



**Universidad de Jaén**

Escuela de Doctorado

**TESIS DOCTORAL**



**HABITUACIÓN EN LA LOMBRIZ DE TIERRA**  
Habituation in the earthworms

**PRESENTADA POR:  
DAVID REYES JIMÉNEZ**

**DIRIGIDA POR:  
CONCEPCIÓN PAREDES OLAY**

**JAÉN, 6 de febrero de 2022**



### **Autorización**

María Concepción Paredes Olay, Profesora Titular de Psicología Básica de la Universidad de Jaén,

Certifica que:

La Tesis Doctoral titulada: *Habituation in the earthworms*, realizada por el doctorando David Reyes Jiménez, ha sido elaborada bajo mi dirección y reúne las condiciones de calidad, originalidad y rigor científico necesarias para que se proceda a su defensa pública de acuerdo con la legislación vigente.

Jaén, a 6 de febrero de 2022



**“Es dudoso que existan otros animales que hayan jugado un papel más importante en la historia del mundo que estas criaturas de organización tan simple”**

*Charles Darwin, 1881*

## **Agradecimientos**

Este apartado me permite recordar a las personas que me han acompañado en esta larga aventura. Tan larga ha sido, que hasta me resultaría imposible nombrar a todos los que han hecho posible que esté hoy aquí. No obstante, y con el perdón de los olvidados, quiero nombrar a algunos cuya aportación se merece, como mínimo, aparecer en esta tesis.

Para comenzar, agradezco al grupo de investigación Hum-642 hacer posible este trabajo. La ayuda brindada por Juanma, José Enrique, Carmen y María José han supuesto un escalón básico para mi carrera investigadora. De un modo más especial, agradezco profundamente a mi directora Marichi el tiempo, esfuerzo y paciencia que ha tenido conmigo todos estos años. Por enseñarme lo que es ser un buen investigador, que entienda, perfeccione y persevere en su trabajo. Aún recuerdo aquel “voy a abrir una línea nueva de estudio con lombrices” que, sin saberlo, supondría el estar horas en el laboratorio mirando como una lombriz se asusta de una luz. Gracias a los compañeros de la SEPC por enseñarme cada año nuevos contenidos y formas de investigar. Gracias a Nacho, José, Marcial, Sergio, Roberto, Gonzalo, Bea, Judith, Ina y Sergio porque de cada uno he aprendido algo diferente y que siempre quedará dentro de mí.

Seguidamente y como no puede ser de otra forma, muestro mi gratitud a mi familia. Mis padres por su incondicional apoyo, mis abuelos, mis tíos y mis primos que sólo tenían para mí palabras de esperanza y ánimo. Tampoco quiero olvidarme de mi hermano, quien me hizo ver la verdadera importancia de lo que estaba a punto de conseguir y lo orgulloso que me haría sentir. Además de ellos y en una fase más avanzada, gracias a mis sobrinos Blanca y Mateo por hacerme ver que debo ser un ejemplo para ellos.

También gracias a mis compañeros: El despacho 017 por amenizar y enriquecer este largo camino. A Sebas y Juanan, por compartir tantas horas en el laboratorio a mi lado. Gracias a Pedro, Gabi y José Andrés, por ser unos ejemplos a seguir y unos duros rivales en los debates acerca del aprendizaje mientras sosteníamos una cerveza en la mano. Y como no puede ser de otra forma, gracias

a mis amigos por pensar que soy un genio aún sin tener ni idea de lo que hago. Gente guapa, Will, Vicente, Ricardo, por escuchar todos mis pesares que repetía sin parar.

Para finalizar, agradezco a unas personas muy importantes para mí: Noelia, Eli y Juanjo, quienes a través de su cariño y ayuda en absolutamente todo lo que necesitaba, me han ayudado a seguir adelante.

Gracias a todos, y en especial a ti, abuelo.

# Índice

ABSTRACT	5
CAPÍTULO I. LA HABITUACIÓN Y SUS CARACTERÍSTICAS APLICADAS A LOS INVERTEBRADOS	9
CAPÍTULO II. ESTUDIOS PARAMÉTRICOS	63
CAPÍTULO III. ESTUDIOS SOBRE RECUPERACIÓN ESPONTÁNEA	88
CAPÍTULO IV. GENERALIZACIÓN DE LA HABITUACIÓN	108
CAPÍTULO V. ESTUDIOS SOBRE LA ESPECIFICIDAD CONTEXTUAL DE LA HABITUACIÓN EN LA LOMBRIZ DE TIERRA.	132
Experimental study I: contextual specificity of habituation in earthworms	144
Experimental study II: effects of pre-exposure and post-exposure of the context in habituation of the retraction response in earthworms ( <i>lumbricidae</i> )	158
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	169
CAPÍTULO VII. RESUMEN EXTENDIDO	175

## **Abstract**

Habituation is one of the simplest learning phenomena and whose importance is critical for the survival of organisms. This tool bases its adaptive value on the ability of organisms to reserve attentional resources to be able to use them in a situation of need when a relevant stimulus is presented (Thorpe, 1963). Habituation has occurred in all animal species on the planet, both chordates and invertebrates (Perry, Barron & Cheng, 2013). The importance of the latter lies in their neural simplicity and in the relative ease of studying the neural bases of learning compared to vertebrates. Although several studies have been carried in order to explore the structures involved in habituation, these neural bases changed attending to the paradigm employed, showing different mechanisms involved in the same phenomena when it is studied with different variables (McDiarmid, Yu & Rankin, 2019). Therefore, the behavioural study of animals would be necessary, reaching a common paradigm that allows the study of the mechanisms involved in habituation.

Annelids constitute a vast phylum within the animal kingdom, including species that habit both sweet aquatic environments, such as seas or land. Several authors have considered earthworms a good subject to carry out studies of both associative (Abramson & Buckbee, 1995; Ratner & Miller, 1959) and non-associative (Kuenzer, 1958; Gardner, 1968) learning.

The general goal of this doctoral thesis was to analyse the characteristics of the habituation in the earthworm. With this aim, several experiments were designed to achieve a proper paradigm for the study in earthworms. After it, we adapted the experimental setting to the procedures need for the study of the characteristics of the habituation. In this thesis we present the results of the experiments about the curve of habituation, spontaneous recovery, inter trial intervals effect, generalization and context specificity of the habituation.

The dissertation starts with a definition of the habituation, its importance as adaptive tool and its characteristics, followed by a brief revision of studies carried on invertebrates. To explain this learning phenomena, we describe three accepted theories of the habituation: Dual processes theory (Graves & Thompson, 1970), Sometimes Opponent Processes SOP (Wagner,

1981) and Comparator stimulus-model (Sokolov, 1963).

Several studies were carried out to explore the cited characteristics. Five of them related with the study of the context specificity were wrote and published as two articles in scientist journals.

In general, the results show that earthworms were able to learn and habituate. Regarding the characteristics studied, our results show evidence of the spontaneous recovery of the withdrawal response to a vibration and a light, a descent in the number of responses along the training and the generalization of the habituation from one stimulus to another. Nevertheless, the effect of the inter trial interval did not appear with the parametric conditions employed. Finally, the context specificity in a short term habituation was demonstrated employing an odour as context but, in order to explain this effect, we run two experiments with the pre and post exposition of the context to the habituation. The results suggested that both mechanisms (self-priming habituation and generated priming of the habituation) were available in the training but the pre-exposure to the context may be affecting the use of each of them. Also, the conclusions lead to an interpretation of the results in terms of salience. In the case of pre-exposure of the context, its salience would be decaying, making it more difficult to associate with the habituated stimulus. On the contrary, when there is no pre-exposure, habituation would be produced by the establishment of the association between the context and the stimulus. This association would be degraded by exposure to the context after habituation (extinction). The importance of these findings supports of the hypothesis that earthworms were able to process the information of the context and also it supports the idea of an associative nature of the habituation under determined circumstances.



# **Capítulo I: La habituación y sus características aplicadas a los invertebrados**

La habituación se define como una disminución en la respuesta que resulta de una estimulación repetida y que no puede ser explicada en términos de fatiga o adaptación sensorial (Thorpe, 1963; Thompson y Spencer, 1966; Groves y Thompson, 1970; McDiarmid, Yu y Rankin, 2019). Para ilustrar el valor adaptativo de dicho fenómeno, basta con observar a los animales que viven en libertad y que son capaces de dejar de responder a un ruido constante que no suponga una amenaza como, por ejemplo, el canto de los pájaros. Sin embargo, en otras ocasiones, la presentación de un estímulo generalmente intenso provoca un aumento en el nivel de respuesta del sujeto en lugar de un descenso. Esto recibiría el nombre de efecto de sensibilización. De hecho, la teoría del Proceso Dual (Groves y Thompson, 1970) trata de explicar el fenómeno de la habituación considerando que tanto habituación como sensibilización son dos procesos que ocurren de manera simultánea y la propia disminución de respuesta es el resultado de la interacción entre ambos procesos.

Los fenómenos de habituación y sensibilización son considerados aprendizajes simples o no asociativos ya que modifican la conducta de un sujeto sin llevar a cabo ningún emparejamiento entre estímulos. A diferencia de estos, cuando se asocian dos o más estímulos se estaría hablando de un aprendizaje asociativo.

La principal característica que se debe señalar de la sensibilización es que no es específica del estímulo, es decir, el aumento en el nivel de respuesta ante un determinado sonido que es presentado de forma repetida seguirá mostrándose incluso cuando el sonido que se le presenta al sujeto cambie por otro diferente. Esta característica se observa por ejemplo tras ser sometidos a la presencia repetida del ruido de los cláxones de los vehículos en un atasco. Este ruido repetido produce una respuesta de enfado cada vez mayor. Si en este momento se presenta un nuevo estímulo como es el ladrido de un perro, esta respuesta de enfado será mayor que si el mismo ladrido fuese presentado en una situación donde no se hayan presentado los ruidos de claxon. Si bien la sensibilización ha recibido una considerable investigación (Antonov, Kandel y Hawkins,

1999; Carew, Castellucci y Kandel, 1971; Philips et al., 2011) la habituación consta de otras características muy importantes que han motivado el estudio de la misma y que han generado una amplia cantidad de investigaciones. En esta tesis nos centraremos en el estudio de la habituación, la cual es importante por diversos motivos.

La principal razón por la que la habituación ha recibido tanto interés en el campo de la investigación es su enorme relevancia biológica, ya que permite a los organismos reducir la cantidad de recursos atencionales que prestan a un estímulo inocuo (Lorenz, 1965; Thorpe, 1963), reservándolos para atender a estímulos relevantes y aumentando así sus probabilidades de supervivencia y apareamiento. Esta reserva de los recursos atencionales se manifestaría de tres formas (Wyers, Peeke y Herz, 1973): 1) Orientando las reacciones de alarma, escape, defensa e inquietud sólo a la presencia de un estímulo nuevo e infrecuente como podría ser la aproximación de un depredador. 2) Eliminando las conductas exploratorias o de alarma ante estímulos pertenecientes al ambiente familiar a los cuales el sujeto deja de prestar atención por considerarlos parte de su entorno seguro. 3) Respondiendo sólo en las situaciones donde el estímulo se presente de forma clara (Thorpe, 1963).

No obstante, existe evidencia de la posibilidad de que un organismo se habitúe a estímulos nocivos e incluso a un depredador sin contradecir el principio de supervivencia (Balderrama y Maldonado, 1971). La explicación de este hecho consiste en el cese de respuesta del animal ante dicha estimulación con el fin de centrar sus esfuerzos en optimizar una respuesta de huida o en el análisis de los aspectos de la situación de peligro (McDiarmin, Yu y Rankin, 2019; Wyers, Peeke y Herz, 1973). Por ejemplo, imaginemos una situación de peligro donde una paloma no huye inmediatamente al ver a un gato. Esto puede ser debido no a que se presente de forma recurrente, sino porque la paloma ha sido capaz de analizar aspectos como la distancia del depredador, la cual resulta suficiente para escapar en caso de ataque, o el tipo de movimiento del mismo, como no estar en postura de acecho.

La habituación, además de tratarse de un fenómeno de aprendizaje universal dentro del reino *Animalia* (Perry, Barron y Cheng, 2013), cobra especial interés en su estudio con invertebrados por diversas razones. En primer lugar, la simplicidad de su sistema neural ha hecho de los invertebrados un modelo ideal para el estudio de las bases neurales y bioquímicas del aprendizaje (Abrams y Kandel, 1988). Uno de los experimentos pioneros para investigar las bases neurales de la habituación fue el llevado a cabo por Carew, Pinsker y Kandel (1972) con el molusco marino *Aplysia*. Este trabajo estudió la aplicación repetida de una estimulación táctil en el sifón del animal mostrando que, conforme avanzaba el entrenamiento, la respuesta de contracción del sifón y las branquias que mostraban al ser tocadas iba desapareciendo. Además, los experimentadores aplicaron la estimulación durante varias sesiones espaciadas en el tiempo encontrando lo que se explicará más adelante como habituación a largo plazo. De forma más específica, se observó que la actividad de disparo de las motoneuronas branquiales disminuyó en respuesta a la repetida estimulación táctil. La causa de esta bajada se relacionó a su vez con un decremento de la eficacia de las sinapsis sensoriomotoras cuando se presentaban los estímulos en cortos periodos de tiempo mostrando, como consecuencia, la desaparición de la respuesta observable.

