motor (M) desplazaba una figura opaca rectangular (S) (10x25 cm.) desde una posición inicial (1) hasta cubrir 90 grados (posición 2) y luego volviendo a la posición de origen (1). Cada vez que la figura pasaba sobre el actómetro producía una sombra neta sobre una pantalla translúcida (PT), y provocaba en el cangrejo una respuesta de escape. En estas condiciones el estímulo era inescapable, ya que el animal no podía desplazarse de la base del recipiente debido a sus paredes cóncavas y lisas. Los movimientos del recipiente causados por la reacción del animal inducían diferencias de potencial en el elemento piezoeléctrico de la cápsula fonográfica, que eran amplificados, integrados temporalmente y traducidos a una

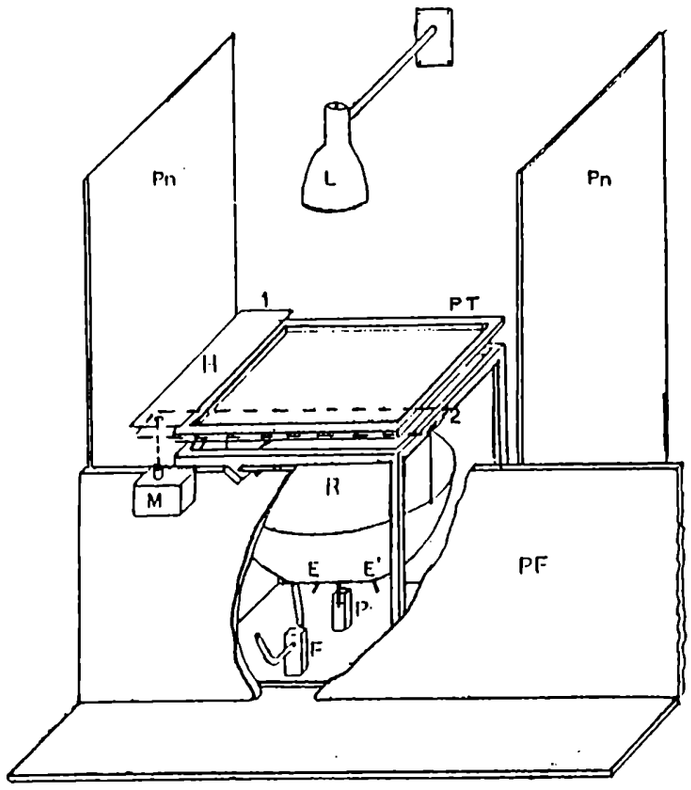


FIGURA 7. Actómetro. **M**: motor; **H**: figura de rotación horizontal; **R**: recipiente plástico; **E** y **E'**: electrodos; **P**: cápsula piezoeléctrica; **F**: freno; **PF**: pared frontal; **Pn**: paneles laterales entre actómetros; **L**: lámpara de 10 w; **PT**: pantalla translúcida.

escala numérica arbitraria desde 0 a 1000 (1 unidad = 0,02 V) y luego procesados por una computadora. La amplificación era establecida de modo tal que los valores máximos no alcanzaran normalmente las 1000 unidades. La actividad espontánea del cangrejo era esporádica y de baja intensidad, de modo tal que no se registraban valores mayores que 20 unidades para movimientos no inducidos por la sombra. Un brazo (B) trababa el recipiente para prevenir movimientos durante el manipuleo y limpieza, protegiendo de este modo al elemento piezoeléctrico.

La sala experimental tenia 40 actómetros aislados uno del otro por particiones laterales (PL) y una pared frontal (F). Dado que fueron corridos varios grupos de entre 30 y 40 animales cada uno, fue necesario realizar replicaciones durante el mismo día para completar cada grupo. En cada replicación eran usados simultáneamente un mismo número de animales para cada grupo, pero los animales de un mismo grupo eran ubicados cada vez en distintos actómetros. De esta manera se descartaba cualquier efecto potencial del momento del día y de diferencias de sensibilidad entre los actómetros.

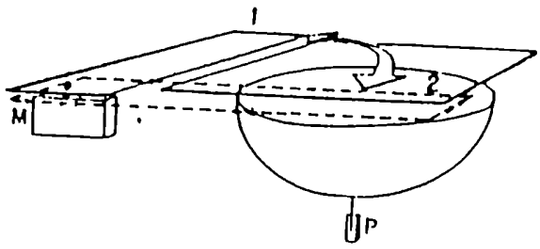


FIGURA 8. Representación esquemática de la rotación de la figura de desplazamiento horizontal sobre el actómetro desde posición **1** a **2** y nuevamente a **1**. **M**: motor; **P**: piezoeléctrico.

Procedimiento y Diseño Experimental.

Los animales eran llevados desde la sala de mantenimiento a la sala de experimentación donde se los ubicaba en los respectivos actómetros. Después de 30 min. de adaptación se hacía el primer ensayo (E_1). Este ensayo comprendía 2 ciclos de pasaje de la figura, consistiendo cada ciclo, en su desplazamiento desde la posición 1 a la 2 y de vuelta a la posición 1 (Figura 8). De modo tal que en todo el

ensayo la sombra pasaba 4 veces sobre el cangrejo. Este proceso duraba 9 seg., período durante el cual se registraba la actividad del cangrejo. Inmediatamente después de E_1, cada animal era inyectado con 100 ul de solución de la droga respectiva, con agua destilada como vehículo. La inyección se aplicaba de la misma manera que la descripta en el Capitulo 1.

Un segundo ensayo (E_2) era realizado 30 min. después de la inyección.

Los valores de respuesta en E_1 y E_2 se denominan R_1 y R_2 respectivamente. Los 30 min. de intervalo entre E_1 y E_2 y las dosis usadas fueron elegidas para hacer comparables los resultados con los obtenidos en el capitulo anterior. Todos los grupos eran corridos simultáneamente.

Para estimar el efecto de la droga sobre el nivel de respuesta a la sombra se compararon las medias de los valores individuales de R_2 para los distintos grupos. Un ANOVA realizado sobre los valores de R_1 de todos los grupos demostró que no existen diferencias significativas intergrupales ($F(8;271) = 1,4$), de modo que está justificado usar los valores de R_2 sin tener en consideración la respuesta inicial. De todos modos, debido a que hay una perceptible dispersión intragrupal, se adoptó una forma complementaria de medición de la respuesta que toma en cuenta la respuesta R_1, el *porcentaje de decremento de la respuesta* (% DR) por animal:

$$\% \text{ DR} = [(R_1 - R_2) / R_1] \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSION.

Experimento 1.

Ciento sesenta cangrejos fueron asignados al azar en 5 grupos de 32 animales cada uno. Un primer grupo recibió una inyección de agua destilada, un segundo grupo recibió una dosis de 25 ug/g de morfina-HCl, un tercer grupo recibió una dosis de 50 ug/g, un cuarto grupo recibió una dosis de 75 ug/g y un último grupo recibió una dosis de 100 ug/g. La Figura 9 muestra en el gráfico de la izquierda los valores medios de R_2. Un test de Dunnett sobre estos datos reveló diferencias significativas del grupo de agua destilada con respecto a los grupos de 50, 75 y 100 ug/g de morfina ($p < 0,05$), pero no presentó diferencias significativas con el grupo de 25 ug/g de morfina. Un test de linealidad indicó que hay una tendencia lineal significativa entre estas medias ($F(1; 155) = 42,3$; $p < 0,01$). Un test de Dunnett sobre las medias de % DR (Figura 9, gráfico de la derecha) mostró que el grupo con solución salina difería significativamente de todos los grupos restantes ($p < 0,05$) con una tendencia lineal significativa de las medias ($F(1; 155) = 46,6$, $p < 0,01$).

Por lo tanto, la administración de morfina produce una reducción dosis dependiente en la respuesta del cangrejo a una sombra pasante. De la ecuación de regresión de la Figura 9, gráfico de la derecha, se estimó la dosis de morfina que produce un 50 % de inhibición de la respuesta (DE-50)= 65,2 ug/g. Esta dosis resultó menor que la estimada en el Capítulo 1 para el efecto inhibitorio de la morfina sobre la respuesta del cangrejo a un estímulo doloroso en el mismo intervalo de tiempo (30 min.) que fue aproximadamente de 100 ug/g.

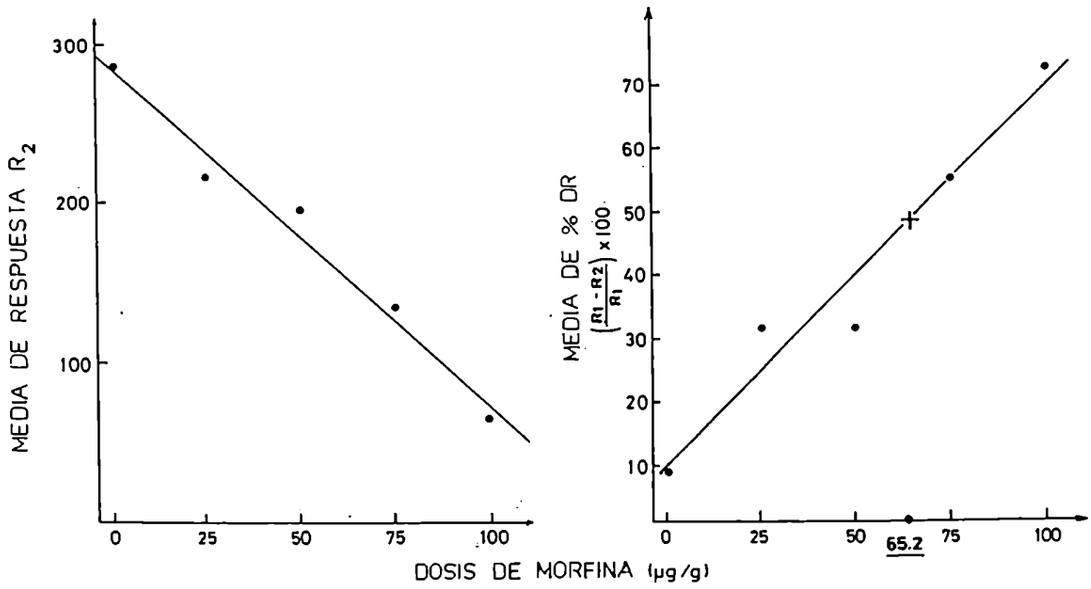


FIGURA 9. Regresión lineal de los valores medios de respuesta (R_2) 30 min. después de la inyección (izquierda) y de las medias del porcentaje de decremento de la respuesta (derecha). (+): 50 % de inhibición.

Experimento 2.

El propósito de este experimento fue testear si la morfina actúa a través de un receptor opiáceo al inhibir la respuesta del cangrejo a una sombra pasante. Es decir, si actúa del mismo modo que en el caso de un estímulo nociceptivo (Capitulo 1).

Ciento veinte cangrejos se distribuyeron al azar en cuatro grupos de 30 animales cada uno: grupo **AD**, inyectado con agua destilada; grupo **Mf 70**, inyectado con una dosis de 70 ug/g de morfina-HCl; grupo **Nx 1,6**, inyectado con una dosis de 1,6 ug/g de naloxono-HCl;

grupo **Mf 70 + Nx 1,6**, inyectado con una mezcla de 70 ug/g de morfina-HCl y 1,6 ug/g de naloxono-HCl, preparada en el momento de la inyección.

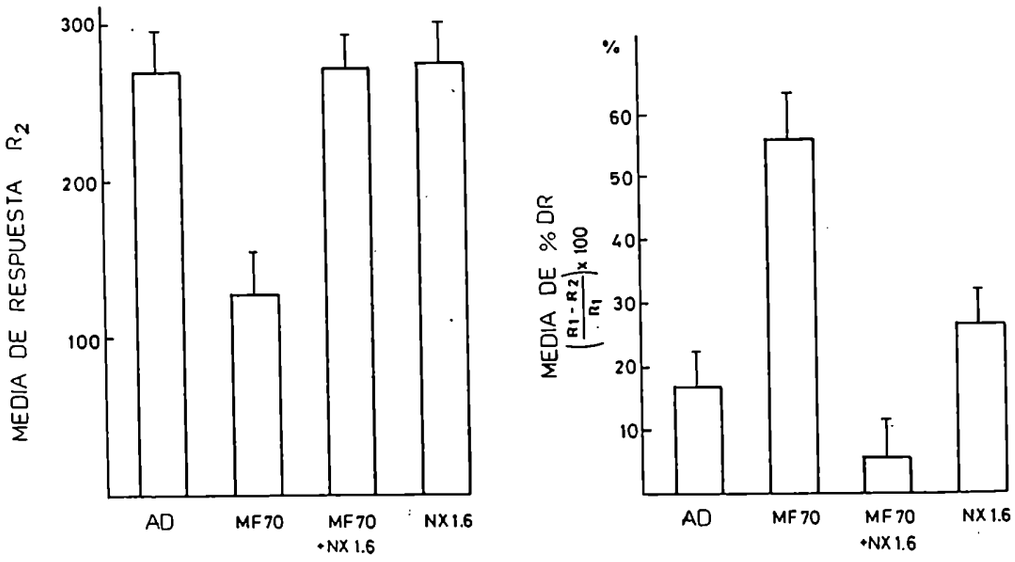


FIGURA 10. Medias de respuesta (R_2) más E.S., 30 min. después de la inyección (izquierda) y medias del porcentaje de decremento de la respuesta más E.S. (derecha). Grupos= MF70: 70 ug/g de morfina; MF70 + NX1,6: 70 ug/g de morfina más 1,6 ug/g de naloxono; NX1,6: 1,6 ug/g de naloxono.

La Figura 10, gráfico de la izquierda, muestra las medias R_2 para los distintos grupos. El test de rango múltiple de Duncan, reveló diferencia significativa entre grupo **Mf 70** y cualquiera de los otros 3 grupos ($p < 0,005$; nivel de protección = 98,5 %). Comparando estos 3 grupos, **AD, Nx 1,6** y **Mf 70 + Nx 1,6**, entre sí, no se observaron diferencias significativas, aun a $p < 0,05$ cuando el nivel de protección fue bajado a 85,7 %. El test de Duncan sobre los valores de % DR también mostró diferencias significativas entre el grupo **Mf 70** y los restantes grupos ($p < 0,005$). No hubo diferencias

intergrupales sinificativas para **AD** vs. **Nx 1,6** y **Salina** vs. **Mf 70 + Nx 1,6**, pero sí surgieron diferencias significativas entre **Nx 1,6** y **Mf 70 + Nx 1,6.** A pesar de que este resultado es inesperado y difícil de interpretar, no afecta las conclusiones que se desprenden de estos resultados.

Corroborando los resultados del Experimento 1, una dosis de 70 ug/g de morfina, que es un poco mayor que el valor de DE-50 calculado para 30 min. de intervalo inyección-E_2, provoca una caída en el nivel de respuesta de 53,5 %, pero dicha inhibición no ocurre cuando esta misma dosis es administrada junto a 1,6 ug/g de naloxono. Por otro lado, tal dosis de naloxono por sí sola no produce ningún efecto. Por lo tanto, la morfina parece actuar a través de receptores opiáceos al reducir el nivel de respuesta de escape del cangrejo en reacción a una sombra pasante. Estos resultados estan de acuerdo con los observados sobre la respuesta defensiva ante un estímulo doloroso (Capitulo 1.), utilizando el mismo intervalo de tiempo y la misma dosis de naloxono.

En resumen, un opiáceo exógenoreduce el nivel de respuesta a un estímulo de peligro. Se consideran tres explicaciones posibles para dar cuenta de esta acción de la morfina sobre la respuesta de escape del cangrejo:

Primero, el efecto es debido a un bloqueo o depresión de las vías aferentes, esto es, el cangrejo sufre una reducción transitoria en su habilidad para discriminar figuras y movimientos.

Segundo, el efecto es debido a un bloqueo o depresión de las vías eferentes, es decir, el cangrejo sufre una reducción transitoria de su capacidad motora.

Tercero, el efecto se produce a nivel central de una manera

análoga a la acción de agonistas opiáceos sobre estímulos dolorosos. Se postula una reducción en la percepción del peligro que el estímulo normalmente señaliza, es decir, el cangrejo sufre una interferencia en el procesamiento de la información que hace que se perciba a la sombra pasante como menos peligrosa.

En una serie de trabajos realizados en nuestro laboratorio (Tomsic y Maldonado, 1989) se estudió el efecto de la morfina y el naloxono sobre la reacción optocinética del cangrejo al movimiento de un cilindro con bandas blancas y negras. Se administraron 6 dosis de morfina, desde 20 hasta 120 ug/g, y al testear 30 min. después de la inyección, ninguna dosis pareció afectar la amplitud ni la frecuencia del nistagmus de los pedúnculos oculares. En artrópodos, el nistagmus optocinético ha sido muy utilizado como medida de la agudeza visual, por lo tanto, los autores concluyeron que estas dosis no parecen disminuir la habilidad del cangrejo para detectar figuras, movimientos o contrastes. En otro experimento, se fijaron los pedúnculos oculares y el animal podía moverse libremente, midiéndose de este modo la reacción optocinética a través la rotación de su cuerpo siguiendo el movimiento del cilindro. Esta habilidad motora no se vio afectada con dosis tan altas como 100 ug/g de morfina. Por el contrario, una dosis de 80 ug/g parece mostrar un efecto excitatorio, hecho que está de acuerdo con resultados similares obtenidos en otros artrópodos (Kavaliers et al., 1987).

Teniendo en cuenta estos hechos, las dos primeras explicaciones referidas a una acción sobre las áreas periféricas resultan difíciles de sostener, mientras que la tercera explicación parece la más viable. De acuerdo con ello, el efecto de la morfina podría ser explicado en términos de un debilitamiento o disrupción de la asociación entre un estímulo (sombra pasante) y su significado de

peligro (aproximación de un predador).