Es importante señalar en este campo que las bases biológicas de los organismos en los que se muestra la habituación tienen mecanismos tanto comunes como diferentes. Estos mecanismos diferentes propios de cada especie se deben a los sistemas sensoriales que hayan desarrollado y que determinan su forma de adaptación al medio. Sin embargo, las características comportamentales de la habituación son compartidas entre todos los sujetos, mostrando una respuesta de huida, evitación o defensa ante un estímulo peligroso. Por ejemplo, no responderían igual ante una luz una lombriz fotófoba que un mosquito. Dicha luz es capaz de matar a la primera mientras puede producir atracción en el segundo. Por el contrario, si se mostrase un estímulo que puedan representar un peligro para ambas especies como es el ejemplo de un depredador natural

en cualquiera de sus medios, la respuesta de evitación o de huida estaría presente en ambas especies ya que comparten la función de garantizar la supervivencia.

Debemos señalar que a lo largo de esta tesis utilizaremos el término invertebrado para referirnos a la agrupación de un amplio número de especies que carecen de vértebras, por oposición a los vertebrados. Aunque no es un término apropiado a nivel taxonómico, sigue siendo de uso común en la biología contemporánea en el sentido descrito.

Sería conveniente reflexionar en este capítulo acerca tanto del estado actual del conocimiento de las bases neurales como de los aspectos comportamentales de la habituación. Como ya se ha introducido anteriormente, el estudio con la *Aplysia* fue de los primeros en centrarse en las bases neurales del aprendizaje en invertebrados. De hecho, sentó las bases para una amplia investigación que ha llevado a explorar más modelos animales como es el caso del nematodo *Caenorhabditis elegans*. El estudio del *C. elegans* ha generado una vasta investigación que ha permitido la descripción del mapa de conexiones neuronales o conectoma de dicho organismo (Cook et al., 2019).

Debido a este interés en el estudio de las bases neurales de la conducta, es posible encontrar una gran cantidad de investigaciones que descubren las bases genéticas y las redes neurales responsables de la habituación, las cuales varían en función de la duración del estímulo y de su intervalo entre ensayos (a partir de ahora IEEs) entre otros (Beck y Rankin, 1995; Beck y Rankin, 1997; McDiarmid, Yu y Rankin, 2019; Rankin, 2000; Rankin y Broster, 1992; Rankin et al, 2009; Rose y Rankin 2001). Por ejemplo, Sanyal et al. (2004) comprobaron que, tras habituar una respuesta de retirada del nematodo *C. elegans* ante una vibración, la dopamina Dq del mismo tenía un papel fundamental en la probabilidad de que un sujeto muestre una determinada respuesta, pero no en la magnitud de la misma. Asimismo, en una investigación posterior, se encontró que dicho neurotransmisor sólo afecta a la habituación con cortos periodos entre presentaciones del estímulo a habituar, pero no con periodos largos (Kindt et al., 2009). Esta

diferenciación del papel de la dopamina es solo un ejemplo que pone de manifiesto la existencia de distintos mecanismos neurales para el fenómeno de la habituación y que han ido surgiendo como resultado de las demandas comportamentales en el proceso de adaptación del sujeto a su medio. Todos estos hechos hacen necesaria una investigación más profunda atendiendo ya no solo a un aspecto neural, sino focalizando la atención en un punto de vista comportamental, el cual podría ayudar a alcanzar un modelo que explique el fenómeno de la habituación de forma general integrando las distintas características con los mecanismos implicados (McDiarmid, Yu y Rankin, 2019).

Otra ventaja que representan los invertebrados en el estudio de la habituación corresponde a su practicidad. Diseñar experimentos que permitan explorar dicho aprendizaje utilizando estos sujetos representa una mayor facilidad y accesibilidad tanto en términos económicos como en el diseño de diferentes procedimientos (Abramson, 1994).

El presente trabajo tiene por tanto un doble objetivo. Primero se pretende desarrollar un paradigma experimental para el estudio de la habituación con la lombriz de tierra y, segundo, analizar el aprendizaje de la habituación en este invertebrado atendiendo a las principales características del mismo. Dichas características han sido ampliamente estudiadas y descritas en la literatura (Groves y Thompson, 1970; Thompson y Spencer, 1966; Abramson, 1994; McDiarmid, Yu y Rankin, 2019; Rankin et al., 2009):

- i) *La habituación se define como el decremento en el nivel de respuesta o intensidad de la misma ante la presentación repetida del estímulo. Dicho decremento muestra un curso exponencial negativo en relación al número de presentaciones del estímulo. Sin embargo, aunque la respuesta descienda de forma exponencial negativa, hay datos en los que se encuentra un aumento inicial de la respuesta (sensibilización) que desaparece con la presentación repetida del estímulo como ocurre en el estudio de Rakitin, Tomsic y Maldonado (1991). Estos autores*

observan un aumento en la respuesta de escape ante la presentación de un choque eléctrico en cangrejos justo antes de empezar a disminuir. Rankin et al. (2009) sugieren que no siempre se producirá una habituación con un curso exponencial, sino que puede mostrarse de un modo lineal.

- ii) *Si la presentación del estímulo se detiene, la respuesta aparecerá pasado un tiempo.* Esta característica ha recibido el nombre de recuperación espontánea y su nivel de recuperación dependerá de diversos factores, siendo mayor con un el intervalo entre ensayos (IEEs) corto durante el entrenamiento, una alta intensidad del estímulo habituado, una corta sobrehabituación o dependiendo del paradigma experimental empleado (Rankin y Broster, 1992). No es posible establecer una duración concreta de la recuperación espontánea debido a que depende de la especie estudiada, el estímulo habituado, el IEEs o el paradigma empleado (Abramson, 1994). Se encuentran estudios de esta característica en numerosos invertebrados como por ejemplo: la *Aplysia*, donde se observa una recuperación de la respuesta de contracción 21 días después de su habituación (Carew, Pinsker y Kandel, 1972), en el poliqueto *Hesperonoë adventor* y su respuesta de huida de una luz 1 día después de ser habituado (Dyal y Hetherington, 1968); la lombriz de tierra y su retracción de la cabeza a los 4 días de la habituación (Gardner, 1968); el protozoo *Stentor coeruleus* y su contracción a las 6 horas del entrenamiento (Wood, 1970a, 1970b); la anémona *Anthopleura elegantissima* y su contracción tras 4 días (Logan y Beck, 1978); en planarias con su respuesta en presencia de una luz a las 7 semanas (Westerman, 1963) y la mantis *Stagmatoptera biocellata*, que muestra una postura defensiva tras 6 días desde que fue habituada (Balderrama y Maldonado, 1971).

- iii) *Si se llevan a cabo varios ciclos alternos de habituación y recuperación espontánea, la velocidad de la habituación será mayor.* Este efecto es conocido como potenciación de la habituación. Esta característica fue descrita por Humphrey (1933) en un experimento con tortugas. El autor administraba estimulaciones táctiles sobre el caparazón de los sujetos y observó cómo los animales introducían las patas dentro del caparazón cuando recibían el golpe. Con el paso de los ensayos, dejaban de responder. Tras unos ciclos de habituación y rehabitación, el autor señala que la habituación de dicha respuesta a los golpes fue más rápida. En la literatura sobre invertebrados se pueden encontrar estudios más recientes sobre esta propiedad en la habituación, concretamente midiendo el nivel de respuesta de frotar las patas traseras en grillos ante determinados ultrasonidos (May y Hoy, 1991), movimiento de nado en la sanguijuela ante una ligera estimulación táctil (Debski y Friesen, 1985) y la velocidad y tiempo necesarios para alcanzar una meta en los poliquetos bajo una luz (Dyal y Hetherington, 1968).
- iv) *Una mayor frecuencia en la presentación de la estimulación conlleva una habituación más rápida y/o pronunciada:* Además de producir una habituación más rápida, la presentación de los ensayos en un tiempo más pequeño resultará en una mayor y más pronta recuperación espontánea que cuando los sujetos son entrenados con un intervalo entre ensayos mayor (Rankin et al. 2009). Rose y Rankin (2001) sugieren que esta característica del intervalo entre ensayos debería ser el método para distinguir entre fatiga y habituación, ya que un IEEs corto producirá antes una recuperación espontánea de la respuesta habituada que un IEEs largo. Esta afirmación pondría en evidencia que dicha recuperación espontánea de la respuesta por sí sola no sería suficiente para distinguir entre fatiga y habituación,

tal y como defendían Harris (1943) y Groves y Thompson (1970), haciendo ver que si una respuesta no se recupera podría deberse a que el entrenamiento de esta respuesta tuvo un intervalo entre ensayos muy demorado y no tanto a la fatiga. Concretamente, Rose y Rankin (2001) realizaron una serie de estudios donde habituaron a los nematodos *C. elegans* a una estimulación táctil o golpes con IEEs diferentes (2, 10, 30 y 60 segundos) y midieron la recuperación de la respuesta tras unos determinados intervalos (30 segundos, 10, 20 y 30 minutos). Las autoras encontraron un efecto del IEEs en la recuperación de las respuestas, siendo esta mayor en los sujetos entrenados con los menores IEEs y no pudiendo ser explicados en términos de fatiga. De hecho, si el mayor decremento en la respuesta producido por IEEs cortos fuera debido a la fatiga, esperaríamos justo el resultado opuesto, esto es, una recuperación más rápida en el IEEs largo.

- v) *Dentro de la misma modalidad sensorial, la habituación será más rápida y/o pronunciada ante estímulos de baja intensidad que ante estímulos de alta intensidad:* Esta característica se muestra en distintos organismos y estímulos. En el ejemplo de la *Hydra*, las descargas de mayor intensidad producían una habituación más lenta que las descargas de bajo voltaje, las cuales provocaban una curva de habituación más pronunciadas (Rushforth, 1965). Un caso similar se observó en planarias (Brown, Dustman y Beck, 1966) ante luces de distintas intensidades. Estos platelmintos, al ser animales sensibles a los estímulos luminosos acabaron habituándose antes a las luces más tenues frente a las más brillantes. En la *Aplysia* (Pinsker et al., 1970) se habituó más rápidamente la respuesta de contracción del sifón y de la branquia ante estimulaciones táctiles débiles en comparación con estimulaciones fuertes. Un resultado similar se encuentra en un entrenamiento con diversas intensidades de sonidos en grillos

(May y Hoy, 1991) y con la presentación de sombras y descargas a cangrejos (Brunner y Maldonado, 1988; Lozada, Romano y Maldonado, 1988). Si los estímulos son muy fuertes, es posible que no se produzcan decrementos observables de la respuesta.

vi) *La recuperación de la respuesta será menor si se continúa con el entrenamiento incluso después de haber conseguido un nivel asintótico de la respuesta:* Esta característica de la habituación es definida como sobrehabituación y es una de las menos documentadas. En la literatura se encuentran los resultados del estudio de Rankin y Broster (1992) donde se habitúa al nematodo *C. elegans* a un estímulo mecanosensorial (golpecitos) que producían una habituación de la respuesta de huida. Los autores encontraron que, a medida que se aumentaba el entrenamiento tras conseguir un nivel asintótico de habituación, más tardaba en aparecer la recuperación espontánea, aunque mostraba una intensidad de respuesta recuperada equivalente. Por el contrario, es posible encontrar el realizado por Gardner (1968) con lombrices de tierra que fueron habituadas a una vibración hasta alcanzar un criterio de diez ensayos seguidos sin respuesta. Tras alcanzar este criterio, se diferenciaban tres grupos: uno de ellos era almacenado de nuevo, otro que recibió 100 ensayos más y, por último, otro grupo recibió 200 ensayos más. Los tres grupos fueron testeados a las 24 horas y no se hallaron diferencias en la intensidad de la recuperación de la respuesta.

vii) *La habituación de un determinado estímulo puede generalizarse a otro estímulo diferente:* Esta característica puede diferenciarse en función de si la generalización de la habituación ocurre de un estímulo a otro de la misma modalidad sensorial (intraestimular) o entre estímulos de distinta modalidad sensorial (entre-estímulos). Según Rankin et al. (2009), la habituación es específica cuando se

presenta un estímulo de la misma modalidad que el original mientras que se generalizará cuando sea de distinta modalidad estimular. Sin embargo, es posible encontrar evidencias de generalización intraestimular en gusanos con luces (Clark, 1960), caracoles utilizando luces y sombras (Cook, 1970), crustáceos con diferentes sombras (Brunner y Maldonado, 1988), grillos con distintos ultrasonidos de diferente frecuencia (May y Hoy, 1991) y con moscas a las que se les presentaba el reflejo de un CD a distintas distancias (Thon y Pauzie, 1984). Por otro lado, la generalización entre estímulos ha sido mostrada en lombrices entre descargas eléctricas y sombras (Clark, 1960), en caracoles entre luz y vibración (Cook, 1970) y en protozoos entre estímulos mecánicos y luminosos (Wood, 1973).

- viii) *La presentación de un nuevo estímulo (generalmente más fuerte) resulta en la recuperación de la respuesta habituada ante el estímulo original.* Este fenómeno se conoce como deshabitación y junto a la recuperación espontánea ha sido considerada la característica más común para comprobar que el descenso en el nivel de respuesta se debía a la habituación y no a la fatiga o adaptación sensorial. La deshabitación tiene la capacidad de eliminar la habituación al hacer que, tras la presentación de un nuevo estímulo, el sujeto recupere su respuesta inicial si se vuelve a presentar de nuevo el estímulo previamente habituado (Humphrey, 1933).
- ix) *La presentación repetida del estímulo deshabitador para interrumpir la habituación, produce un descenso en el efecto de dicho deshabitador.* A esto se le conoce como la habituación de la deshabitación. Ha sido mostrado en caracoles (Humphrey, 1930), los cuales habituaron su respuesta de contracción de los cuernos ante la presentación de una luz. Tras la fase de habituación se les presentaba una bola de acero de 1,5 cm de diámetro como estímulo deshabitador.

El autor encontró que la respuesta se mantuvo habituada tras una presentación repetida de la bola. Con grillos (May y Hoy, 1991) también se describió un efecto de habituación del estímulo deshabitador con la respuesta de frote de patas y un ultrasonido diferente al habituado. Por último, es posible encontrar esta característica de la habituación en cangrejos (Brunner y Maldonado, 1988) donde fueron habituados a una sombra que se presentaba cada 60 segundos. Tras habituar su respuesta de escape, los autores abrían los compartimentos de los sujetos para pinchar sus caparazones con una varilla de plástico, llevando a cabo una deshabitación de la respuesta. Observaron que, con el paso de los entrenamientos, los cangrejos acabaron por no deshabituarse su respuesta.

- x) *Algunos paradigmas experimentales de habituación cuyas sesiones se distancian en el tiempo hacen que el descenso de la respuesta dure horas, días o semanas. Esta persistencia de aspectos de la habituación se denomina habituación a largo plazo: Si se entiende la habituación a corto plazo como el descenso de la respuesta por la exposición repetida a un estímulo, la habituación a largo plazo haría referencia a la disminución en el nivel de recuperación espontánea de la respuesta habituada a través de sucesivas sesiones de habituación a corto plazo. La distinción entre la habituación a corto y a largo plazo, además, reside en la duración de los efectos del entrenamiento siendo este de varios días en la habituación a largo plazo. Esta característica fue revisada por Rankin et al. (2009), quienes citan estudios que muestran evidencia de la misma en el molusco *Aplysia* (Castellucci, Carew y Kandel, 1978; Ezzeddine y Glanzman, 2003) mostrando una disminución de la respuesta de contracción que dura hasta tres semanas. Esta distinción entre habituación a corto plazo (HCP) y habituación a largo plazo (HLP) pone de relieve la complejidad del proceso de habituación, puesto que se ha observado que implica*

diferencias a nivel estructural en el caso de la habituación a largo plazo mientras que supone un cambio en la cantidad de neurotransmisores en la habituación a corto plazo (Castellucci, Carew y Kandel, 1978). Además, a nivel teórico, esta característica pone de manifiesto la naturaleza asociativa de la habituación en distintas circunstancias, tal como sugiere la teoría “Sometimes Opponent Processes” (SOP) de Wagner (1981).

Si bien se define la habituación como un fenómeno de aprendizaje no asociativo, la habituación a largo plazo pone de manifiesto la implicación de asociaciones entre estímulos que permiten el mantenimiento en la memoria de la habituación a la que fue sometido un estímulo. Cuando se dan los parámetros temporales adecuados se produce una asociación entre las claves contextuales y el estímulo. De esta forma, cuando el sujeto vuelva a dicho contexto o situación recordará que se le presentó un estímulo inocuo y, por tanto, si se vuelve a presentar, no producirá una respuesta visible.

Esta teoría de Wagner (1981) tiene varias acepciones como “Sometimes Opponent Processes” o “Standar Operating Processes” (SOP; Vogel, Ponce, y Wagner, 2019; Wagner, 1981; y su versión extendida [AESOP], Wagner y Brandon, 1989; Whitlow y Wagner, 1984; ver también, Uribe-Bahamonde et al. (2019), para un análisis cuantitativo del modelo) y es quizás el modelo más citado para explicar la habituación. Este modelo establece que la representación de cualquier estímulo comprende un conjunto de elementos que pueden localizarse en uno de los tres estados de actividad descritos en la teoría: Inactividad (I), actividad primaria (A1) y actividad secundaria (A2).

El estado de actividad primaria (A1) es el que representa el uso total de los recursos atencionales del sujeto. En él, se encuentran los elementos de un estímulo presente y sólo en este estado es donde un estímulo puede provocar una respuesta observable. En este estado de actividad

1 no hay capacidad para muchos elementos por lo que cobra importancia el estado A2. El estado de activación secundaria (A2) es donde decaen los elementos de un estímulo que deja de estar presente, pero se conserva en la memoria reciente o en un punto periférico de la atención. Este estado puede abarcar muchos más elementos que A1 por lo que el descenso hacia el mismo es rápido para poder centrar la atención del sujeto en los estímulos más relevantes. Por último, el estado de inactividad (I) es donde decaen los elementos del estímulo situado en A2, siendo almacenado en una memoria a largo plazo con una capacidad ilimitada.

La habituación ocurre cuando los elementos de un estímulo son representados en A1 produciendo una respuesta observable por parte el sujeto. Una vez cesa el estímulo, estos elementos decaen a A2 y permanecen latentes durante un corto período de tiempo antes de volver a decaer al estado de inactividad I. Si los elementos del estímulo han decaído a I, cuando se presente de nuevo el estímulo serán llevados a A1 y provocarán la respuesta del sujeto. Sin embargo, la habituación a corto plazo tendría lugar cuando los elementos del estímulo aún no han decaído al estado I, sino que permanecen en la memoria a corto plazo en A2. Si se presenta el estímulo cuando sus elementos aún están siendo procesados en A2, el sujeto no mostrará una respuesta observable.

Esta teoría permite explicar la habituación a largo plazo aludiendo a un mecanismo asociativo. Según la misma, cuando los elementos del estímulo se presentan en A1, estos se presentan también en una situación o ambiente concretos que recibe el nombre de contexto. La presentación repetida del estímulo en el contexto hace que se establezca una asociación entre ambos y que jugará un papel muy importante en el momento de volver a presentar el estímulo en un futuro. La teoría predice que cuando el sujeto vuelve a estar nuevamente en el contexto donde se llevó a cabo la habituación (Contexto en A1), la asociación que se llevó a cabo recuperará los elementos del estímulo habituado al estado A2, haciendo que el sujeto no responda a una presentación del mismo mientras se encuentre en dicho contexto. Como se explicaba al comienzo

del trabajo, la habituación se define como un fenómeno de aprendizaje no asociativo por lo que esta teoría cobra un interés añadido. Además, es posible destacar la importancia no sólo de esta naturaleza asociativa de la habituación sino de la posibilidad de que los invertebrados sean capaces de procesar el contexto, posibilidad cuestionada por algunos autores como Lubow (2010).

Para ilustrar esta teoría se puede recurrir al ejemplo de unos cohetes en la feria de una ciudad. El estallido de los cohetes hará que una persona se sobresalte (coquete en A1) pero deje de hacerlo cuando se presentan de forma repetida (decae a A2) (habituación a corto plazo). Al año siguiente, cuando la persona se encuentre en el contexto de la feria, el estímulo sonoro que representa el estallido del cohete será recuperado en A2, haciendo que no se sobresalte al escucharlo ya que se estableció una asociación entre el cohete y el contexto la primera vez cuando se encontraba en A1 (habituación a largo plazo) (Rosas, García y Callejas, 2005).

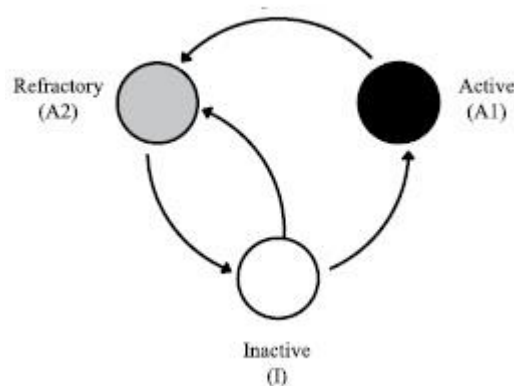


Figura 1. Representación de los estados mentales de activación descritos por Wagner (recuperado de Vogel, Ponce y Wagner; 2019)

Otras teorías clásicas en la explicación del fenómeno de la habituación son la *teoría del Procesamiento Dual* de Groves y Thompson (1970) y la *teoría del Comparador de Sokolov* (1963).

La teoría del Procesamiento Dual (Groves y Thompson, 1970) divide el sistema nervioso en dos subsistemas: “sistema estímulo-respuesta” y el “sistema de estado”. El primero de estos subsistemas representa la conexión nerviosa desde la parte encargada de percibir el estímulo hasta la proyección de la respuesta. Esta ruta recibe el nombre de arco reflejo o ruta estímulo-respuesta (E-R) y, a medida que se activa con un mismo estímulo de forma repetida, va simplificando el procesamiento de esta vía hasta no mostrar una respuesta (habituaación). Dicho estímulo debe ser siempre el mismo, mostrando una especificidad en la habituaación del mismo. Si se presentase uno nuevo, dicho arco reflejo iniciaría la respuesta desde un punto inicial. El segundo subsistema hace referencia al nivel de activación del sujeto, aumentando su respuesta a medida que se presentan estímulos, aunque no sean siempre el mismo, lo que da lugar a la sensibilización. La conducta observada será el resultado de la combinación de ambos procesos de habituaación y sensibilización.

Por último, otra teoría que permite explicar el fenómeno de la habituaación es la teoría de Sokolov (1963), la cual recibe el nombre de la Teoría del Comparador de estímulo-modelo. Esta teoría asume que la presentación repetida de un estímulo conduce a la formación de un modelo mental del mismo. Además, también describe un sistema amplificador que regula la respuesta observable. Cuando se presenta el estímulo, se compara con los contenidos del modelo de dicho estímulo en la memoria. Si hay una coincidencia, el sistema de activación ("sistema amplificador") se inhibirá y la respuesta no será evocada, mostrando lo que conocemos como habituaación. En el caso de que el estímulo presentado no coincida con el modelo formado, se generará una respuesta producida por el sistema de activación. También puede darse el caso de que el estímulo integrado en el modelo mental conste de varios elementos como intensidad, duración, etc. De esta forma, cuando se presente un estímulo similar que varíe en algunos de estos elementos hará que se produzca una respuesta observable pero no tan intensa como la que podría ocasionar un estímulo totalmente diferente.

Estas tres teorías son conocidas como las teorías clásicas de la habituación y son las más aceptadas para explicar este aprendizaje. No obstante, existen también teorías centradas en la explicación de los mecanismos neurales de la habituación y que son conocidas como teorías moleculares de la habituación (ver Thompson, 2009).

## **Habitación en invertebrados**

La habitación es un fenómeno básico a la vez que universal, presente en toda la escala evolutiva y en todas las especies de invertebrados (Perry, Barron y Cheng, 2013). En el seno de la Neurociencia, una parte considerable de la investigación con invertebrados se ha centrado en el estudio de estos como modelos simples de las bases biológicas de la conducta. Por ejemplo, en un reciente volumen editado por Menzel y Benjamin (2013) se presentan los principales avances en el estudio de las bases neurales del aprendizaje y la memoria de distintos modelos de animales invertebrados (nematodos, moluscos, crustáceos e insectos). No obstante, desde el propio campo se advierte del peligro de caer en el reduccionismo y de la necesidad de contar con modelos detallados de conducta que permitan relacionar los circuitos neurales con predicciones conductuales (Krakauer et al., 2017). En el caso concreto de la habitación, los estudios que muestran la complejidad de los múltiples mecanismos implicados en la misma deben complementarse con la descripción de sus características a nivel comportamental para poder entender su valor adaptativo (McDiarmaid, Yu y Rankin, 2019).

Además, en los últimos años también se ha puesto de manifiesto la pertinencia del estudio del aprendizaje en invertebrados para entender el origen y las bases filogenéticas de la cognición (Álvarez, Loy y Prados, 2017; Loy et al., 2021). Desde un punto de vista estrictamente psicológico, el estudio de los procesos de aprendizaje en invertebrados resulta fundamental para comprender los cimientos de las capacidades cognitivas superiores (razonamiento, lenguaje, ...) y para entender la continuidad filogenética de las habilidades cognitivas entre las distintas especies animales, así como la relación entre los procesos de aprendizaje asociativo y no asociativo. En consecuencia, ya no se trata tanto de considerar los invertebrados como modelos simples de las bases biológicas de la conducta, sino de considerarlos como modelos simples de las bases conductuales de la cognición.

Esta es la perspectiva de estudio que se adopta en esta tesis, que se puede definir como *cognitivista* (Loy et al., 2021). Partimos de considerar a los animales (incluidos los invertebrados) como sujetos cognoscentes, que van construyendo su conocimiento del mundo que les rodea y reaccionando a los estímulos mediante el comportamiento adaptativo. La forma más básica de conocimiento es la de “entrar en contacto” con lo que nos rodea. Lógicamente ese contacto se establecerá a través de los órganos sensoriales del organismo en cuestión y serán sus propias características físicas las que determinarán su grado de conocimiento del mundo. Esto es, no va a ser lo mismo el conocimiento de una lombriz que el de un chimpancé o un humano.

Por lo tanto, el establecimiento del “contacto” o la “detección” es el primer paso en la adquisición de conocimiento por parte de cualquier organismo y la habituación es la forma más básica de asimilar dicho contacto. Cuando la luz se presenta a una lombriz esta puede constatar “que está ahí pero no pasa nada” (habituación) o que “está ahí y me molesta” (sensibilización). La relación que el organismo establezca con el estímulo en cuestión dependerá de varios factores como pueden ser los parámetros temporales en la presentación del estímulo, las características físicas del mismo, los receptores sensoriales del sujeto, etc.