CONCLUSION

La acción inhibidora de la morfina sobre una respuesta defensiva de *Chasmagnathus* se presenta no sólo cuando ella es desencadenada por un estímulo nociceptivo (Capítulo 1) sino también cuando es producida por un estímulo de peligro. La reversibilidad del efecto por naloxono, indica que en ambos casos la acción de la droga es mediada por receptores opiáceos.

CAPITULO 3

ACCION OPIACEA SOBRE LA RESPUESTA A UN ESTIMULO DE PELIGRO REITERADO

Efecto del pretratamiento con naloxona y morfina sobre la habituación de corto término a un estímulo de peligro

INTRODUCCION

La presentación iterativa de la figura pasante provoca en *Chasmagnathus* un decremento de la respuesta de escape. Dicha caída en la respuesta cumple con la mayoría de los criterios paramétricos de la habituación (Thompson y Spencer, 1966), como ha sido demostrado previamente en este laboratorio (Brunner y Maldonado, 1988). En las figura 11 y 12, curvas de cuadrados blancos, se presenta dos casos típicos de habituación de corto término de la respuesta de escape de *Chasmagnathus* ante la estimulación repetida con un estímulo de peligro (una figura pasante). Normalmente, la curva presenta dos partes bien diferenciadas: una primera, denominada *porción de caída,* donde se pr oduce aproximadamente el 80% de la caída total; y una segunda, denominada *porción asintótica* en la que la caída es muy pequeña y la respuesta se mantiene en un nivel relativamente bajo.

El propósito de los siguientes experimentos fue explorar el efecto que el naloxono y la morfina tienen sobre la habituación, con la intención de poner en evidencia la posible acción de opiáceos endógenos en dicho proceso.

MATERIALES Y METODOS.

Animales.

Idem Capítulo 1.

Dispositivo experimental.

Idem Capítulo 2.

Procedimiento.

Se llevaban los animales desde la sala de mantenimiento a la sala experimental. Después de 30 minutos de adaptación recibían una inyección de 100 ul y pasados 15 o 30 minutos, según el experimento, comenzaba la serie de ensayos. Cada ensayo consistía en dos ciclos de pasaje de la figura con una duración total de 9 seg. durante el cual se registraba la actividad del animal. El intervalo entre ensayos fue de 3 minutos.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

Experimento 1.

Efecto del naloxono sobre una sesión de habituación de 15 ensayos.

El propósito de este experimento era establecer el efecto de diversas dosis de naloxono-HCl (Sigma Chemical) sobre la habituación de la respuesta. Se formaron 8 grupos experimentales: Cuarenta animales recibían 0,8 ug/g de naloxono; 47 animales, 2,4 ug/g; 35 animales. 3,2 ug/g; y 40 animales, 6,4 ug/g. Cada uno de estos grupos experimentales eran corridos simultáneamente con un grupo control con el mismo número de animales. Un ANOVA mixto de medidas repetidas (2x15) realizado sobre estos datos para cada par de grupos

experimental y control, reveló diferencias significativas del factor ensayos en todos los casos (por ejemplo para 3,2 ug/g, $F(14, 952) = 58,1$; $p < 0.001$). Para las dosis de 0,8 y 2,4 ug/g no se observó diferencia significativa para droga vs control, ni interacción entre el factor droga y los ensayos. Sin embargo, para la dosis de 3,2 ug/g, el el efecto del factor droga y la interacción resultaron ser significativos [$F(1, 68) = 4,2$, $p < 0,05$; y $F(14, 952) = 3,2$, $p < 0,001$; respectivamente]). Con respecto a la dosis de 6,4 ug/g, no hubo efecto del factor droga y la interacción se encuentra en el límite de la significancia ($F(14, 1092) = 1,7$; $p = 0,05$). De modo que sólo en la dosis intermedia de 3,2 ug/g se vio un claro efecto de la droga sobre la habituación.

Este hecho no está de acuerdo con la relación ideal entre la dosis y la magnitud de respuesta esperada segun la farmacología clásica, esto es, una función hiperbólica. Sin embargo, la literatura científica muestra muchos ejemplos de curvas dosis-respuesta en forma de "U" desde el trabajo de Yerkes y Dodson (1908), incluyendo varios experimentos sobre el papel de los opiáceos en el aprendizaje y la memoria (por ejemplo, Martínez y Rigter, 1980). Day (1979) ha propuesto como explicación una fatiga en los receptores cuando se usan dosis mayores que las óptimas, mientras que Muller et al. (1982) han sugerido la existencia de procesos opuestos que tienen lugar en las porciones ascendentes y descendentes de la curva.

La Figura 11 ilustra los resultados para el grupo experimental inyectado con 3,2 ug/g de naloxono y su respectivo control. Después de los primeros ensayos los animales experimentales fueron más

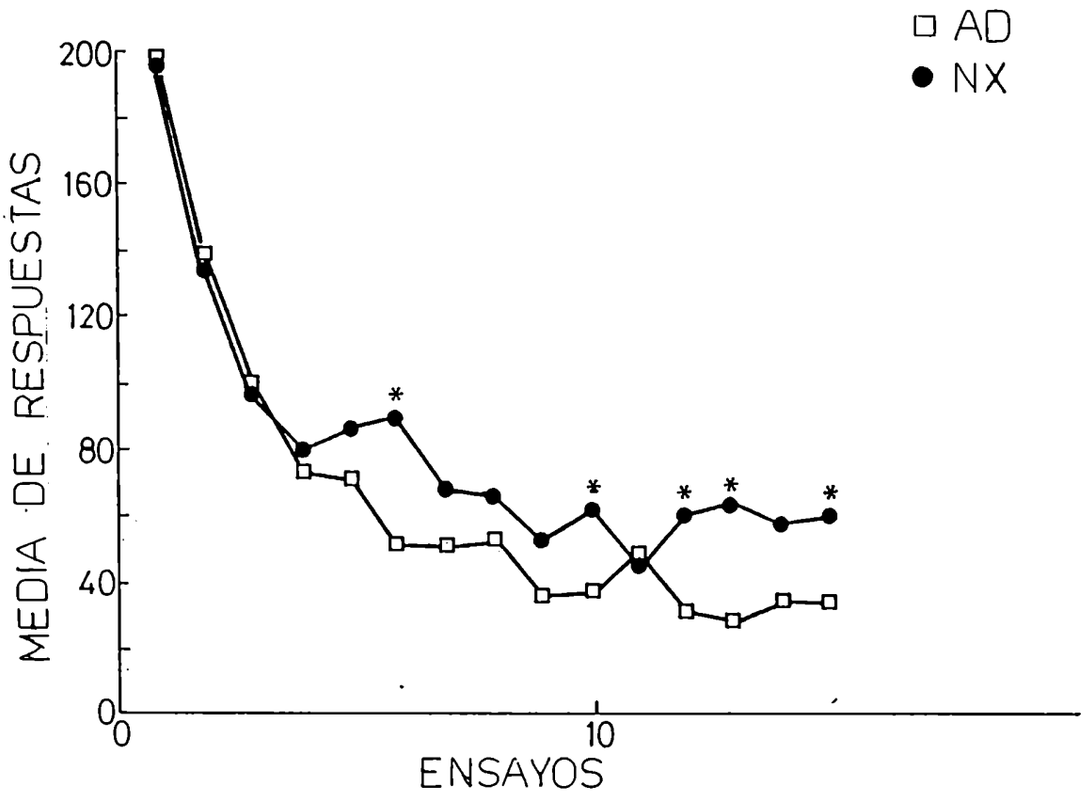


FIGURA 11. Efecto de una inyección, 15 min. antes del primer ensayo, de 3.2 ug/g de naloxono sobre el nivel de respuesta a 15 ensayos consecutivos de la sombra pasante. Cuadrados blancos: grupo control; círculos negros: grupo tratados con naloxono. n= 35 por grupo. (*)= diferencias significativas entre los grupos en el ensayo correspondiente (p < 0,05).

reactivos que los controles. Se realizaron comparaciones entre ambos grupos para cada ensayo, utilizando el término de error de la interacción y ajustando el nivel de significación alfa para mantener la posibilidad de error de tipo 1 en una probabilidad p < 0,05. El grupo experimental tuvo una respuesta significativamente más alta que el grupo control en los ensayos 6, 10, 12, 13 y 15.

Este análisis sugiere que una dosis de 3,2 ug/g de naloxono reduce la caída de la respuesta durante la sesión de entrenamiento, es decir, produce una reducción en la tasa de habituación de la respuesta, y, además, dicha acción surge después de los primeros ensayos.

Podría interpretarse, sin embargo, que el efecto retardado del naloxono se produce simplemente por el hecho de alcanzar su máxima acción a intervalos mayores de 27 min., es decir, después del 5to. ensayo. Para analizar la posibilidad de esta alternativa se realizó el siguiente experimento. Setenta animales fueron distribuidos al azar en 2 grupos de 35 animales cada uno. Ambos grupos recibieron una inyección 51 min. antes de una sesión consistente en tres ensayos con la sombra pasante, al grupo experimental se le administró 3,2 ug/g de naloxono y al grupo control agua destilada. Los datos obtenidos fueron comparados con los primeros ensayos de los grupos experimental y control, inyectados 15 min. antes, provenientes del experimento anterior. Un ANOVA (4x3) realizado sobre estos datos mostró un efecto significativo del factor ensayos ($F(2, 272) = 109,4$; $p < 0,001$) pero no se obtuvieron diferencias entre los grupos ni interacción entre ambos factores. De ello se desprende que el nivel de respuesta en los tres ensayos del grupo inyectado 51 minutos antes, fue similar al nivel de respuesta obtenido en los primeros tres ensayos del grupo inyectado 15 min. antes. Porlo tanto, el efecto del naloxono después del 5to. ensayo no puede ser explicado en términos de un retraso en el establecimiento del efecto máximo de la droga.

Otra alternativa puede ser considerada para explicar estos resultados: el naloxono afecta la caída de la respuesta desde el primer ensayo, pero dicho efecto no puede ser observado por alcanzarse un límite físico que no permite a los animales desarrollar

un nivel mayor de respuesta en el período de registro de 9 segundos. Para poner a prueba esta alternativa, 35 cangrejos recibieron, 15 min. después de una inyección de agua destilada, un ensayo combinado: simultáneamente al pasaje de la sombra se aplicaron 2 choques eléctricos de 50 Hz, 16 Volt., 0,2 seg., en el 1er. y en el 5to. segundo. Otros 35 cangrejos recibieron simultáneamente un ensayo simple consistente en la sombra pasante 15 minutos después de una inyección de 3,2 ug/g de naloxono. La media de los valores de respuesta del primer grupo (620,0; E.S.= 38,0) fue significativamente mayor que la de este último grupo (391,8; E.S.= 29,6), ($t(68) = 4,7$; $p < 0,001$). Se descarta de este modo un posible "efecto techo" en el nivel de respuesta durante los primeros ensayos.

Experimento 2.

Efecto del naloxono sobre una sesión de habituación de 30 ensayos.

Este experimento fue realizado para estudiar la persistencia del efecto de 3,2 ug/g de naloxono en una sesión de habituación más larga que la anterior, y al mismo tiempo, confirmar los resultados del experimento anterior usando animales provenientes de otra época de captura.

Cincuenta y dos animales fueron ditribuidos al azar en 2 grupos de 26 cangrejos cada uno: El grupo experimental fue inyectado con 3,2 ug/g y el grupo control con agua destilada. Quince minutos después recibieron 30 ensayos.

Los resultados se muestran en la Figura 12. Ambas curvas comienzan con el mismo nivel de respuesta; posteriormente el grupo experimental presenta un nivel de respuesta superior al control hasta

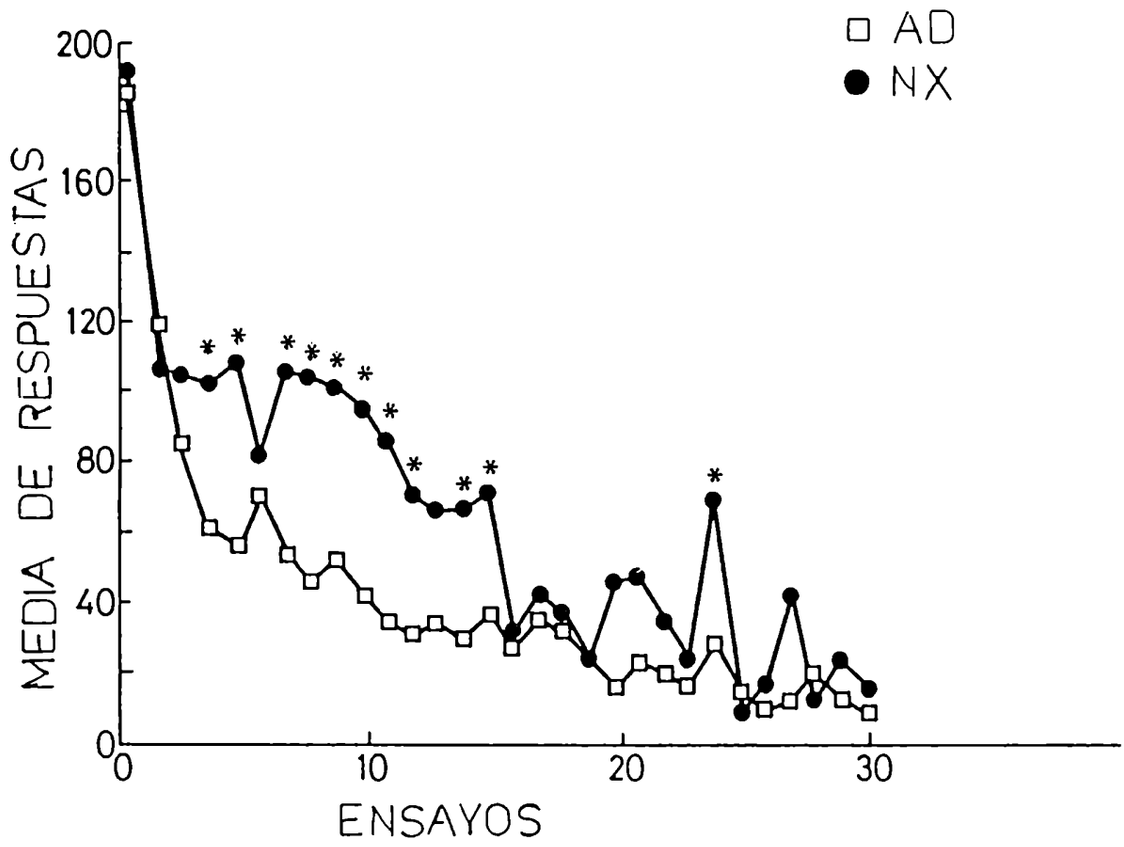


FIGURA 12. Efecto de una inyección, 15 min. antes del primer ensayo, de 3,2 ug/g de naloxono sobre el nivel de respuesta a 30 ensayos consecutivos de la sombra pasante. Símbolos como en la figura 11. n= 26 por grupo.

el ensayo 15, a partir del cual, las diferencias tienden a desaparecer.

Un ANOVA mixto de medidas repetidas (2x30) indicó que el efecto de los ensayos es significativo ($F(29, 1450) = 22,2$; $p < 0,005$). También resultó significativa la acción de la droga ($F(1, 50) = 4,5$; $p < 0,05$) y la interacción entre los dos factores ($F(29, 1450) = 1,8$; $p <$

0,005). Al igual que para el experimento anterior, se realizaron comparaciones intergrupales para cada ensayo. Los niveles de respuesta son similares en los primeros tres ensayos, mientras que en los ensayos 4, 5, 7, 12 y 14 el grupo experimental respondió significativamente más que el control. En los últimos 15 ensayos sólo aparecen diferencias significativas en el ensayo 24.

Dos conclusiones pueden extraerse de este experimento. Primero, una dosis de 3,2 ug/g de naloxono reduce la caída de la respuesta durante el proceso de habituación, surgiendo dicho efecto después de los primeros ensayos, un resultado que está totalmente de acuerdo con el obtenido en el experimento 1 con animales provenientes de otra época de captura. Segundo, el efecto del naloxono desaparece después del ensayo 15, aproximadamente 1 hora después de la inyección. La vida media del naloxono estimada para vertebrados está comprendida entre 60 y 90 min. (Tallarida et al., 1978). No existen estudios farmacocinéticos sobre la acción del naloxono en crustáceos, pero dado que la velocidad de eliminación de la morfina en esta especie es mucho mayor que para vertebrados (como se vio en el Capítulo 1), resulta razonable suponer que la vida media del naloxono sea igual o menor que la observada para vertebrados. De modo que la desaparición del efecto de la droga en los últimos 15 ensayos es atribuible a la extinción de la acción del naloxono a través de los procesos de eliminación.

Davis y File (1984), han propuesto un marco teórico para los estudios farmacológicos de los mecanismos que subyacen a los cambios de las respuestas durante un proceso de repetición de estímulos. Esta línea de razonamiento predice que la administración de una droga puede producir un cambio en la pendiente de la curva de caída de la respuesta únicamente si afecta a la habituación

intrínseca, mientras que produce un corrimiento paralelo de la curva en el caso de afectar sistemas que modulan el nivel de respuesta. De esta manera, de acuerdo con los hallazgos presentados en esta sección, el naloxono estaría afectando la habituación intrínseca, enlenteciendo la caída de la respuesta atribuible a una interferencia con la depresión sináptica responsable de dicho proceso (Kandel, 1978; Wine y Krasne, 1982).