El objetivo principal de esta tesis es caracterizar el aprendizaje de habituación de las lombrices de tierra ante los estímulos más relevantes de su medio. En este capítulo presentamos una somera revisión de los estudios de habituación con invertebrados. A continuación, se desarrollan los parámetros experimentales adecuados para dicho estudio en la lombriz, seguido de su implementación en la exploración de algunas de las características más relevantes de la habituación: efecto del intervalo entre ensayos, recuperación espontánea, generalización y especificidad contextual.

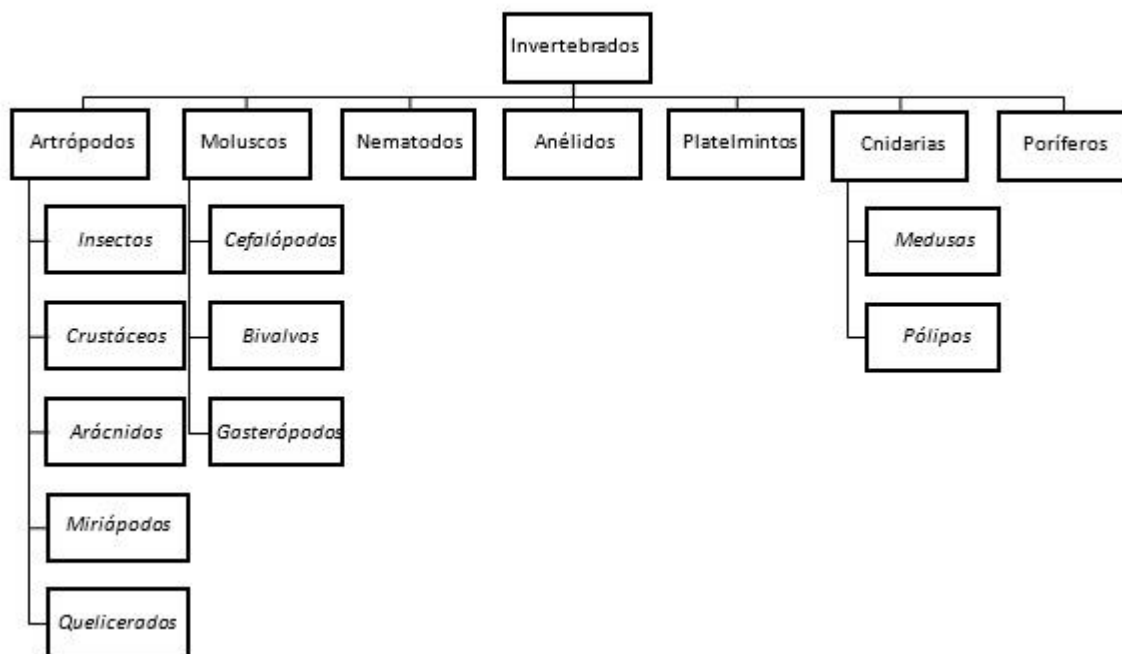


Imagen 1. Clasificación taxonómica de los invertebrados más comunes por filo y clase (Brusca y Brusca, 2005).

En la imagen 1 se presenta un resumen de la clasificación taxonómica de los filos y clases (cursiva) de los invertebrados más comunes.

### *Artrópodos*

#### *Insectos*

Dentro del filo de los artrópodos podemos destacar un experimento llevado a cabo con mosquitos *Aedes aegypti* (Baglan, Lazzari y Guerrieri, 2017) donde se muestra un efecto de habituación de la respuesta de escape ante una señal de peligro. Los mosquitos eran situados en placas de Petri sobre las cuales se proyectaba una luz. La señal a la que se habituaron fue una sombra que se presentaba de forma intermitente al colocar una cartulina negra de 2 cm<sup>2</sup> entre la luz y la placa. Tras varios ensayos, el nivel de respuesta de los mosquitos decayó, pero no fue

hasta la recuperación de la respuesta producida por una deshabitación cuando los experimentadores concluyeron que efectivamente se trataba de una habituación de la respuesta de evitación. Dicha deshabitación consistió en la presentación de un nuevo estímulo mecánico (una vibración).

Otro paradigma experimental para estudiar la habituación se muestra con la mosca de la fruta o *Drosophila melanogaster* (Duerr y Quinn, 1982). La administración de una solución de azúcar en una de las patas donde tienen receptores del sabor elicita una respuesta de extensión de la probóscide. Antes del entrenamiento las moscas eran saciadas de toda sed para evitar que la solución acuosa pudiese tener un valor motivante en algunos de los sujetos. Tras 10 minutos, el 70% de las moscas mostraron que dicha respuesta se redujo hasta el 46% de la respuesta inicial. La disminución de la respuesta no se explicó en términos de saciación ya que ningún sujeto pudo consumir dicha solución al sólo estar presentada en las patas y fuera del alcance de la probóscide.

También se ha mostrado habituación de la respuesta de extensión de la probóscide a una dosis baja de azúcar la abeja *Apis mellifera L.* (Braun y Bicker, 1992; Haupt y Klemm, 2005). Dicha habituación se observa tras un entrenamiento de treinta ensayos en el caso del estudio de Haupt y Klemm (2005), el cual que produjo, además, un descenso en la respuesta de movimiento de las antenas. La habituación a ambas respuestas desaparecía ante un aumento del nivel de azúcar que funcionó como estímulo deshabitador.

Siguiendo con la clase de los insectos, Balderrama y Maldonado (1971) mostraron un efecto de la habituación de la respuesta defensiva de las mantis *Stagmatoptera biocellata* ante la presencia de tres especies de pájaros (depredadores naturales de la mantis). Dicha respuesta fue medida por la inclinación de las patas hacia los estímulos y encontraron una relajación de la misma con el paso de los ensayos. Además de mostrar un descenso en esta respuesta, percibieron una menor duración de la misma y un aumento de las respuestas definidas como “incompletas”.

Además, los grillos *Teleogryllus oceanicus* muestran habituación de su respuesta de movimiento metatorácico de las patas. May y Hoy (1991) mostraron que tras someter a los grillos a sesiones donde se inducían ultrasonidos aversivos, estos descendían su respuesta de movimiento de las patas de forma exponencial. De este experimento también se muestran resultados como la aparición de recuperación espontánea, la influencia del intervalo corto entre ensayos para alcanzar una habituación más rápida y eficiente, la influencia de la baja intensidad del estímulo para lograr una habituación más rápida, la existente generalización de la habituación a otro estímulo similar, la deshabituación y la habituación del estímulo deshabituador.

Incluso la polilla *Chaetopteryx villosa* también ha sido estudiada con otro diseño experimental de habituación, mostrando dicho efecto ante la presentación de un estímulo vibratorio (Inozemtsev y Nepomnyashchikh, 2008). En este experimento la respuesta que se pretende habituar es la pasivo-defensiva o inmovilidad que muestran los sujetos ante la presentación de un estímulo amenazante. Para ello, los investigadores miden el tiempo que permanecen inmóviles en una caja-hogar mientras reciben la estimulación, observando como con el tiempo los sujetos retoman su movimiento normal y abandonan dicho refugio mostrando una habituación ante la vibración.

### *Crustáceos*

La cochinilla de humedad (*Armadillidium vulgare*) es una especie perteneciente a la clase de los crustáceos donde se ha estudiado el fenómeno de habituación. Hackl y Robertson (2019) diseñaron un experimento en el que exponían a los animales a una placa con 40°C de temperatura (estímulo a habituar) y registraban si los animales se hacían una bola, la cual es su respuesta defensiva innata. Encontraron que los sujetos que eran situados en la placa durante 20 ensayos con un intervalo entre ensayos de 2 minutos reducían la frecuencia de la respuesta mientras que

un grupo control, cuya exposición consistió en ser situados en la placa 2 veces con un intervalo de separación de 38 minutos, mantuvo la frecuencia de respuesta.

La habituación con cangrejos ha sido tan ampliamente estudiada que incluso ha sido utilizada como herramienta didáctica. Nolan (2004) pidió a sus alumnos que habituasen las respuestas defensivas del cangrejo ermitaño terrestre (*Coenobita clypeatus*). Tras medir la línea base de conductas defensivas, magnitud y tiempo de recuperación de la respuesta normal, pidió a sus alumnos que los habituasen a una estimulación táctil con un pincel. Al ser tocados, los cangrejos se resguardaban mostrando su reacción defensiva natural. Tras varios ensayos, los cangrejos redujeron significativamente las conductas previamente señaladas mostrando un efecto de habituación.

Los experimentos con crustáceos también han evaluado el papel del contexto en el proceso de la habituación (Tomsic et al., 1998; Nolan, 2004; Lozada, Romano y Maldonado, 1990) utilizando, la mayoría de ellos, el cangrejo *Chasmagnathus*. Este animal suele ser presa de las gaviotas que vuelan sobre las costas de tal manera que una sombra proyectada sobre ellos puede funcionar como un estímulo aversivo que provoque una respuesta de escape. Partiendo de esta suposición, Tomsic et al. (1998) habituaron una sombra proyectada sobre los crustáceos con una mecánica descrita en el trabajo de Baglan, Lazzari y Guerrieri (2017). Este procedimiento consistía en situar a los cangrejos de forma individual en un cuenco con una lámpara a 30 centímetros de altura que proyectaba la luz sobre ellos. La sombra aparecía al mover una lámina opaca durante 2,3 segundos entre la luz y el cuenco. Encontraron evidencia de habituación a corto plazo con un intervalo entre ensayos reducido (15 presentaciones en 45 minutos). Posteriormente, estudiaron la existencia de una posible habituación a largo plazo haciendo que los entrenamientos fuesen mucho más espaciados en el tiempo, dando lugar a una habituación más duradera en el paso del tiempo.

Por otro lado, la llamada “gamba asesina” (*Dikerogammarus villosus*) muestra una habituación de su respuesta de escape ante una estimulación táctil con una aguja de punta roma (Briffa, Jones, y Macneil, 2016). En este estudio, la respuesta habituada fue el tiempo que empleaban los sujetos huyendo de la aguja. Esta respuesta fue medida y registrada durante cinco sesiones con una temperatura ambiente y de nuevo medida en otras cinco sesiones con el agua a otra temperatura. Los autores encontraron un descenso en el tiempo que huían los sujetos mostrando una habituación, la cual no se vio afectada por el cambio de la temperatura en el agua, es decir, no se vio afectada por el cambio de contexto.

#### *Arácnidos*

Nelson, Helton y Melrose (2019) realizaron un estudio sobre la habituación en la araña *Trite planiceps*. Este animal depende de su vista para cazar por lo que un estímulo visual en movimiento desencadena una reacción de salto en él. Los autores utilizaron como estímulo visual un círculo negro que recorría el horizonte visual de las arañas. Este estímulo fue presentado durante 160 ensayos. A su vez, registraron las respuestas de movimiento de las arañas durante dichas presentaciones. Utilizaron dos grupos con intervalo entre ensayos (IEEs) de 10 y 20 segundos, encontrando un descenso de la respuesta más pronunciado en el grupo con un IEE de 10 segundos frente al de 20 segundos.

#### *Miriápodos*

Un ejemplo de estudio de la habituación con miriápodos es el llevado a cabo con el *Orthoporus texicolens* (Bullock, McKeown y Robertson, 2009). En este experimento se les presentaron a los sujetos una vibración de 37 Hz y 5 segundos de duración cada 2 minutos durante 40 ensayos. Tras encontrar un efecto del descenso de la respuesta de enroscamiento ante el

estímulo, midieron la recuperación de la respuesta tras 4, 10, 18, 28, 40 y 54 minutos desde que se habituaron. Los autores encontraron una recuperación progresiva de la respuesta a medida que se incrementan los intervalos.

### *Quelicerados*

En el caso del cangrejo de la herradura *Limulus polyphemus* se observa el descenso en el impulso nervioso del ganglio ventral del animal ocasionado por la exposición repetida a un soplo de aire en las branquias (Lahue, Kokkinidis y Corning, 1975). Además de esta habituación los autores describieron un efecto de deshabituación y una relación inversamente proporcional de la frecuencia del estímulo e intensidad con respecto al nivel de decremento de la respuesta.

### **Moluscos**

Dentro de este filo, el gasterópodo *Aplysia californica* ha sido empleada como sujeto experimental por muchos investigadores dadas sus características biológicas, especialmente por tener un sistema nervioso relativamente simple que consta de grandes neuronas identificables y que facilitan su estudio anatómico, biofísico y bioquímico de una forma muy detallada. Byrne, Antzoulatos y Fioravante (2010) pusieron de relieve los cambios neurales producidos en el aprendizaje. El experimento que prueba la existencia del fenómeno de habituación en la *Aplysia* fue realizado por Carew, Pinsker y Kandel (1972) quienes aplicaron una estimulación táctil en las branquias y en el sifón del animal. El entrenamiento que realizaron consistió en aplicar la estimulación diez veces por sesión en cinco sesiones repartidas a lo largo de la semana midiendo las respuestas defensivas de retracción que mostraban los sujetos. Encontraron que la respuesta defensiva disminuía hacia el final del entrenamiento.

Además de la *Aplysia*, el molusco *Tritonia diomedea* ha sido también empleado como modelo para el estudio de las bases neurales del aprendizaje (Frost y Megalou, 2009). Un claro

ejemplo de habituación en este molusco es reportado por Mongeluzi y Frost (2000), quienes aplicaban una solución de cloruro sódico en la cabeza y cola de los sujetos. Vertían una gota cada 5-7 segundos y contemplaban las respuestas de retracción ventral y dorsal. Estas dos retracciones consideraban lo que los autores denominaron “un ciclo completo”. Con el paso de los ensayos se describe un descenso en el número de ciclos completos definiendo un efecto de habituación de dicha respuesta frente a la gota de disolución.

Con respecto a otros estudios que centraron su interés ya no en las bases neurales del aprendizaje sino en el estudio de la conducta natural de los moluscos, se encuentra el realizado con el caracol de estanque *Limnaea stagnalis*, el cual mostró una habituación de la frecuencia y amplitud de su respuesta de retirada ante cuatro estímulos: vibración, luz, shock y sombras (Cook, 1970). La duración de los estímulos era de un segundo con un intervalo entre ensayos de diez segundos y demostraron ser suficientes para desarrollar dicho aprendizaje. Además, este mismo estudio muestran la generalización de la habituación de un estímulo hacia otro en el caso de la luz y las sombras, aunque no se encuentra entre la luz y la vibración.

Con el calamar pálido *Doryteuthis pealeii* se estableció un procedimiento para el estudio del fenómeno de la habituación (Jones, Stanley y Mooney, 2020) a sonidos introducidos en su medio natural. En concreto, los calamares eran expuestos de forma individual a una grabación de sonidos de construcción producidos en la instalación de plataformas marinas. Los experimentadores encontraron un descenso en los cambios de movimiento y liberación de tinta tras el octavo ensayo evidenciando una habituación del animal ante semejante sonido. Un subgrupo de sujetos fue testeado nuevamente tras veinticuatro horas, momento en que se apreciaba una recuperación de la respuesta.

La habituación de los efectos del estímulo auditivo en el medio acuático ha sido estudiada en otros cefalópodos como la sepia *Sepia officinalis* (Samson et al., 2014). De forma similar al anterior, se les administró a los sujetos una estimulación sonora de frecuencias determinadas cuya

repetición provocaba un descenso en las respuestas de huida de los sujetos (liberar tinta y movimientos).

Finalmente hacemos referencia al pulpo *Octopus vulgaris*. Kuba et al. (2006), habituaron la respuesta exploratoria del pulpo ante una presa. En este experimento, los investigadores registraban las conductas de exploración mostradas por los pulpos de un acuario. En primer lugar, el investigador captaba la atención de los pulpos y los guiaba hacia una de las paredes del acuario donde eran grabados durante una hora. En esta pared se les presentaba la forma de un cangrejo (presa natural). Las respuestas exploratorias que medían incluían conductas como pegarse a la pared de cristal, mantener contacto visual o permanecer inmóvil delante del cristal. Durante esa hora, los investigadores segmentaron la sesión en 6 intervalos de 10 minutos, mostrando un decaimiento de las respuestas exploratorias del pulpo a medida que pasaban de intervalo.

### **Platelmintos**

Con respecto al platelminto planaria (*Dugesia dorotocephala*), el estímulo aversivo al que ha sido habituado a largo plazo es la luz con un entrenamiento de veinticinco ensayos al día y mostrando una habituación de la respuesta de evitación (Westerman, 1963). Prados et al. (2020) utilizaron la misma especie de planaria para estudiar la habituación de la respuesta fotofóbica de la planaria. Para ello, colocaban a cada sujeto en un punto de partida cinco segundos antes de que la luz se encendiera. Una vez encendida, cronometraron el tiempo que tardaba el sujeto en alejarse de la zona inicial (3 cm) y la distancia que recorría desde ese momento hasta pasados sesenta segundos. Una vez pasado este tiempo, la luz se apagaba y se dejaba reposar a la planaria durante treinta segundos antes de comenzar con otro ensayo. Tras diez ensayos, se vertían cuatro gotas de agua a un centímetro de distancia de los sujetos, lo que producía una respuesta de retracción y la consecuente deshabitación de la respuesta fotofóbica. Además, con un diseño de habituación a largo plazo donde los sujetos eran entrenados a lo largo de cinco días, se encuentran diferencias

atendiendo al contexto donde se llevaba a cabo el test. Los experimentadores dividieron a los sujetos en el grupo cuya habituación y test se llevarían a cabo en la misma superficie que la superficie de su contenedor hogar y otro en el que las fases se llevasen a cabo en superficies diferentes. Dichas superficies que funcionaron como contextos fueron una superficie rugosa y otra lisa. Prados et al. (2020) hallaron que las planarias mostraban una habituación a largo plazo de su respuesta fotofóbica cuando el experimento se llevaba a cabo en una superficie diferente a la del hogar. Por el contrario, cuando se utilizaban contextos similares al de la caja hogar, la habituación se veía gravemente afectada, lo que muestra un posible efecto del contexto.

### **Cnidarias**

También encontramos ejemplos de habituación en este filo como es el llevado a cabo con la anémona marina *Anthopleura elegantissima* (Logan y Beck, 1978). La respuesta defensiva de este animal fue habituada a una estimulación táctil con dos sesiones de entrenamiento diarias y con un entrenamiento que se alargó durante varios días dando lugar a un efecto de habituación a largo plazo. Los investigadores también muestran los efectos de recuperación espontánea y la potenciación de la habituación. Por otro lado, Rushforth (1965) utilizó un diseño experimental donde presentaba una luz de manera intermitente sobre el hidrozoo *Hydra viridis*. El animal mostraba una respuesta de retracción ante dicha luz, la cual cesó tras la administración del tripéptido proteínico glutatión, cuya función es la de proteger y regenerar las células. Aunque el objetivo de este estudio era analizar el papel del glutatión en la respuesta, el autor concluyó que la mera presentación del estímulo podría explicar en parte el descenso de la respuesta, haciendo referencia a la habituación.

### **Nematodos**

Dentro de este filo, *Caenorhabditis elegans* es el nematodo que ha generado mayor cantidad de investigaciones sobre su conducta, sistema nervioso, mecanismos neurales y

fisiológicos implicados en la misma. Posee el sistema nervioso más pequeño de todos los modelos multicelulares de aprendizaje y memoria, con tan solo 302 neuronas y sus respectivas conexiones, mostrando una habilidad notable para aprender y recordar. Debido a estas características, *C. elegans* ha sido empleado como modelo para el estudio de los mecanismos celulares que subyacen el aprendizaje tanto asociativo como no asociativo (Timbers y Rankin, 2009).

En el caso de la habituación, el paradigma experimental empleado comúnmente en este nematodo consiste en presentar de forma repetida una serie de toques sobre la superficie en la que se encuentra el animal. La respuesta que se mide es la de huida o alejamiento del estímulo. La habituación de dicha respuesta ha sido estudiada en diseños de habituación a corto y largo plazo (Rankin y Broster 1992; Beck y Rankin, 1997; Rankin 2000) definiendo, además, los mecanismos neurales implicados en la habituación de dicha respuesta de huida (Wicks y Rankin 1995, 1996, 1997) y los factores genéticos involucrados de la habituación a corto y a largo plazo (Rankin y Wicks, 2000; Rose y Rankin, 2001).

La influencia del intervalo entre ensayos ha sido también descrita en este animal. Rose y Rankin (2001) describen una mayor recuperación espontánea cuando la habituación se lleva a cabo con un IEEs menor. En su estudio, utilizan intervalos de 2, 10, 30 y 60 segundos, mostrando una mayor recuperación espontánea conforme más corto era dicho intervalo de entrenamiento. Sanyal et al. (2004) estudiaron el papel de la dopamina en los experimentos de habituación a corto plazo. Encontraron que afectaba a la probabilidad de elicitar una respuesta, pero no la magnitud de la misma. Kindt et al. (2007) a su vez, demostró que el procedimiento usado con la dopamina por Sanyal et al. (2004) sólo sería eficaz en un paradigma experimental de habituación con un IEEs de 10 segundos, pero no con uno de 60 segundos.

Otro factor estudiado en el nematodo *C. elegans* ha sido condicionamiento del contexto. Rankin (2000) empleó un compuesto quimiosensorial (NaCh<sub>3</sub>COO) como contexto. En este trabajo encontró que la retención de la habituación era significativamente mayor si el

entrenamiento y las pruebas se realizaban en presencia de la misma señal quimiosensorial. Además, este trabajo demuestra la extinción y la inhibición latente del contexto, lo que indica que el *C. elegans* es capaz de asociar un determinado aprendizaje con un contexto experimental. Es interesante notar que en el estudio de Rankin (2000) este efecto se ha encontrado usando intervalos entre ensayos diferentes (IEEs de 60 y 10 segundos).

La importancia de esta diferencia en cuanto al intervalo entre ensayos se refiere, cobra especial interés al ser considerada como un posible aspecto que permite explicar el descenso de una determinada respuesta como habituación, excluyendo su atribución a términos de fatiga o adaptación sensorial. Para ilustrar esto, es conveniente explicar el trabajo de Rose y Rankin (2001), quienes tras el estudio de los factores que afectan a la recuperación espontánea en el nematodo *C. elegans*, sugieren que la sensibilidad de la recuperación espontánea atendiendo al intervalo entre ensayos del entrenamiento (IEEs) debería ser el método para distinguir entre habituación y fatiga y no la deshabituación como defendían Groves y Thompson (1970). Las autoras afirman que tras una habituación más rápida en los sujetos con un menor IEEs se esperaría encontrar una menor recuperación de la respuesta que en un grupo con un IEEs mayor si esto fuera debido a la fatiga. Sin embargo, los datos, que muestran el resultado opuesto a dicha hipótesis, bastarían para excluir la fatiga como explicación de la reducción de la respuesta.

### **Anélidos**

En la literatura se encuentra evidencia de un efecto de habituación, deshabituación y sensibilización del reflejo de contracción en la sanguijuela *Hirudo medicinalis* (Belardetti et al, 1982; Boulis y Sahley, 1988; Debski y Friesen, 1985; Lockery, Rawlins y Gray, 1985), en su respuesta de doblamiento sobre sí mismas (Lockery y Kristan, 1991) y en su movimiento de nado (Zaccardi et al., 2001). Boulis y Sahley (1988) midieron la respuesta de contracción de este animal ante la presentación repetida de una estimulación táctil cada 2 minutos. Tras varios ensayos, se

observó una disminución en la magnitud de respuesta de retracción. Un hecho interesante informado por estos autores fue que, al acortar el intervalo entre presentaciones a 10 segundos, no encontraron la habituación que sí se daba cuando el intervalo era de 45 e incluso de 360 segundos. Para explicar este hecho, los autores señalan una interacción entre frecuencia e intensidad del estímulo aludiendo que, con un IEEs de 10 segundos, la intensidad debería ser inferior a la empleada para generar una habituación. Por otro lado, Lockery, Rawlins y Gray (1985) realizaron un experimento con un diseño en el que la sanguijuela habitó su respuesta refleja de retracción ante un estímulo luminoso que se presentó cada 20 segundos durante 40 ensayos. Además, la deshabituación se produjo administrando un shock eléctrico en el ensayo 30 de la habituación.

Dyal y Hetherington (1968) habituaron al anélido poliqueto *Hesperonoë adventor* a atravesar una pasarela con una luz (estímulo aversivo) en cuyos extremos se encontraban una zona oscura inicial o de meta. Después de dejar a los sujetos recorrer la pasarela veinte veces al día con un intervalo entre ensayos de cinco segundos durante tres días, encontraron un aumento gradual en el tiempo que les llevaba a los sujetos alcanzar la meta. Los autores atribuyeron este resultado a una habituación de la luz aversiva a pesar de poder explicarse en términos de fatiga o adaptación sensorial.

Dentro de este filo se encuentra la lombriz de tierra, sujeto experimental de los estudios de esta tesis, a la que dedicaremos un apartado posterior.

## Habitación en lombrices

La lombriz de tierra común (familia *Lumbricidae*), ha recibido una moderada atención experimental desde la publicación del libro *La formación del mantillo vegetal por acción de las lombrices* (Darwin, 1881), el cual gozó de gran importancia debido a que despertó el interés por los hábitos de las lombrices y cómo eran capaces de interactuar con el entorno enriqueciendo la calidad del suelo gracias a sus deposiciones o aireándolo por medio de la excavación de galerías subterráneas. Fue a este tema al que Darwin (1881) hizo referencia con su frase “*es dudoso que existan otros animales que hayan jugado un papel más importante en la historia del mundo que estas criaturas de organización tan simple*”. Además de resaltar esta función que realizan las lombrices de tierra, Darwin las presentó como seres inteligentes ya que no sólo buscaban hojas como alimento, sino que también las utilizaban como tapaderas de sus galerías cogiéndolas de la forma más adecuada para tapar las entradas. Este estudio descrito por Darwin (1881), señala que el 80% de las hojas utilizadas para tapar la entrada de la madriguera habían sido introducidas por la punta mientras que sólo un 4% por el tallo y un 16% por el lado. Sin embargo, cuando presentó otro tipo de hoja donde la forma de los tallos encajaba más con la forma de las galerías, las lombrices las agarraban por el tallo en lugar de por la punta. Este resultado fue el que impulsó a Darwin a confirmar la inteligencia de este invertebrado, lo cual motivó estudios posteriores que la exploraban (Yerkes, 1912). Años más tarde, este experimento fue revisado por Zappler (1958) quien además sugiere que las lombrices se guían por señales químicas a la hora de agarrar las hojas. Esta asunción de inteligencia en un invertebrado sería una de las muchas bases sobre las que se irían construyendo los cimientos de lo que hoy conocemos como la Psicología Comparada.