Sin embargo, es posible interpretar estos resultados postulando una inteferencia del naloxono con una acción opiácea endógena que se desencadenaría durante la habituación corta. En efecto, después de los primeros ensayos con la señal de peligro, un mecanismo opiáceo endogeno sería activado y el naloxono, al bloquear este mecanismo, incrementaría la reacción a los estímulos subsiguientes. De este modo, debido al retraso en el desencadenamiento del mecanismo opiáceo, ocurriría un cambio en la pendiente de la curva, a pesar de que el naloxono estaría afectando un sistema modulador.

Los experimentos de este capítulo son los primeros resultados aportados en invertebrados sobre la acción de un antagonista opiáceo en un proceso de habituación; mientras que en vertebrados, Izquierdo (1980) ha encontrado que el pretratamiento con naloxono afecta la habituación entre sesiones, estudiando este fenómeno en ratas.

Experimento 3

Efecto de la morfina sobre una sesión de habituación de 15 ensayos.

El propósito de este experimento fue establecer el efecto del pretratamiento con morfina sobre la habituación de la respuesta.

Cincuenta animales fueren distribuidos al azar en dos grupos de

25 cangrejos cada uno. El grupo experimental fue inyectado con 100 ug/g de morfina y el grupo control con agua destilada. Treinta minutos después recibieron 15 ensayos. La dosis y el intervalo entre la inyección y el primer ensayo de la sesión de entrenamiento fueron establecidos teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio sobre la respuesta optocinética del cangrejo (Tomsic y Maldonado, 1990) mencionados en el Capitulo 2.

Un ANOVA mixto de medidas repetidas realizado sobre estos resultados indica un efecto significativo de los ensayos ($F(14, 672) = 34,25$; $p < 0,005$) y de la droga ($F(1, 48) = 10,0$; $p < 0,01$).

Para determinar si la morfina produjo un desplazamiento paralelo de la curva, el análisis de la interacción se limitó a la porción de caída de la misma, puesto que el efecto de la droga se desvanece en la porción asintótica debido al efecto de piso. Un ANOVA mixto de medidas repetidas realizado sobre las respuesta a los primeros 6 ensayos (2x6) indicó un efecto significativo de los ensayos ($F(5, 240) = 35.9$; $p < 0,005$) y de la droga ($F(1, 48) = 14,0$; $p < 0,005$). Por el contrario, la interacción entre ambos factores no resultó significativa ($F(5, 240) = 0,73$). Los resultados se muestran en la figura 13.

De acuerdo con el modelo propuesto por Davis y File (1984), este corrimiento paralelo en la curva de la respuesta en función de los ensayos es indicativo de una acción moduladora de la morfina. De este modo, la habituación intrínseca, y por lo tanto, la tasa de habituación dentro de la sesión no resultarían alteradas.

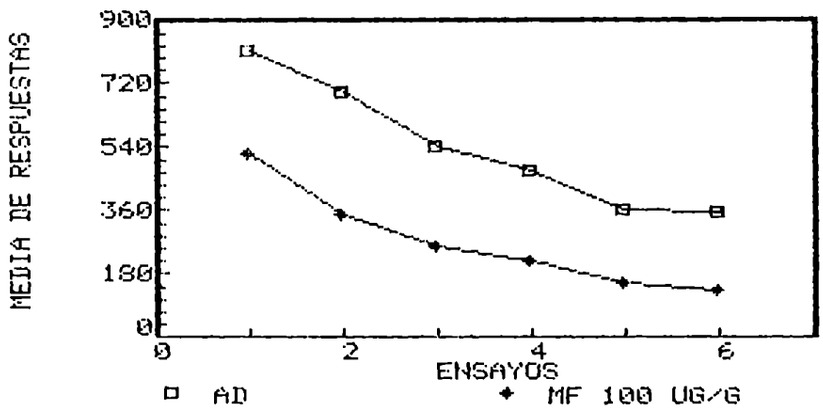


FIGURA 13. Efecto del pretratamiento con morfina sobre la habituación de corto término. Seis primeros ensayos de una sesión de 15 ensayos de presentación de la figura pasante. Inyección: 30 minutos antes de la sesión. Dosis: 100 ug/g. n = 25 animales por grupo. La diferencia en los niveles de respuesta con respecto a los de la figura 12 se debió a un aumento de la ganancia del dispositivo de registro.

CONCLUSION

El pretratamiento con naloxono produce una desaceleración de la caída de la habituación de corto término, mientras que el pretratamiento con morfina provoca un desplazamiento paralelo de la curva hacia valores menores. Del conjunto de estos resultados surge la hipótesis de que durante el proceso de habituación de corto término actúa un mecanismo opiáceo endógeno, y que dicho mecanismo contribuye a acelerar el efecto decremental de la respuesta debido a la estimulación repetida.

CAPITULO 4

PROCESOS CONTINGENTES A LA HABITUACION DE CORTO TERMINO Y SUS EFECTOS INESPECIFICOS.

INTRODUCCION

En un trabajo previamente realizado en este laboratorio (Lozada, Romano y Maldonado, 1990a) se comprobó que la habituación de la respuesta a la presentación reiterada de una figura pasante, es retenida después de un intervalo de 24 hs. Efectivamente, un entrenamiento de 15 ensayos con este estímulo (3 minutos de intervalo interestímulo) es suficiente para producir en la sesión de test un decremento de la respuesta y un aumento significativo de la pendiente de caída de la misma. Solo 48 hs después del entrenamiento desaparece la retención de la respuesta habituada (Romano, Lozada y Maldonado, 1990b).

Sin embargo, cuando se modifica en el test la relación espacial entre el movimiento del estímulo y el animal, con respecto a la del entrenamiento (una figura de desplazamiento vertical, en lugar de una de desplazamiento horizontal, o viceversa) no se observa la retención a 24 hs. Es decir, sólo los animales entrenados y testeados con el mismo estímulo presentan retención de la habituación de la respuesta (habituación de largo término), mostrando así **estímulo especificidad**.

Trabajos recientes (Rakitin y Maldonado, 1991) han demostrado que la presentación reiterada de un estímulo eléctrico suave en los apéndices locomotores (15 ensayos, 3 min intervalo interensayo), produce una caída en la respuesta de escape que cumple con la mayoría de los criterios paramétricos de la habituación. La respuesta habituada persiste por 24 horas y se demuestra **estímulo**

especificidad, usando como estímulos el choque eléctrico y la sombra movida horizontalmente (Romano, Lozada y Maldonado, 1990b). Es decir, los animales entrenados con el estímulo visual (sombra horizontal) retienen la respuesta habituada cuando se les presenta en el test el mismo estímulo, pero no muestran retención al ser testeados con el choque eléctrico. Análogamente, en aquellos animales que recibieron choque eléctrico en el entrenamiento se observa retención al ser testeados con este estímulo, y no presentan retención al utilizar la sombra horizontal.

Evidencias provenientes de otro trabajo (Valeggia, Fernández Duque y Maldonado, 1989) sugieren, sin embargo, que una sesión de habituación a uno de estos estímulos (sombra horizontal) tiene un efecto atenuante sobre la reactividad a el otro estímuo (choque eléctrico) cuando éste es presentado inmediatamente después.

Es razonable suponer, entonces, la presencia de un fenómeno que se superpone al de la especificidad de estímulos durante un cierto período de tiempo después del entrenamiento. El propósito de los experimentos del presente capítulo fue poner a prueba la viabilidad de esta hipótesis y elucidar los mecanismos que dan cuenta del fenómeno.

MATERIALES Y METODOS.

Animales.

Idem Capítulo 1.

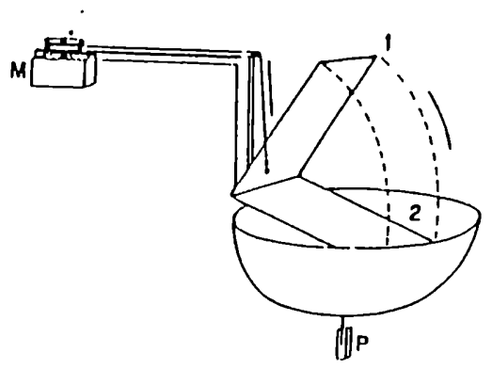


FIGURA 14. Representación esquemática de la rotación de la figura de desplazamiento vertical (**V**) sobre el actómetro desde la posición **1** a **2** y nuevamente a **1**. **M**: motor; **P**: piezoeléctrico.

Dispositivo experimental.

En esta sección se modificó el aparato utilizado en los experimentos anteriores, de modo tal que podía reemplazarse la figura de desplazamiento horizontal por una figura de las mismas dimensiones pero de desplazamiento vertical: primeramente se desplazaba hacia abajo, aproximándose al animal aunque sin tocarlo; y luego se desplazaba hacia arriba, volviendo a la posición inicial (Figura 14). Debido a este nuevo dispositivo no se usó la pantalla translúcida (PT, Figura 7, Capitulo 2).

Procedimiento.

Se utilizaron 3 tipos diferentes de ensayos, todos con una duración de 9 segundos:

El **ensayo con figura horizontal** consistía en el desplazamiento de la figura en el plano horizontal sobre el actómetro desde la

posición inicial **1** hasta la posición **2** y luego volviendo a la posición **1** (Figura 8, Capítulo 2); este desplazamiento tenía una duración de 4,5 seg. y se repetía una segunda vez.

El **ensayo con figura vertical** consistía en 2 desplazamientos sucesivos de la figura vertical, donde cada desplazamiento, tenía una duración de 4,5 seg. e implicaba el movimiento hacia abajo y hacia arriba: posición **1** - posición **2** - posición 1 (Figura 14).

El **ensayo con choque eléctrico** consistía en 2 estimulaciones de 6 voltios, AC-50 hertzios, 0,2 segundos, uno en el 1er. segundo y otro en el 5to. segundo.

A lo largo de este Capítulo, **H** indica una estimulación con la figura de desplazamiento horizontal, **V** indica una estimulación con la figura de desplazamiento vertical y E indica una estimulación eléctrica.

Una sesión incluía 3 o 15 ensayos, con un intervalo inter-ensayo de 180 seg. a excepción del Experimento 4 donde se corrieron grupos sin intervalo entre ensayos. La mayoría de los experimentos incluyeron 2 sesiones, una sesión de entrenamiento y una de testeo, con distintos períodos inter-ensayos (0, 30, 45 y 90 min.).

El día anterior al del experimento los animales fueron llevados desde la sala de mantenimiento al la sala de experimentación, donde se los ubicó individualmente en recipientes plásticos con agua del lugar de captura y aislados de cualquier perturbación. Al día siguiente cada cangrejo fue dispuesto en un actómetro para la sesión de entrenamiento, y si el experimento incluía 2 sesiones con un intervalo entre ambas mayor que 30 min., los animales eran ubicados nuevamente en los recipientes individuales durante el período inter-sesión. Antes del primer ensayo de cada sesión los cangrejos permanecían 30 min. en el actómetro para adaptarse al aparato.

Experimento 1.

Método.

Se utilizaron los estímulos **H** y **V**, para las sesiones de entrenamiento y test, con un intervalo inter-sesión de 90 min., con el propósito de evaluar si la **estímulo especificidad** observada 24 hs. después de una sesión de habituación se veía alterada al testar dentro de un período de tiempo cercano al entrenamiento.

Ciento treinta animales se distribuyeron al azar en 6 grupos de 30 animales cada uno. El grupo **H-H** fue entrenado y testeado con **H**; el grupo **H-V**, entrenado con **H** y testeado con **V**; el grupo **V-V**, entrenado y testeado con **V**; el grupo **V-H**, entrenado con **V** y testeado con **H**; y los grupos control **C-H** y **C-V** fueron ubicados en los actómetros durante la sesión de entrenamiento sin recibir ninguna presentación del estímulo y testeados con **H** o **V**, respectivamente. El nivel de habituación de la respuesta inter-sesión de los grupos entrenados fue establecido comparando el nivel de respuesta durante el test con el correspondiente al control. De esta manera se controlaron posibles cambios de reactividad producidos en el intervalo inter-sesión.

Resultados y discusión.

En la parte inferior de la figura 15 se presentan los resultados de este experimento durante el testeo a 90 min, comparados con los obtenidos por Lozada, Romano y Maldonado (1990a) a las 24 hs. Un test de Dunnet sobre las medias de las sumas individuales de los

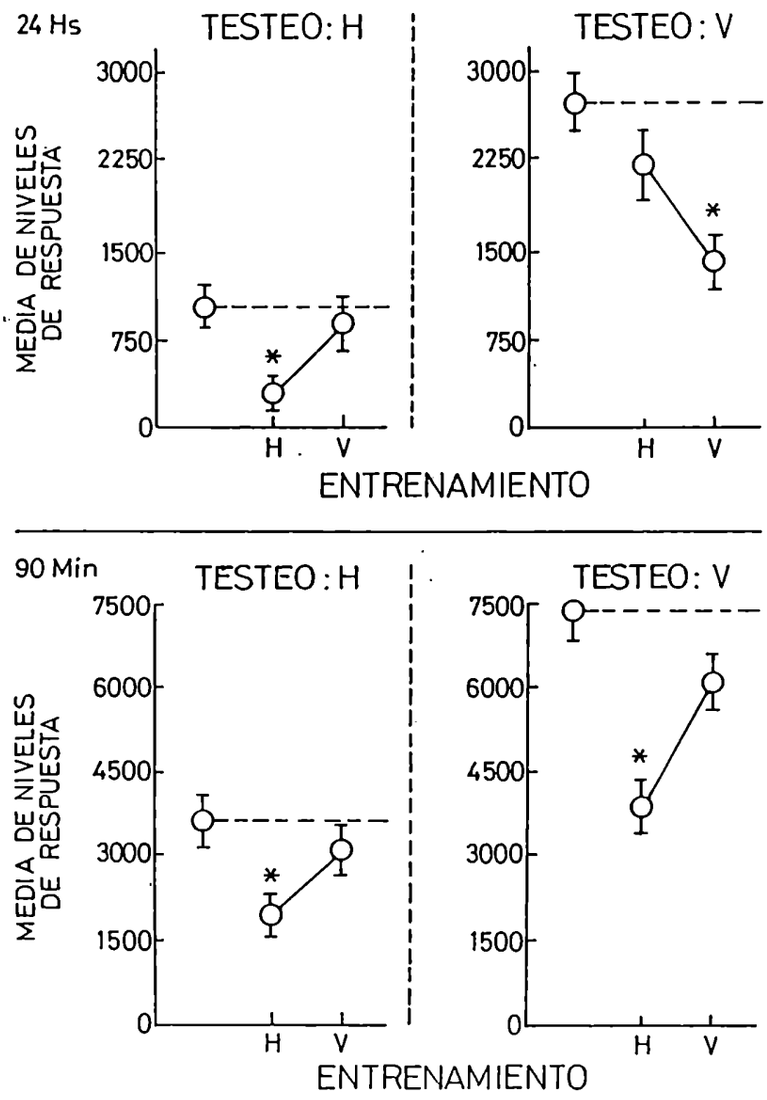


FIGURA 15. Retención de la respuesta habituada durante la sesión de test medida a través del promedio de la suma de las respuestas en los 15 ensayos de cada animal. **Gráficos de la izquierda**: grupos testeados con **H**. **Gráficos de la derecha**: grupos testeados con **V**. **Gráficos superiores**: grupos con un intervalo entre sesiones de 24 hs. (datos tomados de Lozada, Romano y Maldonado, 1990). **Gráficos inferiores**: grupos con un intervalo entre sesiones de 90 min. En cada gráfico, una línea de puntos indica la media de los valores de respuesta correspondiente al grupo control (los animales fueron ubicados en los actómetros durante la sesión de entrenamiento sin recibir ningun estímulo). (*): diferencias significativas entre un grupo entrenado y su respectivo control (test de Dunnet, $p < 0,05$).

niveles de respuesta en los 15 ensayos de testeo, demostró: a) que a las 24 hs. hubo diferencias significativas entre **H-H** y **C-H**, y entre **V-V** y **C-V** ($p < 0.01$); b) que a los 90 min se dio también una diferencia significativa para **H-H** vs **C-H** ($p < 0.01$), pero no para **V-V** vs **C-V** y sí para la comparación entre el grupo que fuera entrenado con **H** y testeado con **V**. En otras palabras, la **estímulo-especificidad** observada entre los estímulos **H** y **V** después de 24 hs. del entrenamiento, desaparece cuando el período inter-sesión es acortado a 90 min. Los animales entrenados con el estímulo **H** presentan un nivel de respuesta inferior al control aun cuando son testeados con el estímulo **V**, mientras que aquéllos entrenados con **V** muestran un nivel de respuesta similar a los controles, aun cuando son testeados con el mismo estímulo **V**.

De acuerdo con las hipótesis tradicionalmente aceptadas, estos resultados resultarían inesperados y difíciles de interpretar, ya que los animales entrenados con **V** muestran estar habituados a tal estímulo a las 24 hs. pero no a los 90 min., y aquéllos entrenados con **H** muestran especificidad a las 24 hs. pero no a los 90 min.

Una replicación de este experimento fue realizada usando el mismo diseño y el mismo número de animales por grupo, salvo que el período inter-sesión fue de 45 minutos, obteniendose resultados similares a los observados a 90 min.

Para clarificar estos resultados se diseñaron los siguientes experimentos.

Experimento 2.