Ya no solo por su función biológica, las lombrices poseen grandes ventajas que favorecen su estudio como puede ser su abundancia en el medio natural de cualquier país mostrando una gran biodiversidad y abundancia (Phillips et al, 2019). Además, la accesibilidad a

las mismas y el fácil manejo las convierte en un sujeto experimental óptimo para estudiar procesos de aprendizaje como la habituación.

Las lombrices de tierra pertenecen al filo *Annelida* (clase *Clitellata*, subclase *Oligochaeta*) y se reproducen de forma sexual (Nuutinen y Butt, 2009). Viven en ambientes húmedos, evitan la luz y comen material orgánico muerto, desempeñando un papel básico en la formación del manto vegetal. Responden a estímulos táctiles (tacto, vibración) (Laverack, 2013; Herz, Peeke y Wyers, 1967; Peeke, Herz, y Wyers, 1965; Ratner y Miller, 1959; Watanabe et al., 2005), estímulos luminosos (Hess, 1924; Reyes-Jiménez, Abad y Paredes-Olay, 2019; Wilson et al., 2014), eléctricos (Datta, 1962), químicos (Prosser, 1935; Yang et al., 2018), temperaturas (Johnson, 1970) y estímulos olorosos (McManus y Wyers, 1979; Melkman y Sengupta, 2004; Zirbes et al., 2011). La respuesta más estudiada ante estos estímulos es la respuesta de retirada, que consiste en la retracción de los segmentos anteriores del cuerpo y es la respuesta estudiada en la mayoría de los experimentos de comportamiento con lombrices de tierra. También existe otro tipo de respuesta que se mide en los estudios del comportamiento de las lombrices como es el retorcerse sobre ellas mismas describiendo la forma de un garfio (*hooking*) (Gardner, 1968).

El sistema nervioso de la lombriz, está conformado por dos ganglios suprafaríngeos popularmente conocidos como “cerebro” situados en la región anterior del prostomio y un cortón ventral situado en la parte inferior del canal alimentario a lo largo del cuerpo de la lombriz (Corning, Dyal y Willows, 1973). En cada segmento de su cuerpo emergen dos ganglios paralelos formando un sistema nervioso simétrico.

Sin describirlo en detalle, el sistema nervioso de la lombriz de tierra está "segmentado" al igual que el resto del cuerpo. El "cerebro" se encuentra por encima de la faringe y está conectado al primer ganglio ventral. Si se retira el primer ganglio ventral, la lombriz dejará de comer y no cavará. Cada ganglio segmentado obtiene información sensorial de solo una región local de su

cuerpo y controla los músculos solo en esta región. Con respecto a los receptores sensoriales, las lombrices de tierra tienen células únicas que contienen una estructura similar a una lente que se encuentra en la epidermis y la dermis, las cuales son sensibles a la luz (Stephenson, 1930). Esta sensibilidad a la luz y su elevada reactividad ante ella la convierten en uno de los estímulos más propicios para ser empleado como estímulo en el estudio de la habituación. Basta pensar que la luz solar representa un estímulo aversivo para este animal al ser capaz de deshidratar su cuerpo y ocasionarle la muerte. Sería lógico, por tanto, asumir que la conducta de la lombriz de huir de la luz es una respuesta adaptativa y que busca garantizar la supervivencia de la especie.

Principalmente la lombriz de tierra suele vivir en suelos húmedos y pantanosos donde sea posible huir de la luz solar excavando bajo tierra. Cuanto más seco sea el clima y el suelo, las lombrices se verán obligadas a cavar galerías más profundas. Pueden excavar desplazando la tierra hacia otro lado o tragándola y desechándola tras la digestión en forma de turrículos en la superficie. La exposición prolongada a la luz les resulta mortal y puede acelerar una deshidratación que acabaría con su vida por lo que tienen un período más activo durante la noche (Arbit, 1957). No obstante, se puede encontrar que las lombrices suban a la superficie en horario diurno para el apareamiento o para fenecer por edad.

Se describen tres clases de lombrices (Bouché, 1977) en función de su nicho ecológico:

- 1) El primero de los tipos es la lombriz *anécica*, caracterizada por vivir a una profundidad mayor que las demás (hasta varios metros de profundidad) y tener un movimiento vertical que le permite subir a la superficie a por comida una vez esté en horario nocturno. Tiene una tasa de reproducción menor ya que no suele ser presa de los depredadores de la superficie, aunque sí lo es de los topos. La escasa exposición a la luz solar explicaría además su baja pigmentación, la cual tiene como función proteger de los rayos solares. Por último, suelen tener un tamaño mayor que las demás. Un ejemplo de lombriz en esta familia sería la viscosa *Didymogaster sylvaticus*, la

enorme *Megascolides australis* o la *Lumbricus terrestris* (quizá una de las más empleadas como sujeto experimental).

- 2) El segundo tipo son las lombrices *endogeas*, que viven a una profundidad de hasta treinta centímetros, cavan galerías horizontales y apenas suben a la superficie. Tienen un nivel de pigmentación y una tasa de reproducción mayores que las anécicas, pero menores que las epigeas. Un ejemplo de este tipo sería la *Aporrectodea caliginosa* o *Aporrectodea longa*.
- 3) El tercer tipo de lombriz son las epigeas. Este tipo se caracteriza por tener un tamaño menor a las demás y constar de un nivel de pigmentación superior que les permita resistir mejor a las radiaciones solares. Estas lombrices son las que habitualmente se utilizan para la producción de humus. Al vivir en la superficie suelen formar parte de la dieta de muchos depredadores y para poder garantizar la supervivencia de la especie deben poseer una tasa de reproducción alta. En cuanto al tamaño, son las más pequeñas que los tres tipos de lombriz. Un ejemplo de esta familia sería la *Eisenia foetida* o la *Dendrobaena veneta*.

Toda lombriz de tierra es omnívora, se alimenta de la materia orgánica en descomposición como pueden ser las hojas muertas, microorganismos que se encuentren en la tierra o restos de seres vivos. Los deshechos de las lombrices (conocidos como humus) son ricos en nitratos, los cuales resultan nutritivos para la vegetación al poder desoxidar y disolver el peróxido de hierro. Dicho excremento suele ser depositado en las entradas superficiales de las galerías donde, además, colocan hojas, piedras y ramas para tapar la entrada. Aunque en un primer lugar se pueda pensar que es un mecanismo de defensa ante sus principales depredadores como son los ciempiés, escarabajos o tijeretas (*escalopendra*, *carabus*, *staphylinus*), el tapar la entrada lo hacen para evitar la evapotranspiración y la entrada del agua de la lluvia en sus galerías (Cultura edáfica, 2016; Darwin, 1881).

Tienen una esperanza de vida de entre 4 y 8 años además de contar con un sistema reproductivo hermafrodita. A la hora del apareamiento son necesarios dos individuos que quedan fecundados tras un proceso de hasta cuatro horas. Cada lombriz portará un cocón que depositará en la tierra y eclosionará produciendo entre dos y veinte lombrices.

De forma general encontramos que los estudios de habituación llevados a cabo utilizando como sujeto experimental a la lombriz de tierra muestran un descenso de la respuesta de retracción de la cabeza o enroscamiento del cuerpo ante estímulos de distinta modalidad (mecánica, termal y eléctrica) en *Eisenia*, *Lumbricus* y *Allolobophora* (Abramson y Buckbee, 1995; Gardner 1968; Glanville, Gilpin y Ratner, 1979; Herz, Peek y Wyers, 1964; Kuenzer, 1958; Ratner y Gilpin, 1974; Ratner y Miller, 1959; Ratner y Stein, 1965). Otra respuesta que también ha sido estudiada es la respuesta galvánica de la piel cuando se presentaba una luz con distintas intensidades (Morgan, Ratner y Denny, 1965).

Las características de la habituación estudiadas en la lombriz de tierra son:

i) *El efecto del intervalo entre estímulos:*

El tiempo entre las presentaciones del estímulo define la frecuencia de estimulación (Peek y Herz, 1973). Con respecto a la respuesta de retracción, Ratner y Stein (1965) han informado que el número absoluto de respuestas provocadas por luces de alta intensidad es mayor si los estímulos están espaciados (88 segundos) en lugar de concentrados (6 segundos). Además, Ratner (1972) reporta efectos significativos tanto en la habituación como en la retención. Por otro lado, el efecto de IEEs también fue puesto a prueba por Ratner y Gilpin (1974) mostrando una habituación y rehabilitación más rápidas a un estímulo de soplo de aire con los IEEs más cortos (10 s frente a 60 s).

ii) *Retención y Recuperación espontánea:*

Gardner (1968) evidenció que la retención de la habituación en las lombrices de tierra podría extender hasta 96 horas después del entrenamiento. Observó que las reacciones a una vibración (retracción y enganche) aún permanecían relativamente habituadas después de este tiempo. En el experimento de Kuenzer (1958; citado en Gardner, 1968) se habituó a la lombriz a una descarga eléctrica. Tras este entrenamiento, el autor observó una retención de dicha habituación hasta 24 horas después.

iii) *Especificidad estimular y generalización:*

Una de las principales características de la habituación es que la disminución de la respuesta ante un determinado estímulo se generaliza a otro de distinta modalidad estimular, pero, por el contrario, es específica cuando se trata de la misma modalidad estimular (Rankin et al., 2009). Sin embargo, los resultados experimentales son contradictorios. Kuenzer (1958; citado en Dyal, 1973) habituó a las lombrices a tres estímulos diferentes de forma continua. En un primer lugar, las lombrices fueron habituadas a un estímulo mecánico. Después, comenzó inmediatamente una segunda fase donde se habituó una estimulación eléctrica. Finalmente, se le presentaba en una fase final una estimulación térmica. Concluyó que la habituación tiende a generalizarse muy poco, apoyando la idea de la especificidad intermodal de la habituación.

Glanville, Gilpin y Ratner (1979) diseñaron un experimento en el que presentaron a las lombrices una luz brillante durante 5 ensayos y, tras un periodo de tiempo, habituaron un soplo inyectado cerca de la cabeza. Encontraron que el grupo que había recibido la presentación de la luz tuvo una tasa de respuesta significativamente menor ante el olor que el grupo que sólo recibió el soplo. Este experimento evidencia la generalización de una habituación a la luz hacia el olor.

Por otro lado, Gilpin y Ratner (1978) diseñaron un experimento de generalización de la habituación ante una luz o vibración y que constó de tres fases. En la primera habituaban un

estímulo (A) hasta criterio, en la fase dos presentaban uno diferente (B) y en la tercera volvían a presentar (A). Los resultados guiaron a los autores a la conclusión de que la habituación del primero de los estímulos se generaliza al segundo estímulo, haciendo que este se habitúe antes que si se presentase por primera vez.

*iv) La habituación será más rápida frente a estímulos de baja intensidad que frente a estímulos de alta intensidad.*

Morgan, Ratner y Denny (1965) ponen de manifiesto esta característica a través del estudio de la respuesta galvánica de la piel de las lombrices ante la presentación de un estímulo luminoso. Los resultados de este experimento muestran una mayor respuesta galvánica con estímulos de mayor intensidad frente a los de menor intensidad. Además, enlazando con la característica del número de ensayos en la habituación, encuentran que un mayor número de presentaciones está inversamente relacionado con la respuesta galvánica de la piel de las lombrices.

Todos estos resultados sugieren que la lombriz de tierra posee potencial para ser considerado un sujeto experimental válido en el estudio de la habituación y sus características. Habiendo sido sólo estudiada en algunas de estas, el presente trabajo tiene como objetivo general la actualización y diseño de un paradigma experimental para el estudio de la habituación en la lombriz de tierra en relación a los estímulos más relevantes de su medio. Por tanto, el primer paso será realizar una serie de estudios paramétricos que nos permitan designar tanto los estímulos que puedan ser empleados y que sean percibidos por las lombrices como los parámetros temporales idóneos para los experimentos siguientes. Tras esto, exploraremos algunas de las características de la habituación más relevantes como son el efecto del intervalo entre ensayos, la recuperación espontánea, la generalización y especificidad contextual además de los aspectos más notables que surjan de ellas.

## Referencias

- Abrams, T.W. y Kandel, E.R. (1988). Is contiguity detection in classical conditioning a system or a cellular property? Learning in *Aplysia* suggest a possible molecular site. *Trends in Neurosciences*, 11(4), 128-135. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(88\)90137-3](https://doi.org/10.1016/0166-2236(88)90137-3).
- Abramson, C. I. (1994). Habituation and sensitization. En *A primer of invertebrate learning: The behavioral perspective*, (Vol. 15, pp. 103-119) Washington, DC, US: American Psychological Association.
- Abramson, C. I., y Buckbee, D. A. (1995). Pseudoconditioning in Earthworms (*Lumbricus terrestris*): Support for Nonassociative Explanations of Classical Conditioning Phenomena Through an Olfactory Paradigm. *Journal of Comparative Psychology*, 109(4), 390–397. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.109.4.390>
- Álvarez, B., Loy, I. y Prados, J. (2017). Evolución y distribución del aprendizaje en el árbol filogenético. *Estudios Contemporáneos en Cognición Comparada*, 251-315. Mexico: Cromo Editores
- Antonov, I., Kandel, E. R. y Hawkins RD. (1999). The contribution of facilitation of monosynaptic PSPs to dishabituation and sensitization of the *Aplysia* siphon withdrawal reflex. *J Neuroscience* 19(23):10438-10450 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-23-10438.1999>
- Arbit, J. (1957). Diurnal cycles and learning in earthworms. *Science* ,126, 654-655. <https://doi.org/10.1126/science.126.3275.654-a>
- Baglan, H., Lazzari, C. y Guerrieri, F. (2017). Learning in mosquito larvae (*Aedes aegypti*): Habituation to a visual danger signal. *J Insect Physiol.*, 98, 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.01.001>

- Balderrama, N. y Maldonado, H. (1971). Habituation of the deimatic response in the mantid (*Stagmatoptera biocellata*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 75(1), 98–106. <https://doi.org/10.1037/h0030685>
- Beck, C. D. O., y Rankin, C. H. (1995). Heat shock disrupts long-term memory consolidation in *Caenorhabditis elegans*. *Learning & Memory*, 2(3-4), 161–177. <https://doi.org/10.1101/lm.2.3-4.161>
- Beck, C. D. O., y Rankin, C. H. (1997). Long-term habituation is produced by distributed training at long ISIs and not by massed training or short ISIs in *Caenorhabditis elegans*. *Animal Learning and Behavior*, 25(4), 446–457. <https://doi.org/10.3758/BF03209851>
- Belardetti, F., Biondi, C., Colombaioni, L., Brunelli, M., y Trevisani, A. (1982). Role of serotonin and cyclic AMP on facilitation of the fast conducting system activity in the leech *Hirudo medicinalis*. *Brain research*, 246(1), 89-103. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90145-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90145-7)
- Buché, M.B. (1977). PU 43 Strategies lombriciennes. *Ecological Bulletins*, 122-132.
- Boulis, N. M., y Sahley, C. L. (1988). A behavioral analysis of habituation and sensitization of shortening in the semi-intact leech. *Journal of Neuroscience*, 8(12), 4621-4627. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-12-04621.1988>
- Braun, G., y Bicker, G. (1992). Habituation of an appetitive reflex in the honeybee. *Journal of Neurophysiology*, 67(3), 588-598. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.67.3.588>.
- Briffa, M., Jones, N., y Macneil, C. (2016). Responses to threat in a freshwater invader: Longitudinal data reveal personality, habituation, and robustness to changing water temperatures in the “killer shrimp” *Dikerogammarus villosus* (Crustacea: Amphipoda). *Current Zoology*, 62(1), 45–51. <https://doi.org/10.1093/cz/zov001>
- Brown, H. M., Dustman, R. E., y Beck, E. C. (1966). Sensitization in planaria. *Physiology y Behavior*, 1(3-4), 305-308. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(66\)90022-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(66)90022-9)

- Brunner, D., y Maldonado, H. (1988). Habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*: effect of morphine and naloxone. *Journal of Comparative Physiology*, 162(5), 687-694. <https://doi.org/10.1007/BF01342643>
- Brusca, R. C. y Brusca, G. J. (2005). *Invertebrados*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid.
- Bullock, A.L., McKeown, C. L., y Robertson, M. W. (2009). Habituation and dishabituation to a vibrational stimulus by a millipede, *Orthoporus texicolens*. *Transactions of the Illinois State Academy of Science*, 102(3-4), 199-204.
- Byrne, J.H., Antzoulatos, E.G. y Fioravante, D. (2010). Learning and Memory in Invertebrates: *Aplysia*. *Encyclopedia of Neuroscience*. 405-412. DOI: 10.1016/B978-008045046-9.00797-X
- Carew, T. J., Castellucci, V. F. y Kandel, E. R. (1971). An analysis of dishabituation and sensitization of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *International Journal Neuroscience* 2(2), 79-98. <https://doi.org/10.3109/00207457109146995>
- Carew, T. J., Pinsker, H. M., y Kandel, E. R. (1972). Long-term habituation of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, 175(4020):451-454. <https://doi.org/10.1126/science.175.4020.451>.
- Castellucci, V.F., Carew, T.J. y Kandel, E.R. (1978) Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. *Science*, 202(4374):1306-1308. <https://doi.org/10.1126/science.214854>.
- Clark, R. B. (1960). Habituation of the polychaete *Nereis* to sudden stimuli. 1. General properties of the habituation process. *Animal Behaviour*, 8(1-2), 82-91. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(60\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0003-3472(60)90013-0)
- Cook, A. (1970). Habituation in a freshwater snail (*Limnaea stagnalis*). *Animal Behaviour*, 19(3), 463-474. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(71\)80099-4](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(71)80099-4)

- Cook, S. J., Jarrell, T. A., Brittin, C. A., Wang, Y., Bloniarz, A. E., Yakovlev, M. A., Tang, L.T., Bayer, E.A., Duerr, J.S., Bülow, H.E., Hobert, O., Hall, D.H y Emmons, S. W. (2019). Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature*, 571(7763), 63- 71. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1352-7>.
- Corning, W. C., Dyal, J. A., y Willows, A. O. D. (1973). *Invertebrate learning. Volume 1, Protozoans Through Annelids*. Plenum press, New York-London.
- Culturaedafica (27 de junio de 2016) Las lombrices de tierra. *agrologia.wordpress.com*. <https://wp.me/p4rM78-6E>
- Darwin, C. (1881). *The formation of the Vegetable Mould through the Actions of the Worms with Observations on their Habits*. London
- Datta, L. (1962). Learning in the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *The American Journal of Psychology*, 75(4), 531–553. <https://doi.org/10.2307/1420278>
- Debski, E. A., y Friesen, W. O. (1985). Habituation of swimming activity in the medicinalleech. *Journal of Experimental Biology*, 116(1), 169-188.
- Duerr, J. y Quinn, W. (1982) Three Drosophila mutations that block associative learning also affect habituation and sensitization. *Proc. NatL Acad.Sci. US*, 79(11), 3646-3650. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.11.3646>.
- Dyal, J. A. (1973). Behavior modification in annelids. En *Invertebrate learning* (pp. 225-290).
- Dyal, J. A., y Hetherington, K. (1968). Habituation in the polychaete *Hesperonoë adventor*. *Psychonomic Science*, 13(5), 263-264. <https://doi.org/10.3758/BF03342515>
- Ezzeddine, Y. y Glanzman, D. (2003). Prolonged Habituation of the Gill-Withdrawal Reflexin *Aplysia* Depends on Protein Synthesis, Protein Phosphatase Activity, and Postsynaptic Glutamate Receptors. *Journal of Neuroscience* , 23(29) 9585-9594; <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-29-09585.2003>

- Frost, W., y Megalou, E. (2009). Learning and Memory in Invertebrate Models: Tritonia. En L. Squire, *Encyclopedia of Neuroscience*, (pp. 401-404), Elsevier.
- Gardner, L. E. (1968). Retention and Overhabituation of a Dual-Component Response in *Lumbricus Terrestris*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 66(2), 315–318. <https://doi.org/10.1037/h0026357>
- Gilpin, A. R., y Ratner, S. C. (1978). Intermodal Stimulus Generalization and Retention of Habituation in Earthworms. *Psychological Reports*, 42(3), 683–690. <https://doi.org/10.2466/pr0.1978.42.3.683>
- Glanville, B. B., Gilpin, A. R., y Ratner, S. C. (1979). Effects of Interpolated Stimulation on Retention of Habituation in the Earthworm. *The Journal of General Psychology*, 100(2), 287-294. <https://doi.org/10.1080/00221309.1979.9710960>
- Groves, P. M., y Thompson, R. F. (1970). Habituation: A dual-process theory. *Psychological Review*, 77(5), 419–450. <https://doi.org/10.1037/h0029810>
- Hackl, A.N. y Robertson, M.W. (2019). Habituation and dishabituation to a heat stimulus by woodlice, *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Armadillidiidae). *BIOS*, 90(4), 239-244, <https://doi.org/10.1893/0005-3155-90.4.239>
- Harris, J. (1943) Habitatory response decrement in the intact organism. *Psychological Bulletin*, 40(6), 385-422. <https://doi.org/10.1037/h0053918>
- Haupt, S. S., y Klemm, W. (2005). Habituation and dishabituation of exploratory and appetitive responses in the honey bee (*Apis mellifera*). *Behavioural Brain Research*, 165(1), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.030>
- Herz, M. J., Peeke, H. V. S., y Wyers, E. J. (1964). Temperature and conditioning in the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Animal Behaviour*, 12(4), 502–507. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(64\)90071-5](https://doi.org/10.1016/0003-3472(64)90071-5)

- Herz, M. J., Peeke, H. V. S., y Wyers, E. J. (1967). Classical conditioning of the extension response in the earthworm. *Physiology and Behavior*, 2(4), 409–411. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(67\)90060-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(67)90060-1)
- Hess, W. N. (1924). Reactions to light in the earthworm, *Lumbricus Terrestris L.* *Journal of Morphology and Physiology*, 39, 515-542. <https://doi.org/10.1002/JMOR.1050390208>
- Humphrey, G. (1933) *The nature of learning*. New York: Harcourt, Brace
- Inozemtsev, A. N., y Nepomnyashchikh, V. A. (2008). Habituation of caddies *Chaetopteryx villosa* Fabr. Larvae to vibrational stimulus and effect of piracetam on it. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 44(2), 198-203. <https://doi.org/10.1134/S0022093008020072>
- Johnson, F. N. (1970). The effects of temperature on the retention of photic habituation in the earthworm. *Life Sciences*, 9(23), 1345-1351. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(70\)90042-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(70)90042-1)
- Jones, I. T., Stanley, J. A., y Mooney, T. A. (2020). Impulsive pile driving noise elicits alarm responses in squid (*Doryteuthis pealeii*). *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110792. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110792>
- Kindt, K. S., Quast, K. B., Giles, A. C., De, S., Hendrey, D., Nicastro, I., Rankin, C.H. y Schafer, W. R. (2007). Dopamine mediates context-dependent modulation of sensory plasticity in *C. elegans*. *Neuron*, 55(4), 662-676. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.023>.
- Krakauer, J. W., Ghazanfar, A. A., Gomez-Marin, A., MacIver, M. A., y Poeppel, D. (2017). Neuroscience needs behavior: correcting a reductionist bias. *Neuron*, 93(3), 480-490. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.041>
- Kuba, M. J., Byrne, R. A., Meisel, D. V., y Mather, J. A. (2006). Exploration and habituation in intact free moving *Octopus vulgaris*. *International Journal of Comparative Psychology*, 19(4), 426-438

- Kuenzer, P. (1958). Verhaltensphysiologische untersuchungen über das zucken des regenwurms. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 15(1), 31-49. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1958.tb00553.x>
- Lahue, R., Kokkinidis, L., y Corning, W. (1975). Telson reflex habituation in *Limulus polyphemus*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 89(9), 1061– 1069. <https://doi.org/10.1037/h0077425>
- Laverack, M. S. (2013). *The Physiology of Earthworms: International Series of Monographs on Pure and Applied Biology: Zoology*. Elsevier.
- Lockery, S. R. y Kristan, W. B. (1991). Two forms of sensitization of the local bending reflex of the medicinal leech. *Journal of Comparative Physiology A*, 168(2), 165-177. <https://doi.org/10.1007/BF00218409>
- Lockery, S. R., Rawlins, J. N., y Gray, J. A. (1985). Habituation of the shortening reflex in the medicinal leech. *Behavioral neuroscience*, 99(2), 333–341. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.99.2.333>
- Logan, C. A., y Beck, H. P. (1978). Long-term retention of habituation in the sea anemone (*Anthopleura elegantissima*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92(5), 928–936. <https://doi.org/10.1037/h0077532>
- Lorenz, K. (1965) “*Evolution and Modification of Behaviour*”. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Loy, I., Carnero-Sierra, S., Acebes, F., Muñoz-Moreno, J., Muñoz-Diez, C. y Sánchez-González, J. (2021). Where association ends. A review of associative learning in invertebrates, plants and protista, and a reflection on its limits. *Journal of experimental psychology. Animal learning and cognition*, 47(3), 234–251. <https://doi.org/10.1037/xan0000306>

- Lozada, M., Romano, A., y Maldonado, H. (1988). Effect of morphine and naloxone on a defensive response of the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 30(3), 635-640. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(88\)90076-7](https://doi.org/10.1016/0091-3057(88)90076-7).
- Lozada, M., Romano, A., y Maldonado, H. (1990). Long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiology and Behavior*, 47(1), 35–41. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90039-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90039-7)
- Lubow, R. E. (2010). The phylogenetic distribution of latent inhibition. En R. E. Lubow y I. Weiner (Eds.), *Latent inhibition: Cognition, neuroscience and applications to schizophrenia* (pp. 201–224). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511730184.011>
- May, M. L., y Hoy, R. R. (1991). Habituation of the ultrasound-induced acoustic startle response in flying crickets. *Journal of Experimental Biology*, 159(1), 489-499. <https://doi.org/10.1242/jeb.159.1.489>
- McDiarmid, T. A., Yu, A. J., y Rankin, C. H. (2019). Habituation Is More Than Learning to Ignore: Multiple Mechanisms Serve to Facilitate Shifts in Behavioral Strategy. *BioEssays*, 41(9), 1–10. <https://doi.org/10.1002/bies.201900077>
- McManus, F. E., y Wyers, E. J. (1979). Olfaction and selective association in the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Behavioral and Neural Biology*, 25(1), 39–57. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(79\)90739-8](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(79)90739-8)
- Menzel, R., y Benjamin, P. (2013). *Invertebrate learning and memory*. Academic Press.
- Melkman, T., y Sengupta, P. (2004). The worm's sense of smell: Development of functional diversity in the chemosensory system of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 265(2), 302–319. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.07.005>
- Mongeluzi, D. L., y Frost, W. N. (2000). Dishabituation of the *Tritonia* escape swim. *Learning y Memory*, 7(1), 43-47. <https://doi.org/doi:10.1101/lm.7.1.43>