Este experimento fue realizado para investigar si la disrupción de la **estímulo especificidad** que tiene lugar al acortar el período inter-sesión a tiempos próximos al entrenamiento, ocurre sólo para estímulos de peligro de naturaleza visual o si se da también ante estímulos de naturaleza diferente. Para ello se utilizó el estímulo eléctrico **E** en lugar del estímulo **V**. Salvo esta diferencia, el procedimiento y la formación de los grupos fueron los mismos que en el experimento 1, utilizando 90 min. y 24 hs. como períodos inter-sesión. Para cada período de inter-sesión se establecieron 6 grupos de 30 animales cada uno: el grupo **H-H** fue entrenado y testeado con **H**, el grupo **H-E** fue entrenado con **H** y testeado con **E**, el grupo **E-E** fue entrenado y testeado con **E**, el grupo **E-H** fue entrenado con **E** y testeado con **H** y los grupos controles **C-H** y **C-E** que no recibieron estímulo durante el entrenamiento y fueron testeados con **H** y con **E**, respectivamente.

Resultados y discusión.

La Figura 16 presenta los valores medios de respuesta para cada grupo en el test. Los grupos testeados a las 24 hs. (parte superior) muestran una clara especificidad de estímulo: el nivel de respuesta del grupo **H-H** fue significativamente inferior al del control **C-H** y, de igual manera, el del grupo **E-E** con respecto al control **C-E** (test de Dunnet, $p < 0,01$); mientras que no hubo diferencias significativas entre los grupos **H-E** y **E-H** cuando se los comparó con sus respectivos controles ($p < 0,05$). Un cuadro diferente fue observado cuando se testeó a 90 min. (parte inferior), ya que el grupo **E-H**, a diferencia del caso anterior, presenta diferencias significativas con

respecto al control **C-H** ($p < 0,01$).

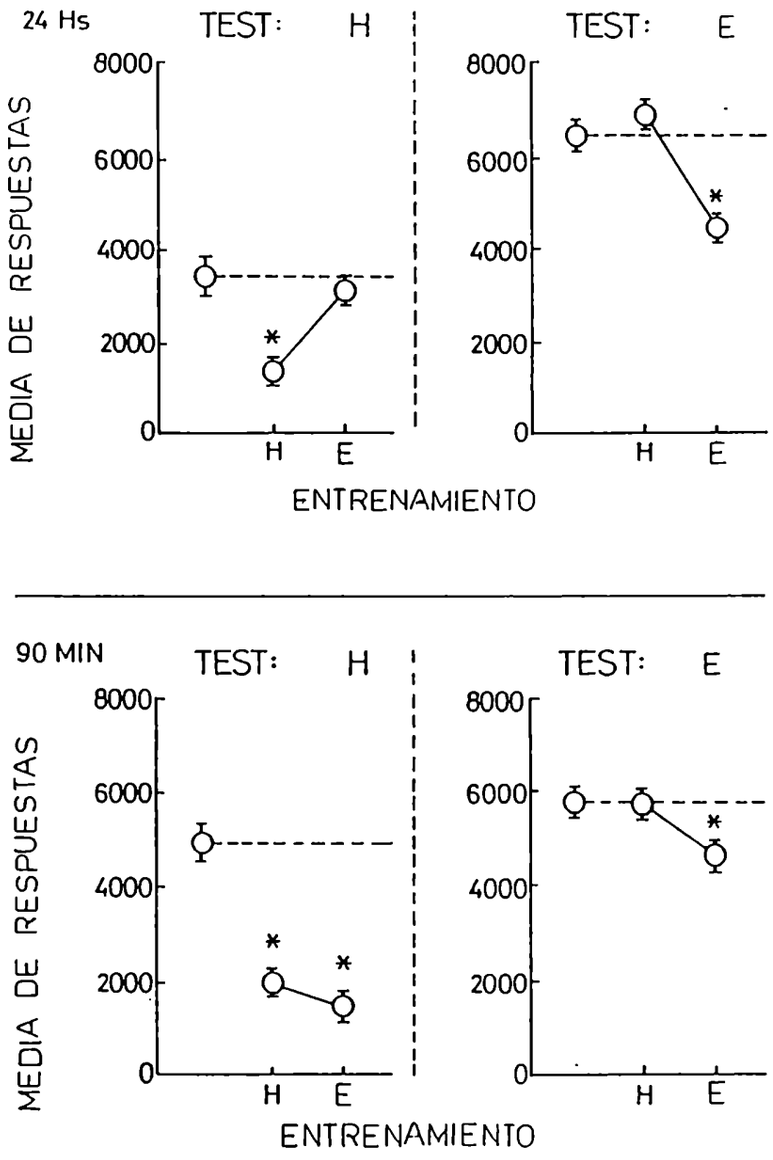


FIGURA 16. Retención de la respuesta habituada durante la sesión de test. **Gráficos de la izquierda:** grupos testeados con **H**. **Gráficos de la derecha:** grupos testeados con **E**. Otros símbolos igual que en la figura 15.

A partir de los resultados de los experimentos 1 y 2 se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1) El acortamiento del período inter-sesión de 24 hs a 90 min. afecta la especificidad de estímulo. Este fenómeno tiene lugar tanto en el caso de dos estímulos visuales que difieren entre sí en el modo de presentación, como en el caso de un estímulo visual y uno de naturaleza nociceptiva.

2) La alteración de la especificidad de estímulo depende, sin embargo, del estímulo con el que los animales fueron entrenados:

a. Los animales entrenados con **H** generalizan al estímulo **V** (presentan un nivel de respuesta inferior al respectivo control).

b. Los animales entrenados con **V** no muestran retención de la respuesta habituada.

c. Los animales entrenados con **E** generalizan al estímulo **H**.

De acuerdo a estas conclusiones, surge la siguiente hipótesis:

La estimulación reiterada pone en acción dos mecanismos distintos: 1) un proceso de aprendizaje mediante el cual el animal establece relaciones entre la presencia del estímulo y su consecuencia (ausencia del peligro que presagia o su inescapabilidad), y cuyo efecto es un decremento de la respuesta, **estímulo-específico** y de larga duración; 2) un proceso menos persistente que el anterior y estímulo inespecífico, dado que se pone de manifiesto aun cuando se usen distintos estímulos en el entrenamiento y el test. El primero es un **proceso de habituación**, mientras que el segundo, al que llamamos **proceso contingente** es contemporáneo pero ajeno a la adquisición de la respuesta habituada. La consecuencia del **proceso contingente**

depende de la naturaleza del estímulo: la reiteración con **H** o con E provoca un decremento de la respuesta mientras que la reiteración con **V** tiene efecto incremental.

Los siguientes experimentos fueron diseñados para testear la viabilidad de esta hipótesis.

Experimento 3.

La intención de este experimento fue estudiar el efecto estímulo inespecífico de cada uno de estos 3 estímulos al entrenar con 2 de ellos y comparar sus efectos sobre el tercer estímulo.

Experimento 3a.

Método.

Una sesión de entrenamiento de 15 ensayos fue seguida, sin intervalo, por una sesión de test de 3 ensayos. Se quiso saber qué acción produce el entrenamiento con uno de los estímulos sobre el test realizado con el otro. Noventa animales se distribuyeron en 3 grupos de 30 cangrejos cada uno: El grupo **H15-E**, entrenado con **H** y testeado con E; el grupo **V15-E**, entrenado con **V** y testeado con E y el grupo control **C-E**, sin estimulación durante el entrenamiento y testeado con E.

Resultados y discusión.

La Figura 17 presenta, para cada grupo, los valores medios de la

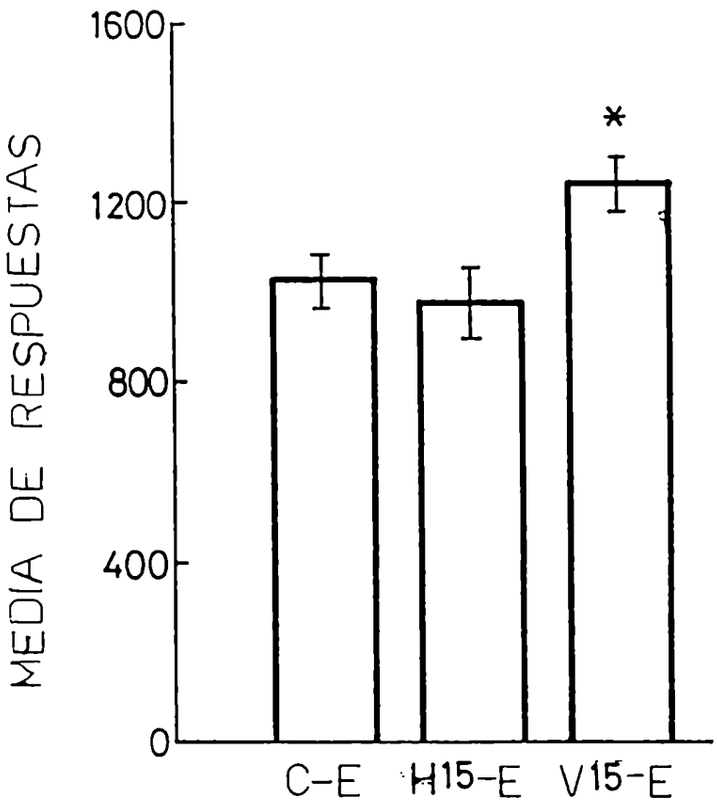


FIGURA 17. Efecto de una sesión de entrenamiento de 15 ensayos con **H** o **V** sobre la reactividad a una estimulación subsecuente con E medido a través del promedio de la suma de las respuestas en los 3 ensayos del test para cada animal. Grupo control **C- E**: animales ubicados en los actómetros durante la sesión de entrenamiento sin recibir estimulación y luego testeados con **E**. Grupo **H15-E**: animales entrenados con **H** y testeados con **E**. Grupo **V15-E**: animales entrenados con **V** y testeados con E. (*) = diferencias significativas con respecto al grupo control (test de Dunnet, $p < 0,05$).

suma de las respuestas de cada animal a los 3 ensayos del test. Se compararon los grupos que recibieron entrenamiento con el control, obteniéndose los siguientes resultados. El grupo **V15-E** presentó un

nivel de respuesta significativamente superior al control **C-E** (test de Dunnet, $p < 0,01$). El grupo **H15-E** no presentó diferencias significativas con el control.

Por lo tanto, la estimulación reiterada con el estímulo **V** aumenta la respuesta a la estimulación eléctrica **E** aplicada inmediatamente después del 15to. ensayo. Este resultado está de acuerdo con la hipótesis. Sin embargo, una sesión de 15 ensayos con **H** no produce una reducción en la respuesta al estímulo **E**.

Experimento 3b.

Método.

El único cambio en el diseño con respecto al experimento 3a fue la aplicación de 30 ensayos en la sesión de entrenamiento en lugar de 15. Noventa animales constituyeron 3 grupos de 30 cada uno: **H30-E**, **V30-E** y **C-E** (grupo control).

Resultados y discusión.

La Figura 18 muestra los resultados correspondientes a la sesión de testeo con el estímulo **E** donde se observa que la media de los valores de respuesta del grupo **H30-E** es significativamente inferior a la del control **C-E** (test de Dunnet, $p < 0,01$), mientras que la media del grupo **V30-E** no difiere de la del control.

En resumen:

a) Es necesario presentar 30 veces el estímulo **H** a los animales para provocar una reducción en el nivel de respuesta en la presentación subsiguiente del estímulo **E**. Este resultado está de acuerdo con otro previamente obtenido en el Laboratorio (Valeggia, Fernández Duque y Maldonado, 1989).

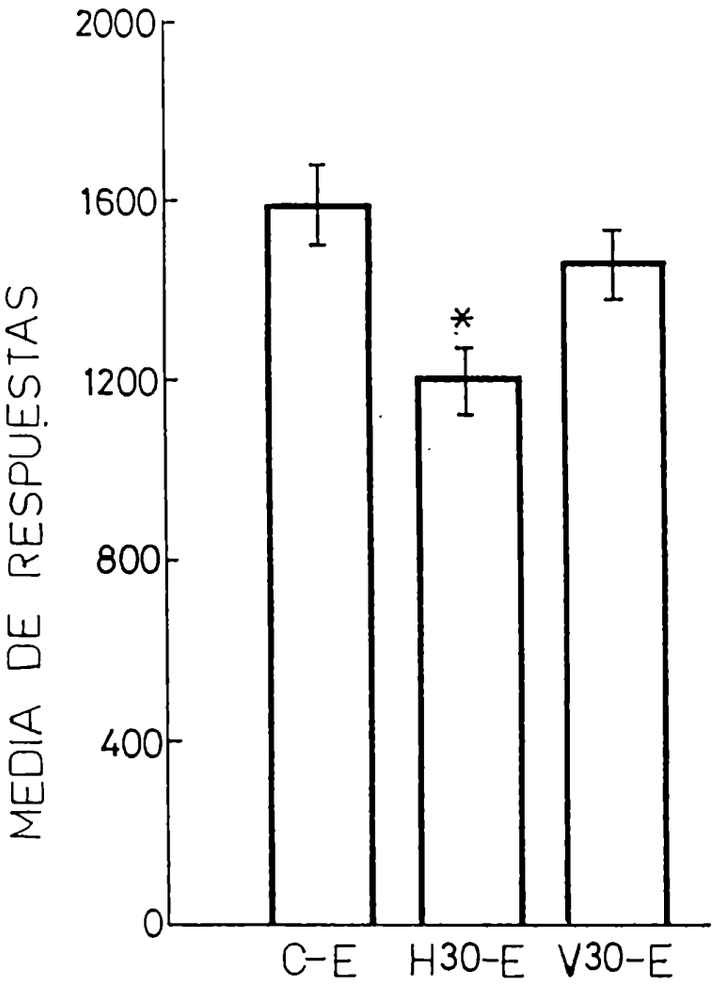


FIGURA 18. Efecto de una sesión de entrenamiento de 30 ensayos con **H** o **V** sobre la reactividad a una estimulación subsecuente con **E**. Los grupos son como en la figura 17, salvo que recibieron 30 ensayos en el entrenamiento.

b) El efecto incremental de la respuesta al estímulo **E**, que produce un entrenamiento con el estímulo **V**, parece desaparecer cuando se aumenta el número de estímulos presentados.

Experimento 3c.

Método

El diseño experimental fue similar a los anteriores, utilizando **V** o **E** en el entrenamiento, **H** en el test, con el agregado de 30 ensayos de **V** en el entrenamiento. Ciento sesenta cangrejos fuero distribuidos en 4 grupos de 40 animales cada uno: **V15-H**, **V30-H**, **E15-H** y **C-H.**

Resultados y discusión.

Los resultados se presentan en la Figura 19. Quince ensayos con **V** producen un incremento de la respuesta al estímulo **H** (**V15-H** vs. **C-E**, test de Dunnet $p < 0,01$), pero este efecto desaparece al presentar 30 ensayos. Por otro lado, la respuesta a **H** se reduce notablemente cuando dicha presentación es precedida por 15 ensayos con **E** (**E15-H** vs. **C-E**, $p < 0,005$).

En estos resultados se puede observar el efecto decremental estímulo inespecífico **E** sobre **H**, en acuerdo con la hipótesis. También se observa que el incremento de la respuesta en el test con **H**, producido por la presentación reiterada de **V**, desaparece cuando se aumenta en el entrenamiento el numero de presentaciones de este estímulo.

Experimento 3d.

Método.

El diseño experimental fue similar a los anteriores, utilizando en este caso el estímulo **V** como test. Ciento veinte cangrejos fueron distribuidos en 3 grupos de 40 animales cada uno: **H15-V**, **E15-V** y **C-V.**

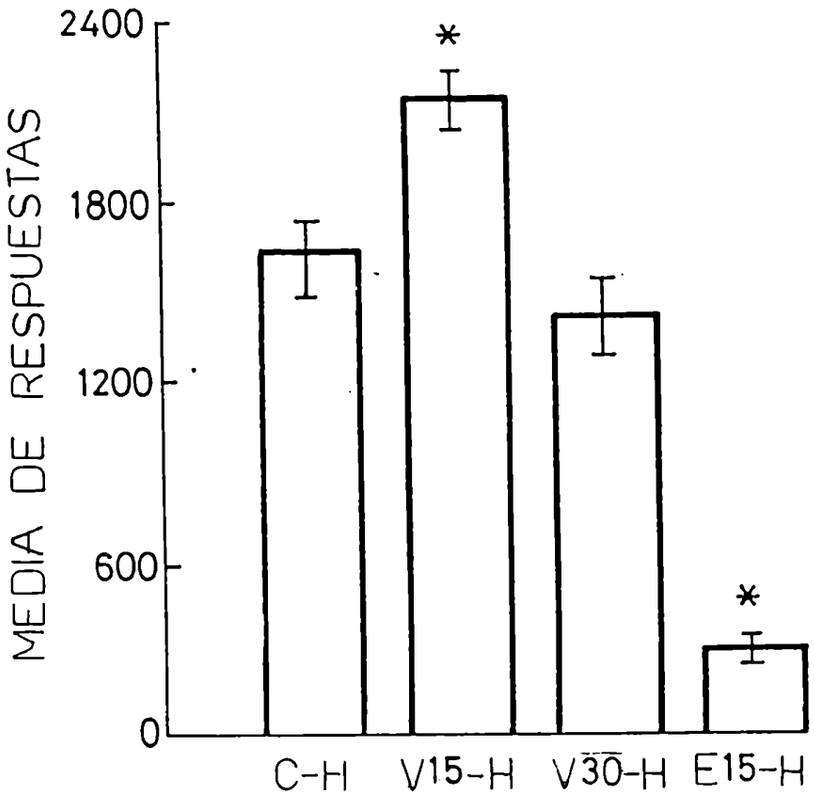


FIGURA 19. Efecto de una sesión de entrenamiento con **V** o **E** sobre la reactividad a una subsecuente estimulación con **H** medido a través del promedio de la suma de las respuestas en los 3 ensayos del test. Grupo **C-H**: animales ubicados en los actómetros durante la sesión de entrenamiento sin recibir estimulación y testeados con **H**. Grupo **V15-H**: animales entrenados con 15 ensayos de **V** y testeados con **H**. Grupo **V30-H**: animales entrenados con 30 ensayos de **V** y testeados con **H**. Grupo **E15-H**: animales entrenados con 15 ensayos de **E** y testeados con **H**. Símbolos como en la figura 17.

Resultados y discusión.

La Figura 20 muestra un claro efecto decremental de la respuesta a **V** producido por por el entrenamiento con **H** (**H15-V** vs.

C-V, $p < 0,01$) y un efecto aun más notable cuando se presenta el estímulo **E** (**E15-V** vs. **C-V**, $p < 0,005$).

Estos resultados también están de acuerdo con la hipótesis, dado que la estimulación reiterada con **H** y con **E** produce una reducción de la reactividad al estímulo **V**.

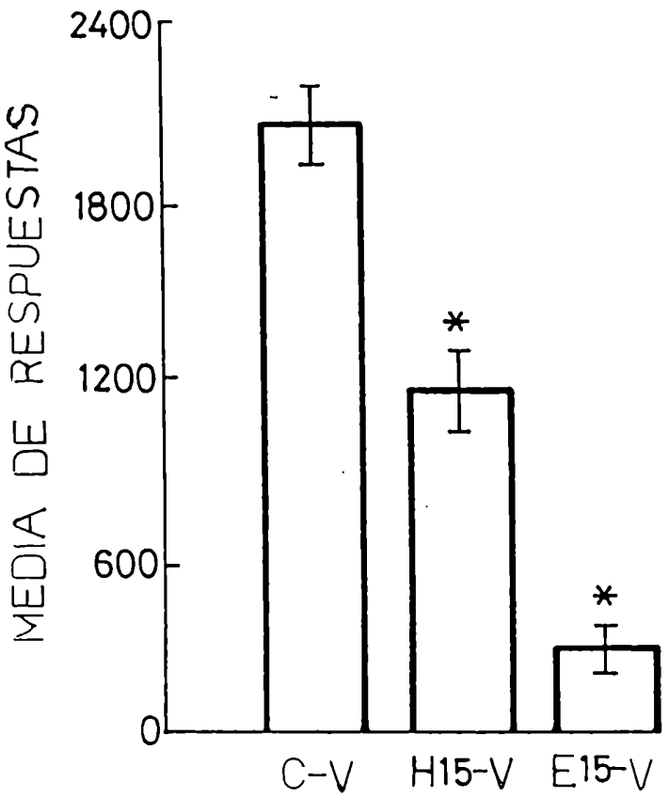


FIGURA 19. Efecto de un entrenamiento de 15 ensayos con **H** o **E** sobre la estimulación subsiguiente con **V** medido a través del promedio de la suma de las respuestas en los 3 ensayos del test. Grupo **C-V**: animales ubicados en los actómetros durante la sesión de entrenamiento sin recibir estimulación y testeados con **V**. Grupo **H15-V**: animales entrenados con 15 ensayos de **H** y testeados con **V**. Grupo **E15-V**: animales entrenados con 15 ensayos de **E** y testeados con **V**. Símbolos como en la figura 17.

Los resultados de los experimentos 3a, 3b, 3c y 3d apoyan la hipótesis de que la estimulación reiterada con estímulos de naturaleza visual (**V**, **H**) o nociceptiva (**E**) produce un efecto inespecífico no permanente sobre la reactividad a un nuevo estímulo, cualquiera sea la naturaleza de este nuevo estímulo (visual o nociceptivo). Este efecto se manifiesta con las siguientes modalidades:

a) La presentación iterativa en forma inescapable del estímulo eléctrico **E** produce en los animales un notable decremento en la reactividad a una subsiguiente estimulación con **H** o **V**.

b) La estimulación iterativa inescapable con la figura pasante **H** reduce la respuesta a una subsiguiente presentación de **V** o **E**. Entre estos dos estímulos existe sin embargo una importante diferencia ya que mientras 15 ensayos con **E** son suficientes para inducir una depresión en el nivel de respuesta a **H**, son necesarios 30 ensayos para inducir una depresión de la respuesta provocada por **E**. Esta diferencia sugiere que el efecto decremental de un estímulo nociceptivo es más potente que el de una señal de peligro.

c) La presentación reiterada inescapable del estímulo **V** aumenta la subsiguiente respuesta a **E** o **H**. Sin embargo, tal efecto desaparece cuando el entrenamiento es más largo (30 ensayos en lugar de 15), sugiriendo que dos procesos de signo opuesto, y diferente constante de tiempo, están compitiendo durante el entrenamiento con **V**: un efecto potenciador de la respuesta que va desapareciendo y un efecto depresor de la misma que va surgiendo durante el curso de la estimulación repetida.

Dado que **H** y **V** son estímulos visuales provocados por el desplazamiento de figuras de dimensiones semejantes, resulta notable el efecto opuesto que tienen, el que solo podría explicarse por la contrastante relación espacial de cada estímulo con el animal. Shalter

(1984) ha resaltado la importancia crucial de la relación espacial entre el estímulo y el sujeto estimulado en el proceso de habituación. La especificidad espacial haría que cualquier cambio en la manera de presentación de la sombra sea interpretado por el animal como un estímulo nuevo y, como consecuencia, provoque una recuperación de la respuesta. El sentido adaptativo de semejante sensibilidad discriminativa parece claro: mientras el movimiento pasante de una sombra u objeto puede denotar la presencia de un predador, el movimiento de un objeto hacia el animal ya señalaria la ejecución del ataque.

Experimento 4.

Si la estimulación repetida con **V** produce un incremento inespecífico en el nivel de respuesta a estímulos subsiguientes, debería esperarse que la propia respuesta a **V** durante el entrenamiento resultase también aumentada. Es decir, un grupo entrenado con **V** debería mostrar durante la sesión de habituación, menor tasa de caída de la respuesta y mayor reactividad que un grupo entrenado con un estímulo sin efecto contingente incremental (por ejemplo, un grupo estimulado con **H**). Además, debería detectarse una alteración característica de la curva de habituación con **V**, consistente en un aumento inicial en el nivel de respuesta o ausencia de caída en los primeros ensayos que se haría más manifiesto a mayor frecuencia de estimulación, tal como se ha observado muchas veces en vertebrados cuando esta implicada una sensibilización (Groves, Lee y Thompson, 1969; Groves y Thompson, 1970).

La intención de este experimento fue, entonces, comparar las

curvas de respuestas del entrenamiento de **V** y de **H** bajo dos frecuencias ampliamente divergentes de presentación de los estímulos.

Con tal propósito se hizo necesario adoptar un método apropiado de análisis de la curva de habituación. Un procedimiento aconsejado por Petrinovich y Widaman (1984) es el de hacer una regresión lineal por cada individuo del grupo, considerando la totalidad de los ensayos, y promediar luego todas las pendientes, pero en este caso ese método resulta inapropiado puesto que la curva respuesta vs ensayo está lejos de dar un buen ajuste lineal. En efecto, como se ha indicado en el Capítulo 3, la curva presenta dos partes bien diferenciadas: una *porción de caída* y una *porción asintótica*. Por ello, se optó por un método que permite calcular el **ensayo límite** entre ambas porciones de la curva y que consistía en realizar regresiones lineales sucesivas: en la primera regresión se consideraban los valores de todos los ensayos, en la segunda se omitía el 1er. ensayo, en la tercera se omitía el 1er. y 2do. ensayo, y así sucesivamente hasta obtener una pendiente que no diferia significativamente de cero. Luego, se realizaba una regresión lineal individual desde el ensayo 1 hasta el primer ensayo de la porción asintótica, y el valor promedio de las pendientes era considerado como la tasa de caída de la respuesta. Se calculaba también la media de los valores de respuesta para los ensayos de la porción asintótica, utilizándoselo como un parámetro adicional para caracterizar la curva.

Otro parámetro que se tuvo en cuenta fue la presencia o ausencia de caída en los primeros ensayos como forma de poner de manifiesto una posible sensibilización en la primera parte de la curva, antes de que se establezca la caída de la respuesta. Para ello se realizaron regresiones lineales grupales de los primeros 3 ensayos de cada curva, estimando si la pendiente así calculada difería

significativamente de cero.

En este experimento se utilizó una única sesión de 15 ensayos. Ciento veintiocho animales fueron distribuidos al azar en 4 grupos, de 32 cada uno, resultante de un diseño factorial de 2x2, donde un factor fue el tipo de estímulo (vertical, **V** u horizontal, **H**) y el otro factor fue el intervalo entre ensayos (IEE) (180 seg. y 0 seg.). Los grupos fueron denominados: **H-180, H-0, V-180, V-0.**

Resultados y discusión.

La Figura 21 presenta las curvas correspondientes a los cuatro grupos. Aquellos grupos entrenados con **H** presentan una caída de la respuesta más marcada y un nivel asintótico menor que los entrenados con **V**. Asi mismo, los animales entrenados con la frecuencia mayor (IEE = 0 seg.) presentan una caída de la respuesta más pronunciada y un nivel asintótico inferior a los que recibieron una frecuencia menor (IEE = 180 seg.) cuando fueron entrenados con el mismo estímulo.

La Figura 22 presenta las pendientes promedio para cada grupo. El test de comparaciones múltiples de Duncan indicó que existen diferencias significativas para las comparaciones entre los grupos: **H-180** vs. **V-180, H-0** vs. **V-0, H-180** vs. **H-0,** ($p < 0,001$) y para los grupos **V-180** vs. **V-0** ($p < 0,01$).

Se realizaron también regresiones lineales sobre los 3 primeros ensayos para todos los grupos. Las pendientes así calculadas resultaron significativamente distintas de cero para los dos grupos que recibieron **H** ($t = 4,2$, $p < 0,001$ para **H-180;** y $t = 4,4$; $p < 0,001$ para **H-0**), mientras que no resultaron significativas para los grupos que recibieron **V**. Los cambios de reactividad durante el entrenamiento

con IEE= 0 no siguieron una simple función monotónica, dado que es manifiesto un incremento inicial de la respuesta.

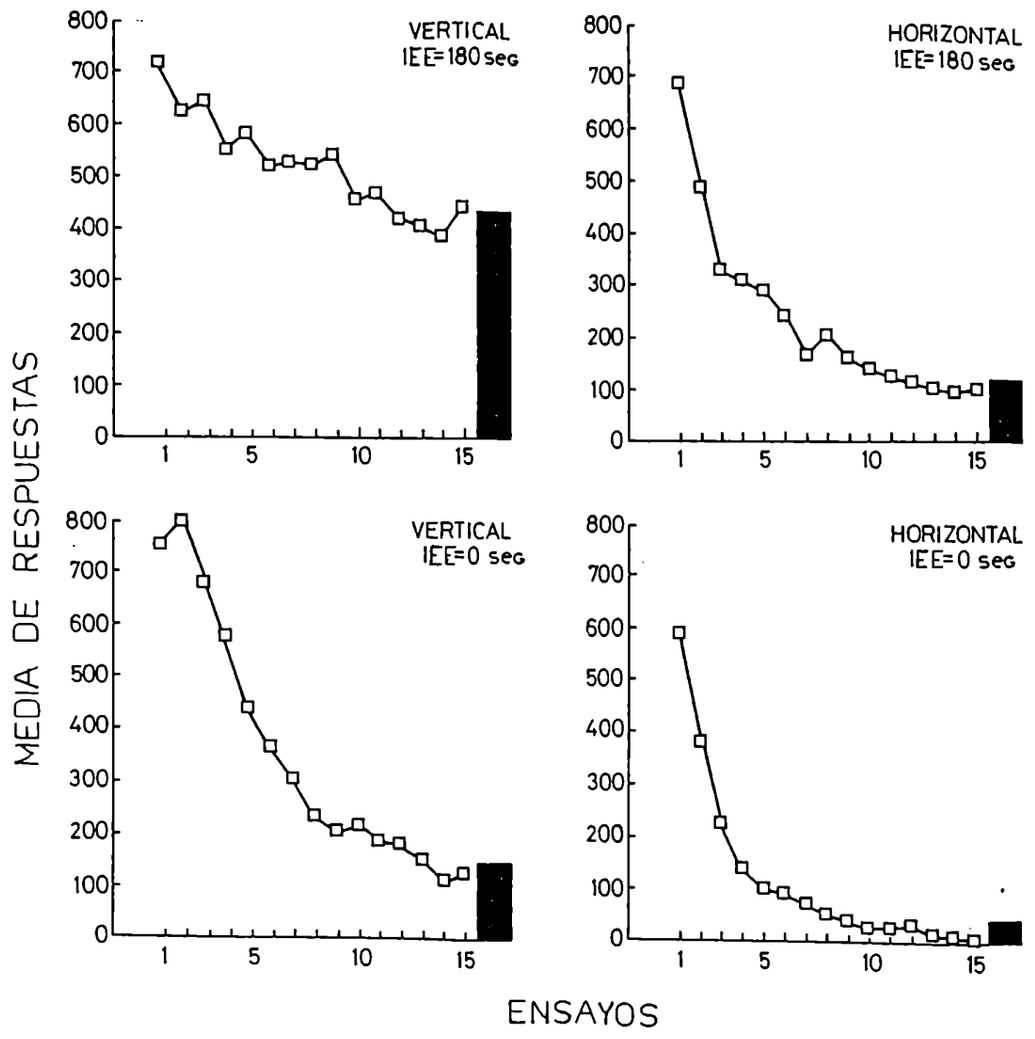


FIGURA 21. Curvas de entrenamiento de habituación a los estímulos **V** y **H** con 2 diferentes frecuencias. IEE: intervalo entre ensayos. VERTICAL: estimulación con **V**. HORIZONTAL: estimulación con **H**. La barra

negra al final de cada curva representa la media de respuesta por ensayo de la porción asintótica de la curva.

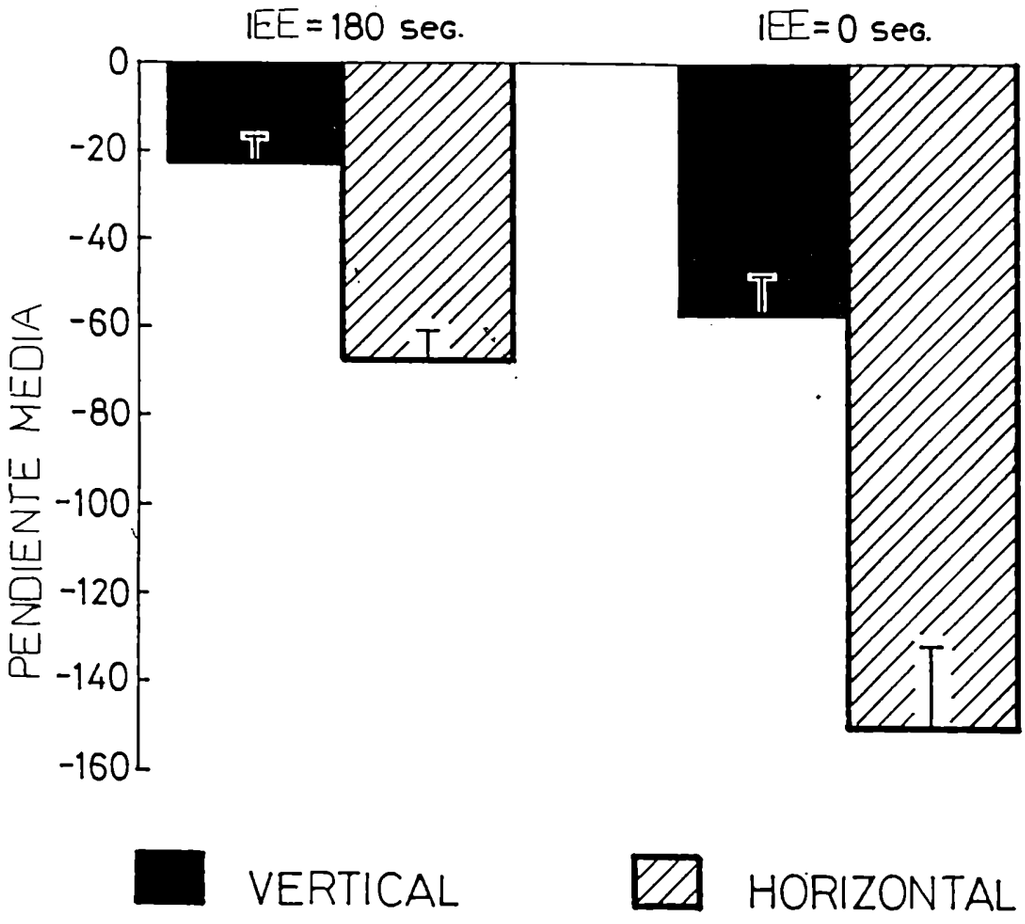


FIGURA 22. Efectos de la frecuencia y el tipo de estímulo visual sobre la tasa de habituación medida a través de la pendiente media por animal obtenida por regresiones individuales de la porción de caída de las curvas de la figura 21. Símbolos como en la figura 21.

CONCLUSION

Conjuntamente con el **proceso de habituación de corto término**, debido a la presentación reiterada de un estímulo de peligro, se daría un **proceso contingente** que, a diferencia del primero, tendría efectos post-entrenamiento de poca persistencia y estímulo inespecíficos. Se distingue entre **efectos contingentes decrementales** (propios de la estimulación iterativa con **H** o **E**) de los **efectos contingentes incrementales** (propios de la estimulación iterativa con **V**).

CAPITULO 5

PAPEL DE UNA ACCION OPIACEA EN EL PROCESO CONTINGENTE DE EFECTO DECREMENTAL

INTRODUCCION

Los resultados y las conclusiones de los capítulos anteriores indican que ante la presentación reiterada de una señal de peligro (estímulo **H**), se produce una acción opiácea endógena que es responsable de parte de la caída de la respuesta en función de los ensayos. Por otro lado, otros experimentos del Laboratorio informan que el efecto depresivo del entrenamiento con **H** sobre una estimulación **E** posterior, es totalmente revertido por una inyección de naloxono dada antes del entrenamiento (Valeggia, Fernandez-Duque, Maldonado, 1989), sugiriendo que el **efecto contingente decremental** del entrenamiento con **H** sería de naturaleza opiácea y estaría encuadrado dentro del fenómeno llamado *analgesia inducida por estrés*. En los experimentos del presente Capítulo se intenta indagar sobre la generalidad de este fenómeno, es decir, analizar si también en el **efecto contingente decremental** de **H** sobre **V** está implicada una acción opiácea, y, en caso afirmativo, si su efecto es primario o indirecto.

MATERIALES Y METODOS.

Animales.

Idem Capítulo 1.

Dispositivo experimental.

Idem Capítulo 4.

Experimento 1

Método

Los animales fueron inyectados con 100 ul de vehículo (agua destilada) o una solución de naloxono 3,2 ug/g. Veinte minutos después de la inyección, los cangrejos recibieron una sesión de 15 ensayos con **H** o permanecieron en los actómetros sin estimulación. El test consistió de una sesión de 3 ensayos con **V** después de 20 min. de intervalo inter-sesión.

Ciento veintiocho cangrejos fueron asignados al azar en 4 grupos, de 32 animales cada uno, que resultaron de un diseño factorial de 2x2, siendo los factores el tipo de inyección (**AD**, agua destilada o **Nx**, solución de naloxono) y presentación o ausencia de entrenamiento (**H**, 15 ensayos o **C**, control sin ensayos). Los grupos se denominaron: **AD-C**, **Nx-C**, **AD-H** y **Nx-H**.

Resultados y discusión

Las medias de la suma de las respuestas en los tres ensayos del test con el estímulo **V** se presentan en la Figura 23. El test de comparaciones múltiples de Duncan realizado sobre estos datos indica una diferencia significativa entre **AD-H** y cada uno de los otros grupos ($p < 0.001$) mientras que el resto de los grupos no difieren al compararlos entre sí.

Los anteriores resultados muestran que la depresión de la respuesta a **V** por la estimulación reiterada previa con **H** es revertida por naloxono. Este resultado se interpreta de la siguiente manera: el naloxono bloquea la liberación opiácea producida durante el

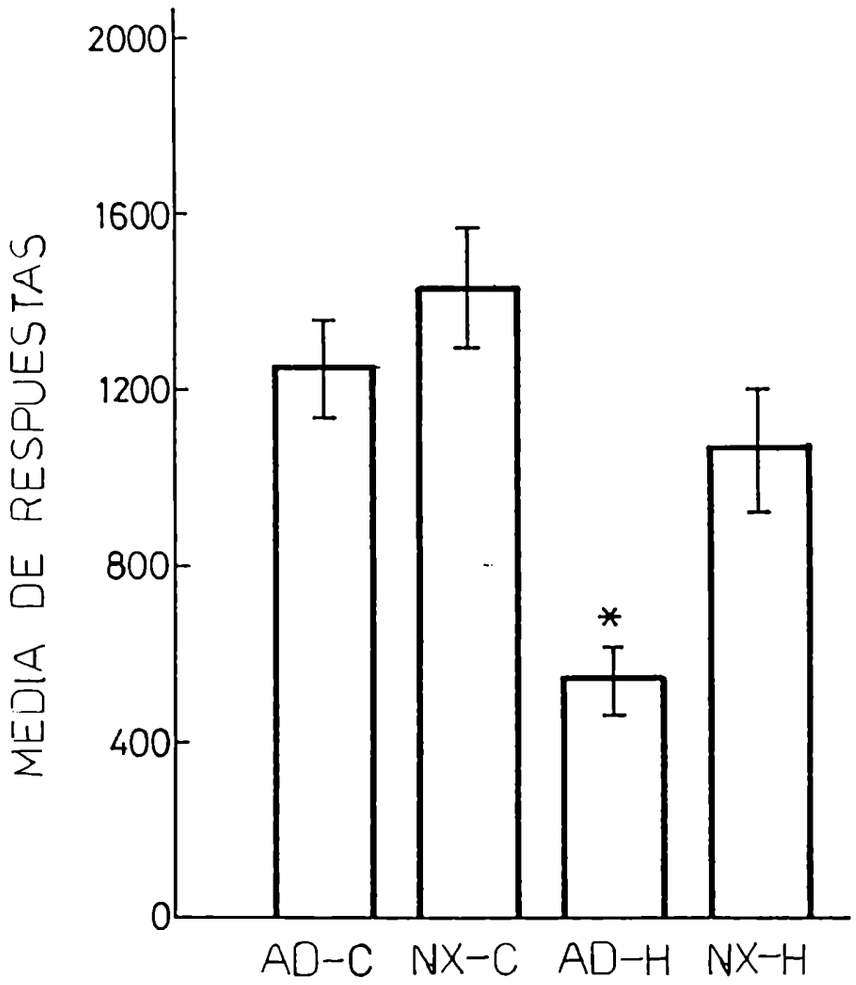


FIGURA 23. La atenuación de la respuesta a **V** inducida por un entrenamineto previo con **H** es reducida por una inyección de naloxono previa al entrenamiento. Valores medios de la suma de las respuestas a los 3 ensayos con **V** durante el test. Grupo **AD-H**: animales inyectados con agua destilada 20 min. antes de la sesión de entrenamiento con **H** y luego testeados con 3 ensayos de **V**. Grupo **AD-C**: igual que el grupo anterior pero sin recibir entrenamiento. Grupo **NX-H**: animales inyectados con 3,2 ug/g de naloxono 20 min. antes de la sesión de entrenamiento y luego testeados con 3 ensayos de **V**. Grupo **NX-C**: igual que el anterior pero sin recibir entrenamiento. (*) = diferencias significativas con respecto a los otros grupos (test de Duncan, $p<0,01$).

entrenamiento, evitando así el **efecto contingente decremental**. Sin embargo, puede considerarse una explicación alternativa. En efecto, dado que el pretratamiento con naloxono reduce la caída de la respuesta (Capítulo 3), la mayor reactividad a **V** en el test del grupo **Nx-H** podría deberse a una acción directa del naloxono antagonizando el opiáceo liberado durante el test con **V**, y no a una acción indirecta por haber anatagonizado previamente la liberación opiácea durante el entrenamiento con **H**. En otras palabras, la accion opiácea estaría restringida al momento de la estimulación, no siendo responsable del efecto remanente que tiene lugar con posterioridad al entrenamiento. No obstante, esta interpretación parece poco convincente, ya que en el Capítulo 3 se vio que el efecto del naloxono desaparace 1 hora después de ser administrado y en el presente experimento habían transcurrido 85 minutos hasta el momento del test con **V**, es decir 20 min desde la inyección y el comienzo del entrenamiento, más 45 min. de entrenamiento, más 20 min. de período inter-sesión. Además, si esta explicación alternativa fuera viable, el grupo **Nx-C** debería presentar una reactividad mayor que el grupo **AD-C** (ambos grupos fueron inyectados y luego de 85 minutos recibieron 3 ensayos con **V**). Los resultados presentados en la figura 23 estan en desacuerdo con tal predicción.

Experimento 2

Este experimento se llevo a cabo tratando de dilucidar cuál de las alternativas que surgen de la discusión del experimento anterior es más viable. Para ello el naloxono fue administrado <u>después</u> de la sesión de entrenamiento, reduciendo el intervalo entre la inyección y

el test con **V** a 20 minutos.

Método

El único cambio con respecto al experimento 1 fue el tiempo de inyección: la administración tuvo lugar inmediatamente después de la sesión de entrenamiento con **H**. Ciento veintiocho cangrejos conformaron 4 grupos de 32 animales cada uno: **C-AD** (grupo control sin entrenamiento y luego inyectado con agua destilada), **C-Nx** (igual que el grupo anterior pero inyectado con solución de naloxono 3,2 ug/g), **H-AD** (grupo entrenado e inyectado con agua destilada) y **H-Nx** (igual que el grupo anterior pero inyectado con naloxono 3,2 ug/g).

Resultados y discusión

Las medias de la suma de las respuestas en los 3 ensayos con el estímulo **V** son graficadas en la figura 24. El test de comparaciones múltiples de Duncan aplicado sobre estos datos indicó una diferencia significativa para todas las comparaciones entre los grupos ($p < 0,01$) excepto para **H-AD** vs. **H-Nx**.

A diferencia del Experiemento 1, la depresión de la respuesta provocada por el entrenamiento con **H** no es revertida por la inyección de naloxono cuando se administra después del entrenamiento. Por otro lado, esta inyección dada 20 min. antes del test con **V** produce, a diferencia del experimento anterior, un aumento de la respuesta desencadenada por **V**. Si en lugar de considerar la media de la suma de las respuestas de los tres ensayos del test se analizan las medias de las respuestas en cada uno de los 3 ensayos (Figura 25) para los grupos **C-AD** y **C-Nx** (utilizando el término de error de la interacción y manteniendo $p < 0,05$), se observa que la

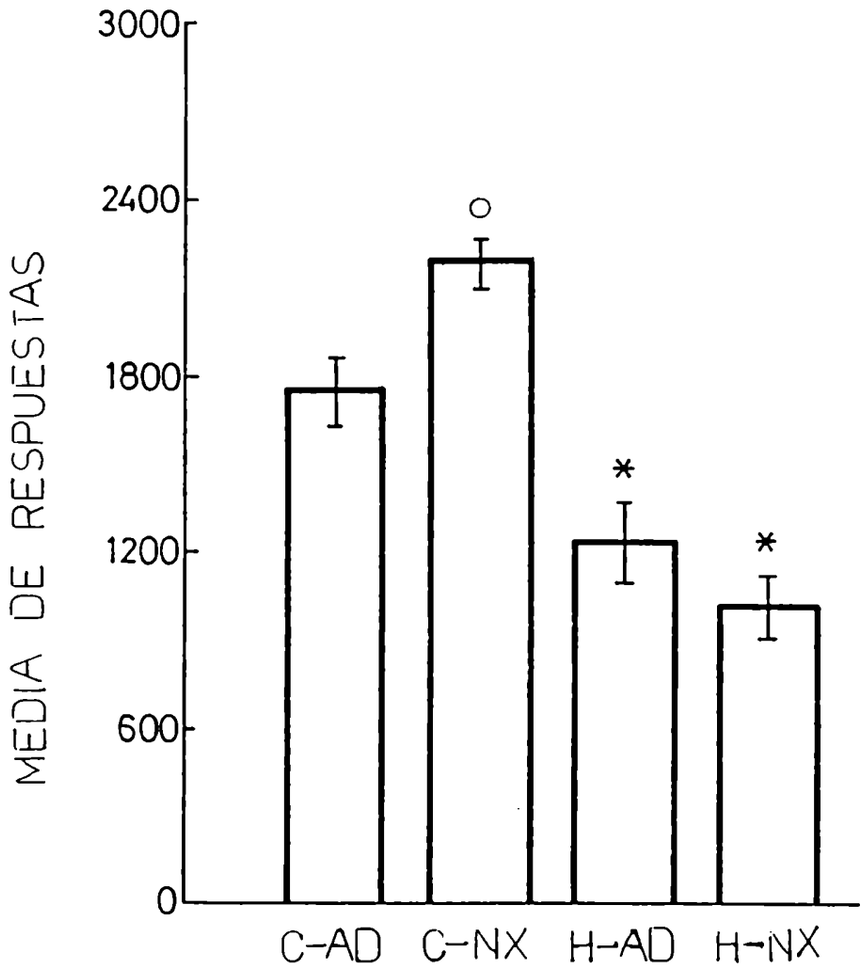


FIGURA 24. La atenuación de la respuesta a **U**, inducida por un entrenamiento previo con **H**, no es reducida por el naloxono inyectado después del entrenamiento. Valores medios de la suma de las respuestas a los 3 ensayos con **U** durante el test. Grupo **H-AD**: animales inyectados con agua destilada inmediatamente después del entrenamiento con **H**. Grupo **C-AD**: igual que el grupo anterior, pero sin entrenamiento. Grupo **H-NX**: animales inyectados con naloxono inmediatemente después del entrenamiento con **H**. Grupo **C-NX**: igual que el anterior pero sin entrenamiento. (*)= diferencias significativas con respecto a todos los grupos sin asterisco, (o)= diferencias significativas con respecto a todos los otros grupos (test de Duncan, $p<0,01$).

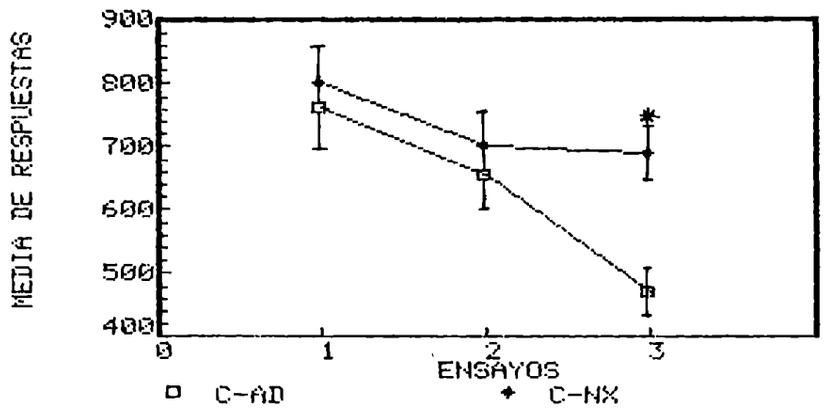


FIGURA 25. Medias y errores standard de los niveles de respuesta de cada uno de los 3 ensayos del test (estímulo **V**) de los grupos **C-AD** y **C-NX** del experimento 5b (los animales recibieron una inyección de agua destilada o de naloxono 3,2 ug/g 20 min antes del test). (*)= diferencias significativas entre ambos grupos en el ensayo correspondiente.

diferencia entre los dos grupos surge en el tercer ensayo, hecho que está de acuerdo con lo obtenido en el Capítulo 3, en donde se constató que el efecto del naloxono va surgiendo con los ensayos.

CONCLUSION

a) La administración de naloxono previa a la sesión de entrenamiento con **H** revierte el **efecto contingente decremental** sobre la respuesta a la subsiguiente estimulación con **V** (Figura 23, grupo **Nx-H, AD-C**). El efecto del entrenamiento con **H** no se limita así al caso del testeo con E (Valeggia, Fernandez-Luque, Maldonado, 1989) sino que se da también cuando se testea con un estímulo de

peligro, constituyendo este resultados otra evidencia favorable a la hipótesis de que el **proceso contingente decremental** estaría mediado por un mecanismo opiáceo endógeno.

b) La administración de naloxono después de la sesión de entrenamiento no revierte dicho efecto decremental (Figura 24, grupo **H-Nx** vs. **H-AD**). Es decir, una vez activado el mecanismo opiáceo endógeno, sus efectos inespecíficos no pueden ser revertidos por la inyeccion post-entrenamiento de naloxono. Este resultado sugiere que la propuesta acción opiácea, no sería el mecanismo último que lleva a la reducción de la respuesta, sino que desencadenaría otros mecanismos responsables directos de dicho efecto. Este tipo de modulación opiácea secundaria ha sido postulado tanto en vertebrados como en invertebrados, principalmente en lo que respecta a la regulación de mecanismos dopaminérgicos y *beta*-adrenérgicos (Izquierdo y Graudenz, 1980; Izquierdo y McGaugh, 1985; Gallagher y Kapp, 1978; Aiello, Hager, Akiwumi, Stefano, 1986).

CONCLUSIONES Y DISCUSION GENERAL

1. El cangrejo *Chasmagnathus granulatus* tiene sensibilidad opiácea, puesto que su respuesta defensiva (*despliegue lateral del merus*) evocada por un estímulo nociceptivo (un choque eléctrico), es inhibida por la administración de morfina de manera dosis y tiempo dependiente, y revertida por naloxono. Se agrega así una nueva especie de "invertebrado" a la lista de los que demuestran sensibilidad opiácea a través de análisis del comportamiento: el camarón *Squila mantis* (Maldonado y Miralto, 1982), la cucaracha *Periplaneta americana* (Hentschel y Penzling, 1982), la abeja *Apis melliphera* (Núñez, Maldonado, Miralto y Balderrama, 1983) y en el mántido *Stomatoptera biocellata* (Zabala, Miralto, Maldonado, Núñez, Jaffe y Calderon, 1984). Sin embargo, este es el primer trabajo con un "invertebrado" en el que se ha hecho un estudio sistemático de la relación tiempo-dosis-respuesta de la acción de la morfina, lo que ha permitido estimar más precisamente sus parámetros farmacológicos. La potencia de la droga es semejante a la observada en vertebrados, pero el efecto máximo se alcanza en un período mucho menor que el de los vertebrados, de acuerdo con lo que podría esperarse de la ausencia de barrera hematocerebral en cangrejos (Abbott, 1970). La vida media de la morfina estimada para *Chasmagnathus* es mucho menor que la calculada para vertebrados, lo que sugiere un proceso de eliminación más rápido en el cangrejo. La posibilidad de mecanismos de degradación diferentes está de acuerdo con el hecho de que mientras en vertebrados se conoce la acción de una sola enzima degradante de los péptidos opiáceos, en los crustáceos se postula un mecanismo en el que intervendrían al menos

3 enzimas diferentes actuando conjuntamente (Coletti-Previero, et al, 1985).

2. La respuesta de escape de *Chasmagnathus* ante la presentación de una señal de peligro (un estímulo **H**) resulta claramente reducida por la administración de morfina, efecto que es revertido por naloxono. La inhibición por un opiáceo de la respuesta a una señal de peligro constituye un fenómeno pocas veces demostrado en la literatura, tal es así que algunos autores consideran a la acción opiácea como específica de estímulos nociceptivos y sin efecto sobre la expresión del miedo (Fansellow, 1984; Warren e Ison, 1982). Entre los ejemplos en que se postula una acción anti-respuesta al peligro se cuentan los siguientes. Grevert y Goldstein (1977) presentan resultados con humanos, sugieriendo que las endorfinas tienen un papel ansiolítico, reversible por naloxono; Davis (1979) informa que en ratas, la morfina es capaz de reducir la respuesta potenciada de sobresalto ante un estímulo acústico de manera dosis dependiente y naloxono reversible, sin encontarse un efecto del naloxono *per se*. Koob, Le Moal y Bloom (1981) sugieren que la disrupción que produce la morfina en el aprendizaje de respuestas de evitación en ratas, está relacionada con la habilidad de la droga para reducir las respuestas de alarma asociadas con una situación condicionada por miedo o ansiedad.

3. La presentación reiterada de un estímulo de peligro (estímulo **H**) parece inducir la liberación de un opiáceo endógeno, como lo sugiere el hecho de que la administración pre-entrenamiento de naloxono revierte el **efecto contingente decremental** del entrenamiento sobre la respuesta a un estímulo diferente (**V** o **E**)

presentado posteriormente.

Este resultado y la hipótesis que se postula, están de acuerdo con la idea de que estresores no-dolorosos pueden inducir autoanalgesia opiácea. En efecto, en la Introducción General se informa que señales de peligro, tales como un contexto condicionado a un choque eléctrico, son capaces de desencadenar una autoanalgesia opiácea (Fanselow, 1986; revisión en Bodnar, 1984), y por otro lado, Siegfried, Netto e Izquierdo (1987) sugieren que la sola introducción de una novedad en el ambiente puede producir analgesia suave, junto con una liberación de *beta*-endorfina cerebral (Izquierdo y Netto, 1985).

4. Una acción opiácea endógena parecería mediar parcialmente la caída de la respuesta durante el proceso de adquisición de habituación de corto término a un estímulo de peligro (**H** o **V**).

Esta hipótesis se basa en el hecho de que la administración pre-entrenamiento de naloxono desacelera el decremento de la respuesta de escape durante la sesión, tanto con el estímulo **H** o **V**. Sin embargo, el mecanismo postulado no explicaría toda la caída de respuesta, ya que el efecto naloxono sólo se hace evidente después de los primeros ensayos, justamente cuando el decremento es mayor, y además, ninguna dosis del antagonista alcanza a anular dicho decremento. Es decir, junto al **proceso de habituación**, ajeno a la acción opiácea endógena, ocurriría simultáneamente un **proceso contingente decremental** mediado por un mecanismo opiáceo endógeno.

5. La diferencia entre **proceso de habituación** y **proceso contingente decremental** no está sólo marcada por el hecho de que el segundo implicaría una acción opiácea endógena y el primero no.

Además, el **proceso de habituación** es estímulo específico y de larga duración, mientras que el **proceso contingente decremental** es estímulo inespecífico y de corta persistencia. Asimismo, los resultados del Capítulo 4 indican que habría un **proceso contingente incremental** durante la habituación a **V**, igualmente estímulo inespecífico y de corta duración, pero que provoca un aumento de la respuesta a la estimulación posterior con **H** o E. Este proceso incremental presenta características similares a las descriptas, para el fenómeno de sensibilización, en la Teoría del Proceso Dual (Groves y Thompson, 1970).

6. Si bien el **proceso contingente decremental** implicaría liberación de opiáceos endógenos, el efecto depresor post-entrenamiento no sería consecuencia directa de la acción de los opiáceos sobre el umbral de la respuesta de escape. Los opiáceos endógenos operarían a través de una activación secundaria, es decir, interferirían con la liberación o acción de otros neurotrasmisores que modulan la respuesta. Esta conclusión se apoya en los resultados de los experimentos del Capítulo 5, donde se muestra que el **efecto contingente decremental** de **H** sobre la respuesta a **V**, es revertido por el naloxono administrado antes pero no después del entrenamiento.

Existen antecedentes, tanto en vertebrados como en invertebrados, de la acción opiácea sobre otros neurotransmisores, principalmente sobre mecanismos dopaminérgicos; ya sea cuando estos opiáceos son administrados exógenamente como cuando su liberación endógena es inducida a través de estímulos estresantes o novedosos (Izquierdo y Graudenz, 1980.; Stefano y Catapane, 1979; Aiello, Hager, Akiwumi y Stefano, 1986).

7. El **proceso contingente decremental** sería de acción central, de la misma manera que lo es por definición el **proceso de habituación.** Es decir, el efecto decremental sobre la respuesta de escape a un estímulo visual, mediado por la liberación de opiáceos endógenos o por la administración exógena de morfina, no se debería a la interferencia de esos compuestos con la capacidad motora o sensorial del cangrejo, sino a su acción moduladora central. La sugerencia de que los opiáceos endógenos operan a través de una activación secundaria (punto 6) se compadece con la idea de que su acción sería central, pero el mayor soporte para esta hipótesis deriva de otros resultados del Laboratorio. La morfina, administrada en dosis y tiempos idénticos a los que produce efecto sobre las respuestas defensivas, no muestra influencia alguna sobre la respuesta optocinética, tanto en lo que se refiere a la agudeza visual como a la capacidad motora (Tomsic y Maldonado, 1990). Por otro lado, la administración de morfina reduce tanto la respuesta de escape a **H** durante el entrenamiento como la habituación de largo término testeada 24 hs después; en cambio, la administración de GABA inhibe la respuesta durante el entrenamiento por inhibición motora directa pero no afecta la habituación de largo término (Tomsic, Maldonado y Rakitin, 1991). Los autores interpretan estos resultados postulando que la morfina (y por ende los opiáceos endógenos) interferirían con la percepción del estímulo de peligro, provocando un debilitamiento de la asociación entre el estímulo (sombra pasante) y su significado de peligro (aproximación de un predador).

La hipótesis de que el **proceso contingente decremental** estaría mediado por opiáceos endógenos, con efectos similares a

opiáceos de vertebrados, no implica sugerir que el opiáceo del cangrejo sería idéntico a alguno de los ya descriptos para vertebrados. En términos de Greenberg y Price (1983), diríamos que el opiáceo postulado para el cangrejo podría ser tanto un péptido "naturalizado" (idéntico en composición y función a uno ya descripto en vertebrados) como uno "nativo" (con el mismo tipo de efecto que presentan los de vertebrados, pero diferente en composición a cualquiera de ellos).

8. La presentación iterativa de dos estímulos visuales que señalizan peligro (**H** y **V**) provoca efectos marcadamente opuestos, pese a que sólo difieren en la distinta relación espacial que guardan con respecto al cangrejo.

La presentación repetida de **H** conduce a la supresión de la respuesta: sin estímulo-especificidad durante un corto tiempo después del entrenamiento (**efecto contingente decremental**) y con estímulo especificidad a tiempos más largos (**habituación de largo término**). La inmovilidad es una estrategia ya descripta en otros animales, por ejemplo, el "freezing" en ratas (Myer, 1971)), con la virtud adaptativa de reducir la probabilidad de ser localizado por posibles predadores (Hirsh, 1977).

La presentación repetida de **V** establece una competencia entre el efecto decremental de la respuesta, propio de la **habituación**, y un proceso potenciador que llamamos **proceso contingente incremental**. Tras un número suficientemente grande de presentaciones (30 ensayos), el efecto atenuante supera al incremental y la respuesta resultará finalmente habituada.

Así, la estrategia defensiva inicial que se adopta, depende de la forma de desplazamiento del posible predador en relación al animal.

Si el estímulo que se presenta reiteradamente consiste en un objeto pasante, el cangrejo tiende a cambiar relativamente rápido su respuesta de escape por un comportamiento críptico (inmovilidad). Si el estímulo que se presenta reiteradamente consiste en un objeto que se aproxima, la estrategia de inmovilizarse compite inicialmente con la de adoptar una hiper-respuesta, y sólo si se insiste en la presentación del estímulo la segunda cede a la primera.

9. El estímulo de peligro es incontrolable e inescapable, puesto que el cangrejo no puede evitar la estimulación iterativa, ya sea mediante algún comportamiento que haga cesar la presentación del estímulo o escapando desde el actómetro. Las consecuencias de esta situación experimental podrían relacionarse con el fenómeno conocido en la literatura inglesa como "learned helplessness" o aprendizaje de la inevitabilidad. Como ya se ha mencionado en la Introducción General, los estudios sobre este tema indican que la incontrolabilidad de los estímulos iterativos provoca, entre otras consecuencias, la reducción o retardo generalizado de las respuestas defensivas y agresivas (Maier y Seligman, 1976), y que, en ciertas condiciones, este fenómeno va acompañado de la liberación de opiáceos endógenos. Por lo tanto, podría ser útil encarar futuras investigaciones sobre el **proceso contingente decremental** descripto en *Chasmagnathus*, considerándolo como un caso de aprendizaje de la inevitabilidad.

BIBLIOGRAFIA

ABBOTT, J. (1970). Absence of blood-brain barrier in a crustacean, *Carcinus maenas* L. *Nature*, 225: 291-293.

ABRAMSON, C.I., ARMSTRONG, P.M., FEINMAN, R.A. y R.D. FEINMAN (1988). Signaled avoidance in the eye withdrawal reflex of the green crab. *Journal of the Experimental Analisis of Behavior*, 50: 483-492.

ABRAMSON, C.I., R.D. FEINMAN (1990). Lever-press conditioning in the crab. *Physiology and Behavior*, 48: 267-272.

AIELLO, E., E. HAGER, C. AKIWUMI y G.B. STEFANO (1986). An opioid mechanism modulates central and not peripheral dopaminergic control of ciliary activity in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 6: 17-30.

AKIL, H., J. MADDEN, R.L. PATRICK y J.D. BARCHAS (1976a). Stress-induced increase in endogenous opiate peptides: concurrent analgesic and its partial reversal by naloxone. En *Opiates and Endogenous Opioid Peptides*, ed. H. Kosterlitz; pp. 63-70. Elsevier: Amsterdam.

AKIL, H., D.J. MAYER y J.C. LIEBESKIND (1976b). Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science*, 191: 961.

AKIL, H., D.J. MAYER y J.C. LIEBESKIND (1972). Comparison chez le rat entre l'analgesie induite par stimulation de la substance grise periaqueducale et l'analgesie morphinique. *Comp. Rend Acad. Sci. Paris*, 274: 3603-3612.

AKIL, H., S.J. WATSON, E. YOUNG, M.E. LEWIS, H. KHACHATURIAN Y J.M. WALKER (1984). Endogenous opioids: biology and function. *Ann. Rev. Neurosci.*, 7: 223-247.

AMIR, S.y Z. AMIT (1978). Endogenous opioid ligands may mediate stress-induced changes in the affective properties or pain-related behavior in rats. *Life Science*, 23: 1143-1151.

AMIR, S., Z.W. BROWN, Z. AMIT y ORSTEIN (1981). Body pinch induces longlasting cataleptic-like immobility in mice: behavioral characterization and effect of naloxone. *Life Science*, 28: 1189-1193.

ANDERSEN, A.C., A. L'HERMITE, R. FERRAND y M.P. DUBOIS (1986). Immunohistological detection of methionine-enkephaline-like and endorphin-like material in the digestive tract and in the nervous system of the mussel: *Mytilus edulis* L. *General and Comparative Endocrinology*, 62: 111-119.

BODNAR, R.J., D.D. KELLY, A. SPIAGGIA, C. EHRENBERG y M. GLUSMAN (1978a). Dose dependent reduction by naloxone of analgesia induced by cold water stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 8: 667-673.

BODNAR, R.J., D.D. KELLY, S.S. STEINER y M. GLUSMAN (1978b). Stress-produce analgesia and morphine-produce analgesia: lack of cross tolerance. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 8: 661-666.

BODNAR, R.J., M. BRUTUS, M. GLUSMAN y D.D. KELLY (1978c). Analgesia induced by 2-deoxy-D-glucose, an antimetabolic glucose analog. *Federation Proc.*, 37: 470.

BODNAR, R.J., D.D. KELLY, M. BRUTUS, A. MANSOUR y M. GLUSMAN (1978d). 2-Deoxy-D-glucose-induced decrements in operant and reflex pain threshold. *Phamacol. Biochem. Behav.*, 9: 543-548.

BOSCHI, E.E. (1972). Los crustáceos decápodos brachyura del litoral bonaerense. *Bol. Inst. Biol. Marina (Mar del Plata)*, 6: 1-6.

BRUNNER, D. y H. MALDONADO (1988). Habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. Effect of morphine and naloxone. *Jounal of Comparative Phisiology*, 162: 687-694.

CAREW, T.J., H.M. PINSKER, E.R. KANDEL (1972). Long-term habituation of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, 175: 451-454.

CHANCE, W.T., G.M. KRYNOCK y J.M. ROSECRANS (1978a). Antinociception following lesion-induced hyper-emotionality and conditioned fear. *Pain*, 4: 243-251.

CHANCE, W.T., A.C. WHITE, G.M. KRYNOCK y J.A. ROSECRANS (1978b). Conditioned fear-induced antinociception and decreased binding of [3-h]N-leu-enkephalin to rat brain. *Brain Research*, 141: 371-378.

COLETTI-PREVIERO, M.A., H. MATRAS, R. ZWILLING y A. PREVIERO (1985). Enkephalin-degrading activity in arthropode hemolymphe. *Neuropeptides*, 6: 405-415.

DAVENPORT, A.P. y P.D. EVANS (1986). Sex-related differences in the concentration of Met-enkaphalin-like immunoreactivity in the nervous system of an insect, *Schistocerca gregaria*, revealed by radioimmunoassay. *Brain Research*, 383: 319-323.

DAVIS, M. (1970). Effects of interstimulus interval length and variability on startle-response habituation in the rat. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 72: 177-192.

DAVIS, M. (1972). Diferential retention of sensitization and habituation of the startle response in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 78:260-267.

DAVIS, M. (1979). Morphine and naloxone: Effects on conditioned fear as mesured with the potentiated startle paradigm. *European Journal of Pharmacology*, 54: 341-347.

DAVIS, M. y S.E. FILE (1984). Intrinsic and extrinsic mechanisms of habituation and sensitization: Implication for the design and analysis of experiments. En *Habituation, Sensitization and Behavior*, eds. H.V.S. Peeke y L. Petrinovich; pp. 287-323. Orlando: Academic Press.

EL-SALHY, M.R., R. ABOU-EL-ELLA, S. FALKMER, L. GRIMELIUS y E. WILANDER (1980). Immunnohistochemical evidence of gastero-pancreatic peptides of vertebrate types in the nervous system of larva of a dipteran insect, the house fly, *Ristalis aeneus*. *Regul. Pept.*, 1: 187.

FANSELOW, M.S. (1984). Opiate modulation of active and inactive components of the postshock reaction: Paralels between naloxone pretreatment and shock intensity. *Behavioral Neuroscience*, 98: 269-277.

FANSELLOW, M.S. (1986). Conditioned fear-induced opiate analgesia: a competing motivational state theory of stress analgesia. En *Stress-Induced Analgesia*, ed. D.D. Kelly; pp. 40-54. New York: N. Y. Academy of Sciences.

GALLAGHER, M. y S. KAPP (1978). Opiate administration into the amigdala: effects on memory processes. *Abstr. Soc. Neurosci.* 4: 258-264.

GALLINA, Z.H., F. ROGAN y Z. AMIT (1983). Non-naltrexone reversible heat-stress induced analgesia. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 13: 276-280.

GESSER, B.P. y L.I. LARSSON (1986). Enkephalins may act as sensory transmiters in earthworms. *Cell Tissue Res.*, 246: 33-45.

GIRARDOT, M.N. y F.A. HOLLOWAY (1984a). Intermittent cold water stress-analgesia in rats: cross tolerance to morphine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 20: 613-621.

GIRARDOT, M.N. y F.A. HOLLOWAY (1984b). Cold water stress-analgesia in rats: differential effects of naltrexone. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 32: 547-553.

GLAZER, H.I. y J.M. WEISS (1976). Long-term interference effect: An alternative to "learned helplessness". *Journal of Experimental Psychology,* 2: 201-213.

GREENBERG, M.J. y D.A. PRICE (1983). Invertebrate neuropeptides: native and naturalized. *Annual Reviews Physiology,* 45:271-288.

GREVERT P. y A. GOLDSTEIN (1977). Effect of naloxone on experimentally induced ischematic pain and on mood in human subjets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.,* 53: 111-113.

GROVES, P.M., D. LEE y R.F. THOMPSON (1969). Effects of stimulus frecuency and intensity on habituation and sensitization in acute spinal cat. *Physiology & Behavior,* 4: 383-388.

GROVES, P.M. y R.F. THOMPSON (1970). Habituation: a dual-process theory. *Psychological Review*, 77: 419-450.

GUSTAFSSON, M.K., M.A. LEHTONEN y F. SUNDLER (1986). Immunocytochemical evidence for the presence of "mammalian" neurohormonal peptides in neurones of the tapeworm *Diphyllobothrium dendriticum*. *Cell Tissue Res.*, 243: 41-44.

HANSEN, B.L., G.N. HANSEN y B. SCHARRER (1982). Immunoreactive material resembling vertebrate neuropeptides in corpus cardiacum and corpus allatum of the insect *Leucophaea maderae*. *Cell Tissue Res.*, 225: 319-324.

HAYES, R.L., G.J. BENNETT, P. NEWLON y D.J. MAYER (1976). Analgesic effects of certain noxious and stressful manipulation in the rat. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 2: 1350-1356.

HAYES, R.L., G.J. BENNETT, P.G. NEWLON y D.J. MAYER (1978). Behavioral and physiological studies of non-narcotic analgesia in the rat elicited by certain environmental stimuli. *Brain Research*, 155: 69-75.

HENTSCHEL, E. y H. PENZLIN (1982). Beeinflussung des putzverhaltens bei *Periplaneta americana* (L) durch wundsetzung, naloxon-morphin- und met-enkephalingaben. *Zool. Jb. Physiol.*, 86: 361-368.

HINDE, R.A. (1970). Behavioral habituation. En *Short-term changes in neural activity and behavior*, eds. G. Horne y R.A. Hinde, pp. 3-40. Cambridge: Cambridge University Press.

HIRSH, S.M. (1977). Of rats and cats: A laboratory study of rats' defensive postures. Annals of Western Psycological Association meeting in Seattle.

HUG, C.C, Jr. y M.R. Murphy (1981). Tissue redistribution of fentanyl and termination of its effects in rats. *Anesthesiology*, 55: 369-378.

HUGHES, J. (1975). *Brain Research.*, 88: 295-304.

HUGHES, J., T.W. SMITH, B.A. MORGAN y L.H. FOTHERGILL (1975a). *Life Science*, 16: 1753-1757.

IZQUIERDO, I. (1980). Efect of beta-Endorphine and naloxone on acquisition, memory and retrieval of a shuttle avoidance and habituation learning in rat. *Psychopharmacology*, 66: 199-203.

IZQUIERDO, I. y M. GRAUDENZ (1980). Memory facilitation by naloxone is due to release of dopaminergic and beta-adrenergic systems from tonic inhibition. *Psychopharmacology*, 67: 265-268.

IZQUIERDO, I. y J.L. McGAUGH (1985). Effect of a novel experience prior to training or testing on retention of an inhibitory avoidance response in mice: involment of an opioid system. *Behavioral and Neural Biology*, 44: 228-237.

IZQUIERDO, I. y C.A. NETTO (1985a). The brain beta-endorphin system and behavior: the modulation of consecutively and simultaneously processed memories. *Behav. Neur. Biol.*, 44: 249-258.

IZQUIERDO, I. y C.A. NETTO (1985b). The rol of beta-endorphine in behavioral regulation. *Ann. New York Acad. Sci.*, 444: 162-168.

IZQUIERDO I., M.L. PERRY, R.D. DIAS, D.O. SOUZA, E. ELISABETSKY, M.A. CARRASCO, O.A. ORSINGHER y C.A. NETTO (1981). Endogenous opiods, memory modulation, and state dependency. En *Endogenous peptides and learning and memory processes*, eds. J.L. Martinez, R.A. Jensen, R.B. Messing, H. Rigter y J.M. McGaugh; pp. 269-290. New York: Academic Press.

IZQUIERDO, I., D.O. SOUZA, R.D. DIAS, M.L.S. PERRY, M.A. CARRASCO, N. VOLKMER y C.A. NETTO (1984). Effect of various behavioral training and testing procedures on brain beta-endorphin-like immunoreactivity and the possible role of beta-endorphin in behavioral regulation. *Psychoneuroendocrinology*, 9: 381-389.

KANDEL, E.R.A. (1978). A cell biological approach to learning. Bethesda, MD: Grass Lecture Monograph.

KAVALIERS, M. (1987). Evidence for opioid and non-opioid forms of stress-induced analgesia in the snail, *Cepaea nemoralis*. *Brain Research*, 410: 111-114.

KAVALIERS, M. (1988). Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res. Bull.*, 21: 923-935.

KAVALIERS, M., M.A. GUGLICK y M. HIRST (1987). Opioid involvement in the control of feeding in an insect, the american cockroach. *Life Sciences*, 40: 665-672.

KAVALIERS, M. y F.S. TEPPERMAN (1988). Exposure to a novel odors induces opioid-mediated analgesia in the land snail, *Cepaea nemoralis*. *Behavioral and Neural Biology*, 50: 285-290.

KRASNE, F.B. (1969). Excitation and habituation of the crayfish escape reflex: the depolarizing response in lateral giant fibres of the isolated abdomen. *Journal of Experimental Biology*, 50: 29-46.

KRASNE, B.F. (1972). Learning in crustacea. En *Invertebrate Learning*, eds. W. Corning, J. Dyal y A.O.D. Willows; Vol. 2, pp. 49-130. New York: Plenum Press.

KREAM, R.M., R.S. ZUKIN y G.B. STEFANO (1980). Demostration of two classes of opiate binding sites in the nervous tissue of the marine mollusc *Mytilus edulis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 19: 9218-9227.

KOVACS, G.L. y D. DE WIED (1981). Endorphin influences on learning and memory. En *Endogenous peptides and learning and memory processes*, eds. J.L. Martinez, R.A. Jensen, R.B. Messing, H. Rigter y J.M. McGaugh; pp. 231-247. New York: Academic Press.

KOMISARUK, B.R. y K. LARSON (1971). Suppression of spinal and cranial nerve reflex by vaginal or rectal probing. *Brain Research*, 351: 231-235.

LASAGNA, L. (1964). The clinical evaluation of morphine and its substitutes as analgesics. *Pharmachol. Rev.*, 16: 47-83.

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

LESLIE, F.M. (1987). Methods used for the study of opiod receptors. *Pharmacological reviews*, 39: 197-249.

LEUNG, M.K. y G.B. STEFANO (1984). Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 955-961.

LEUNG, M.K. y G.B. STEFANO (1987). Comparative neurobiology of opioids in invertebrates with spetial attention to senescent alteration. *Prog. Neurobiol.*, 18: 131-142.

LEWIS, J.W., J.T. CANNON y J.C. LIEBESKIND (1980). Opioid and non-opioid mechanism of stress analgesia. *Science Wash. DC*, 208: 623-629.

LEWIS, J.W., J.E. SHERMAN y J.C. LIEBESKIND (1981). Opioid and nono-opioid stress analgesia: assestment of tolerance and cross tolerance with morphine. *J. Neurosci.*, 1: 358-363.

LOPIANO, L., C. de'SPERATI y P.G. MONTAROLO (1990). Long-term habituation of the acoustic startle response: role of the cerebellar vermis. *Neuroscience*, 35: 79-84.

LOZADA, M., A.G. ROMANO y H. MALDONADO (1990a). Long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiology & Behavior*, 47: 35-41.

MADDEN, J., H. AKIL, R. L. PATRICK y J.D. BARCHAS (1977). Stress-induced parallel changes in central opioid levels and pain responsiveness in the rat. *Nature London*, 256: 358-366.

MAIER, S.F. (1986). Stressor controllability and stress-induced analgesia. En *Stress-Induced Analgesia*, ed. D.D. Kelly; pp. 40-54. New York: N. Y. Academy of Sciences.

MAIER, S.F. y M.E.P. SELIGMAN (1976). Learned helplessness: theory and evidence. *Journal of Experimental Psychology: General*, 105: 3-46.

MAIER, S.F., J.E. SERMAN, J.W. LEWIS, G.W. TERMAN y J.C. LIEBESKIND (1983). The opioid/nonopioid nature of stress-induced analgesia and learned helplessness. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Proc.*, 9: 80-91.

MALDONADO, H. y A. MIRALTO (1982). Effects of morphine and naloxone on a defensive response of the mantis shrimp, *Squilla mantis*. *J. Comp. Physiol.*, 147: 455-459.

MARINO, G., A. PALMISANO, V. DI MARZO, D. MELCK y A. MIRALTO (1985). Native opioid-like peptides in *Squilla mantis* ganglia. *Peptides*, 6: 403-407.

MARTIN, W.R. (1967). Opioid antagonist. *Pharmacology Review*, 19: 463-473.

MARTINEZ, J.L., H. RIGTER (1980). Endorphins alter acquisition and consolidation of an inhibitory avoidance response in rats. *Neuroscience Letters*, 18: 197-201.

MAYER, D.J. y R.L. HAYES (1975). Stimulation-produced analgesia: development of tolerance and cross-tolerance to morphine. *Science*, 188: 941-944.

MAYER, D.J.,T.L. WOLFE, H. AKIL, B. CARDER y J.C. LIEBESKIND (1971). Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science*, 174: 1351-1356.

McGIVERN, R.F., R.F. BERKA, G.G. BERNSTON, J.M. WALKER y C.A. SANDMAN (1979). Effect of naloxone on analgesia induced by food deprivation. *Life Science*, 25: 885-889.

MESSING, R.B., R.A. JENSEN, B.J. VASQUEZ, J.L. MARTINEZ, V.R. SPIEHLER y J.L. McGAUGH (1981). Opiate modulation of memory. En *Endogenous peptides and learning and memory processes,* eds. J.L. Martinez, R.A. Jensen, R.B. Messing, H. Rigter y J.M. McGaugh; pp. 431-443. New York: Academic Press.

MILLER, R.J. y P. CUATRECASAS (1978). Enkephalins and endorphins. *Vitamins and Hormones*, 36: 297-310.

MÜELLER, A.L., M.R. PALMER, B.J. HOFFER y T.V. DUNWIDDIE (1982). Hippocampal noradrenergic response in vivo and in vitro characerization of alfa and beta-components. *Nauyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 318: 259-266.

MYER, J.S. (1971). Some effects of noncontingent aversive stimulation. En *Aversive Conditioning and Learning*, ed. F.R. Brush. New York: Academic Press.

NETTO, C.A., R. DUTRA DIAS e I. IZQUIERDO (1986). Diferential effect of posttraining naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock administration upon memory of an open-field habituation and of a water-finding task. *Psychonneuroendocrinology,* 11: 437-446.

NÚÑEZ, J.A., H. MALDONADO, A. MIRALTO y N. BALDERRAMA (1983). The stinging response of the honey bee: effect of morphine, naloxone and some opioid peptides. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 19: 921-924.

PALMISANO, A., G. MARINO, V. DI MARZO, H.R. MORRIS, T.A. HOWLETT y S. TOMLIN (1986). RIA/chromatographic evidence for novel opioid peptide(s) in *Squilla mantis* ganglia. *Neuropeptides*, 7: 281-289.

PAGES, M., F. JIMENEZ, A. FERRUS, G. RAMIREZ y E. GELPI (1983). Enkephalin-like immunoreactivity in *Drosophila melanogaster*. *Neuropeptides*, 4: 87-89.

PASTERNAK, G., R. GOODMAN y S.H. SNYDER (1975). *Life Science*, 16: 1765-1769.

PEEKE, H.V.S. y L. PETRINOVICH (1984). *Habituation, sensitization, and behavior*, New York: Academic Press.

PERT, C.B. y S.H. SNYDER (1973a). *Science*, 179: 1011-1013.

PERT, C.B. y S.H. SNYDER (1973b). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 10: 868-872.

PERT, C.B., D.L. BOWIE, A. PERT, J. MORRELL y E. GROSS (1977). *Nature* (London), 269: 73-74.

PERT, C.B. y D.B. TAYLOR (1979). En *Endogenous and Exogenous Opiates Agonist and Antagonist*, ed. E.L. Way; pp.87-90. Pergamon Press, New York.

RAKITIN, A. y H. MALDONADO (1990). Habituation and sensitization to an electrical shock in the crab *Chasmagnathus*: effect of background illumination. Manuscrito sometido para su publicación.

REMY, C. y M.P. DUBOIS (1981). Immunohistological evidence of methionine enkephalin-like material in the brain of the migratory locust. *Cell Tissue Res.*, 218: 271-277.

REYNOLDS, A.K. y L.O. RANDALL (1957). Morphine and allied drugs. Toronto: University of Toronto Press.

ROMANO, A., M. LOZADA y H. MALDONADO (1990b). Nonhabituation processes affect stimulus specificity of response habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Behavioral Neuroscience*, en prensa.

ROSECRANS, J.A. y W.T. CHANCE (1976). Emotionaly-induce antinociception. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 2: 919-926.

ROSS, R.T. y A. RANDICH (1984). Unconditioned stress-induced analgesia following exposure to brief footshock. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Processes*, 10: 127-131.

SANDEMAN, D.C. (1967). The vascular circulation in the brain, optic lobes and thoracic ganglia of the crab *Carcinus*. *Proc. Roy. Soc. B*, 168: 82-90.

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

SHERRINGTON, C.S. (1906). The integrative action of the nervous system. New Haven, CT, USA: Yale University Press.

SIEGFRIED, B., H.R. FRISCHKNECHT, P. KULLING y P. GAUDENZ WASER (1987). Behavioral coping and analgesia in the attacked mouse. En *Neurosciences & Behavior*, ed. M.L. Brandao; pp. 175-187. Victoria, ES, Brasil: Grafica da UFES.

SIGFRIED, B., C.A. NETTO e I. IZQUIERDO (1987). Exposure to a novelty induces naltrexone-reversible analgesia in rats. *Behavioral Neuroscience*, 10: 383-386.

SIMON, E.J., J.M. HILLER y I.C. EDELMAN (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69: 1835-1846.

SMITS, S.E., E. TAKEMORI (1970). Quantitative studies on the antagonism by naloxone of some narcotics and narcotics-antagonist analgesic. *Br. J. Pharmacol.*, 39: 627-638.

STEFANO, G.B. y E.J. CATAPANE (1979). Enkephalins increase dopamine levels in the CNS of a marine mollusc. *Life Science*, 24: 1617-1622.

STEFANO, G.B. y B. SCHMARRER (1981). Haigh affinity binding of the enkephalin analog in the cerebral ganglion of the insect *Leucophea maderae* (Blattaria). *Brain Research*, 225: 107-113.

TALLARIDA, R.J., C. HARAKAL, J. MASLOW, E.B. GELLER y M.W. ADLER (1978). The relationship between pharmacokinetics and pharmacodinamic action as applied to *in vivo* pA2: application of the analgesic effect of morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 206: 38-45.

TAYLOR, R.C. (1971). Instrumental conditioning and avoidance behavior in the crayfish. *Journal of Biological Psychology*, 13: 36-41.

TERENIUS, L. (1973). Caracteristic of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta of Pharmacology and Toxicology*, 33: 74-79.

TERENIUS, L. y A. WAHLSTROM (1975a). *Acta Physiol. Scand.*, 96: 76-81.

TERMAN, G.W., Y. SHAVIT, J.W. LEWIS, J.T. CANNON y J.C. LIEBESKIND (1984). Intrinsic mechanism of pain inhibition: activation by stress. *Science Wash.DC*, 226: 1270-1273.

THOMPSON, R.F. y SPENCER, W.A. (1966). Habitution: A model phenomenon for the study of neural substrates of behavior. *Psychological Review*, 173: 16-43.

TOMSIC, D. y H. MALDONADO (1990). Central effect of morphine pretreatment on short- and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 36: 787-793.

TOMSIC, D., H. MALDONADO y A. RAKITIN (1990). Morphine and GABA: effects on perception, escape response and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. Manuscrito sometido para publicación.

TREISMAN, M. (1984). A theory of the mechanism of habituation: the assignment of responses to stimuli. En *Habituation, Sensitization and Behavior*, ed. H.V.S. Peeke y L. Petrinovich; pp. 57-101. Orlando: Academic Press.

VERBEKE, M. y P. JACQUIM (1985). Cinetique de l'effec pharmacologique. En *Traite de Biopharmacie et Pharmacocinetique*, ed. J. Marc Aiache et al.; pp. 177-200. Quebec: Les Presses De L'Universite De Montreal.

VERHAERT, P. y A. DE LOOF (1985). Immunocytochemical localization of methionine-enkephalin-resembling neuropeptide in the central nervous system of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Comp. Neurol.*, 239: 54-59.

WARREN, P.H. y J.R. ISON (1982). Selective action of morphine on reflex expression to nociceptive stimulation in the rat: Contribution to the assessment of analgesia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 16: 869-875.

WEISS, J.M., E.A. STONE y M. HARRELL (1970). Coping behavior and brain norepinephrine level in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology,* 88: 153-160.

WHITEHOUSE, W.G., J. WALKER, D.L. MARGULES y P. BERSH (1983). Opiates antagonist overcome the learned helplessness effect but impair competent escape performance. *Physiology and Behavior,* 30: 731-734.

WINE, J.J. y F.B. KRASNE (1982). The cellular organization of crayfish escape behavior. En *The Biology of Crustacea. Neural Integration and Behavior*, ed. D.C. Sandeman y H.L. Atwood; pp. 241-292. New York: Academic Press.

YERKES, R.M. y J.D. DODSON (1908). The relation strength of stimulus to rapidity of habit-formation. *Journal of Comparative and Neurological Psychology*, 18: 458-482.

ZABALA, N.A., A. MIRALTO, H. MALDONADO, J.A. NUNEZ, K. JAFFE y L. CALDERON (1984). Opiate receptor in praying mantis: effect of morphine and naloxone. *Pharmachol. Biochem. Behav.*, 20: 683-687.

Buenos Aires, 5 de Marzo de 1991

Señores Miembros de la Sub-Comisión de Doctorado del Departamento de Ciencias Biológicas,
Presente

De mi consideración:

Con esta carta acompaño la presentación del manuscrito de Tesis del Lic Arturo Romano, sobre el tema "Función de los opiáceos en el comportamiento defensivo del cangrejo Chasmagnathus granulatus", la qye se ha realizado bajo mi dirección en el Laboratorio de Fisiología del Comportamiento del Departamento.

Dr. Héctor Maldonado