- Morgan, R. F., Ratner, S. C., y Denny, M. R. (1965). Response of earthworms to light as measured by the GSR. *Psychonomic Science*, 3(1–12), 27–28. <https://doi.org/10.3758/bf03343000>
- Nelson, X. J., Helton, W. S., y Melrose, A. (2019). The effect of stimulus encounter rate on response decrement in jumping spiders. *Behavioural Processes*, 159, 57– 59. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.12.020>
- Nolan, L. (2004). Use of Terrestrial Hermit Crabs in the Study of Habituation. *Teaching of Psychology*, 31, 98-100. [https://doi.org/10.1207/s15328023top3102\\_4](https://doi.org/10.1207/s15328023top3102_4).
- Nuutinen, V. y Butt, K. R. (1997). The mating behaviour of eathworm *Lumbricus terrestris* (*Oligochaeta: Lumbricidae*). *Journal of Zoology*, 242(4), 783–798. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1997.tb05826.x>
- Peek, H. V. S., y Herz, M. J. (1973). *Habituation, Vol. 1*. Academic Press Inc: New York and London.
- Peeke, H. V. S., Herz, M. J., y Wyers, E. J. (1965). Amount of training, intermittent reinforcement and resistance to extinction of the conditioned withdrawal response in the earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Animal Behaviour*, 13(4), 566–570. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(65\)90121-1](https://doi.org/10.1016/0003-3472(65)90121-1)
- Perry, C. J., Barron, A. B., y Cheng, K. (2013). Invertebrate learning and cognition: relating phenomena to neural substrate. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 4(5), 561-582. <https://doi.org/10.1002/wcs.1248>
- Philips, G. T., Sherff, C. M., Menges, S. A., y Carew, T. J. (2011). The tail-elicited tail withdrawal reflex of *Aplysia* is mediated centrally at tail sensory-motor synapses and exhibits sensitization across multiple temporal domains. *Learning & memory*, 18(4), 272-282. <https://doi.org/10.1101/lm.2125311>

- Phillips, H. R., Guerra, C. A., Bartz, M. L., Briones, M. J., Brown, G., Crowther, T. W., ... y Orgiazzi, A. (2019). Global distribution of earthworm diversity. *Science*, 366(6464), 480-485. [https://doi.org/ 10.1126/science.aax4851](https://doi.org/10.1126/science.aax4851)
- Pinsker, H., Kupfermann, I., Castellucci, V., y Kandel, E. (1970). Habituation and dishabituation of the GM-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, 167(3926), 1740-1742. <https://doi.org/10.1126/science.167.3926.1740>
- Prados, J., Fisher, C. T. L., Moreno-Fernández, M. M., Tazumi, T., y Urcelay, G. P. (2020). Short- and long-term habituation of photonegative and exploratory responses in the flatworm planaria (*Dugesia*). *Journal of Experimental Psychology: Animal Learning and Cognition*, 46(3), 354–365. <https://doi.org/10.1037/xan0000256>
- Prosser, C. L. (1935). Impulses in the Segmental Nerves of the Earthworm. *Journal of Experimental Biology*, 12(2), 95–104. <https://doi.org/10.1242/jeb.12.2.95>
- Rakitin, A., Tomsic, D. y Maldonado, H. (1991). Habituation and sensitization to an electric shock in the crab *Chasmagnathus*. Effect of background illumination. *Physiology y Behaviour*, 50(3), 477-487. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90533-T](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90533-T)
- Rankin, C. H., Abrams, T., Barry, R. J., Bhatnagar, S., Clayton, D. F., Colombo, J., Coppola, G., Geyer, M., Glanzaman, D., Marsland, S., McSweeney, F., Wilson, D., Wu, C.F. y Thompson, R. F. (2009). Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>
- Rankin, C. H., y Broster, B. S. (1992). Factors affecting habituation and recovery from habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Behavioral Neuroscience*, 106(2), 239– 249. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.106.2.239>
- Rankin, C.H. (2000). Context conditioning in habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Behav. Neurosci.* 114(3), 496–505. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.114.3.496>

- Rankin, C.H. y Wicks, S.R. (2000). Mutations of the *Caenorhabditis elegans* brain-specific inorganic phosphate transporter eat-4 affect habituation of the tap-withdrawal response without affecting the response itself. *J. Neurosci.* 20(11): 4337–4344. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04337.2000>.
- Ratner, S. C. (1972). Habituation and retention of habituation in the leech (*Macrobdella decora*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81(1), 115–121. <https://doi.org/10.1037/h0033331>
- Ratner, S. C., y Gilpin, A. R. (1974). Habituation and retention of habituation of responses to air puff of normal and decerebrate earthworms. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 86(5), 911–918. <https://doi.org/10.1037/h0036396>
- Ratner, S. C., y Miller, K. R. (1959). Classical conditioning in earthworms, *Lumbricus terrestris*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 52(1), 102–105. <https://doi.org/10.1037/h0042412>
- Ratner, S. C., y Stein, D. G. (1965). Responses of worms to light as a function of intertrial interval and ganglion removal. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 59(2), 301–305. <https://doi.org/10.1037/h0021814>
- Reyes-Jiménez, D., Abad, M. J. F., y Paredes-Olay, C. (2019). Classical conditioning in earthworms employing an odorous conditioned stimulus. *Behavioural Processes*, 164, 214–216. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2019.05.014>
- Rosas, J.M., García, A. y Callejas, J.E. (2005). *Fundamentos del aprendizaje humano*. Del lunar.
- Rose, J. K., y Rankin, C. H. (2001). Analyses of Habituation in *Caenorhabditis elegans*. *Learning & Memory*, 8(2), 63–69. <https://doi.org/10.1101/lm.37801>.
- Rushforth, N. B. (1965). Inhibition of contraction responses of *Hydra*. *American zoologist*, 5(3), 505–513. <https://doi.org/10.1093/icb/5.3.505>.

- Samson, J. E., Mooney, T. A., Gussekloo, S. W. S., y Hanlon, R. T. (2014). Graded behavioral responses and habituation to sound in the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *The Journal of Experimental Biology*, 217, 4347–4355. <https://doi.org/10.1242/jeb.113365>
- Sanyal, S., Wintle, R. F., Kindt, K. S., Nuttley, W. M., Arvan, R., Fitzmaurice, P., Bigras, E., Merz, D.C., Hébert, T.E., van der Kooy, D., Schafer, W.R., Culloti, J.G. y Van Tol, H.H. (2004). Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal*, 23(2), 473-482. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600057>
- Sokolov, E. N. (1963). Higher nervous functions; the orienting reflex. *Annual Review of Physiology*, 25, 545–580. <http://doi.org/10.1146/annurev.ph.25.030163.002553>
- Stephenson, J. (1930). *The Oligochaeta*. Clarendon Press, Oxford.
- Timbers, T.A. y Rankin, C.H. (2009). *Caenorhabditis elegans* as a Model System in Which to Study the Fundamentals of Learning and Memory. *Advances in Psychology*. 139, 227-242. [https://doi.org/10.1016/S0166-4115\(08\)10020-6](https://doi.org/10.1016/S0166-4115(08)10020-6)
- Thompson, R. F. (2009). Habituation: A history. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.011>
- Thompson, R. F., y Spencer, W. A. (1966). Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological Review*, 73(1), 16–43. <https://doi.org/10.1037/h0022681>
- Thon, B., y Pauzie, A. (1984). Differential sensitization, retention, and generalization of habituation in two response systems in the blowfly (*Calliphora vomitoria*). *Journal of Comparative Psychology*, 98(2), 119 –130. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.98.2.119>
- Thorpe, W.H. (1963). “*Learning and Instinct in Animals*” Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

- Tomsic, D., Pedreira, M. E., Romano, A., Hermitte, G., y Maldonado, H. (1998). Context-US association as a determinant of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Animal Learning and Behavior*, 26(2), 196–209. <https://doi.org/10.3758/BF03199212>
- Uribe-Bahamonde, Y. E., Becerra, S. A., Ponce, F. P., y Vogel, E. H. (2019). A quantitative account of the behavioral characteristics of habituation: The sometimes opponent processes model of stimulus processing. *Frontiers in Psychology*, 10, 504. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.00504>
- Vogel, E. H., Ponce, F. P., y Wagner, A. R. (2019). The development and present status of the SOP model of associative learning. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 72(2), 346–374. <https://doi.org/10.1177/1747021818777074>
- Wagner, A.R. (1981). SOP: A model of automatic memory processing in animal behavior. En N.E. Spear y R.R. Miller (Eds.), *Information processing in animals: Memory mechanisms* (pp. 5-47). Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Wagner, A. R., y Brandon, S. E. (1989). Evolution of a structured connectionist model of Pavlovian conditioning (AESOP). En S. B. Klein y R. R. Mowrer (Eds.), *Contemporary learning theories: Pavlovian conditioning and the status of traditional learning theory* (pp. 149–189). New York, NY: Lawrence Erlbaum Associates.
- Watanabe, H., Takaya, T., Shimoi, T., Ogawa, H., Kitamura, Y., y Oka, K. (2005). Influence of mRNA and protein synthesis inhibitors on the long-term memory acquisition of classically conditioned earthworms. *Neurobiology of Learning and Memory*, 83(2), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.11.003>
- Westerman, R. A. (1963). Somatic inheritance of habituation of responses to light in planarians. *Science*, 140(3567), 676-677. <https://doi.org/10.1126/science.140.3567.676>

- Whitlow, J. W., Jr., y Wagner, A. R. (1984). Memory and habituation. En H. V. S. Peeke y L. Petrinovich (Eds.), *Habituation, sensitization, and behavior* (pp. 103–153). New York: Academic Press.
- Wicks, S.R. y Rankin, C.H. (1995). Integration of mechanosensory stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.*, 15(3), 2434–2444. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-02434.1995>.
- Wicks, S.R. y Rankin, C.H. (1996). The integration of antagonistic reflexes revealed by laser ablation of identified neurons determines habituation kinetics of the *Caenorhabditis elegans* tap withdrawal response. *J. Comp. Physiol*, 179(5), 675–685. <https://doi.org/10.1007/BF00216131>.
- Wicks, S.R. y Rankin, C.H. (1997). The effects of tap withdrawal response habituation on other withdrawal behaviors: The localization of habituation in *C. elegans*. *Behavioural Neuroscience* 111(2), 342–353. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.111.2.342>
- Wilson, J., Ferrara, N. C., Blaker, A. L., y Giddings, C. E. (2014). Escape and avoidance learning in the earthworm *Eisenia hortensis*. *PeerJ*, 2, e250. <https://doi.org/10.7717/peerj.250>
- Wood, D. C. (1970). Electrophysiological correlates of the response decrement produced by mechanical stimuli in the protozoan, *Stentor coeruleus*. *Journal of neurobiology*, 2(1), 1-11. <https://doi.org/10.1002/neu.480020102>.
- Wood, D. C. (1970). Electrophysiological studies of the protozoan *Stentor coeruleus*. *Journal of Neurobiology*, 1(4), 363-377. <https://doi.org/10.1002/neu.480010402>
- Wood, D. C. (1973). Stimulus specific habituation in a protozoan. *Physiology y behavior*, 11(3), 349-354. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(73\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(73)90011-5)
- Wyers, E. J., Peeke, H. V., y Herz, M. J. (1973). Capítulo 1. Behavioral habituation in invertebrates. En Peeke, H. V., y Herz, M. J., *Habituation. Behavioural studies*, (2 ed., pp 1-57). Academic Press: New York. London.

- Yang, G., Chen, C., Yu, Y., Zhao, H., Wang, W., Wang, Y., Cai, L., He, Y. y Wang, X. (2018). Combined effects of four pesticides and heavy metal chromium (VI) on the earthworm using avoidance behavior as an endpoint. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.067>
- Yerkes, R. M. (1912). The intelligence of earthworms. *Journal of Animal Behavior*, 2(5), 332–352. <https://doi.org/10.1037/h0072456>
- Zaccardi, M.L., Traina, G., Cataldo, E. y Brunelli, M. (2001). Nonassociative learning in the leech *Hirudo medicinalis*. *Behavioural brain research*, 126 (1-2), 81-92. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00247-9](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00247-9)
- Zappler, G. (1958). Darwin's worms. *Natural History*, 67 (9), 488-495.
- Zirbes, L., Mescher, M., Vrancken, V., Wathelet, J. P., Verheggen, F. J., Thonart, P., y Haubruge (2011). Earthworms use odor cues to locate and feed on microorganisms in soil. *PLoS ONE*, 6(7), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.002192>



## **Capítulo 2: Estudios paramétricos**

La habituación es un fenómeno universal ampliamente estudiado en organismos inferiores, los cuales ha sido utilizados sobre todo como modelo para el estudio de las bases biológicas de la memoria. Como ya se ha introducido en el capítulo anterior, en este trabajo el interés se centra no tanto en estudiar a los invertebrados como modelos simples de las bases biológicas de la conducta sino en estudiarlos como modelos de las bases conductuales de la cognición. Con ello se pretende contribuir a alcanzar una visión conjunta de ambas vertientes que ayude a integrar los aspectos estructurales y funcionales del fenómeno de la habituación.

La habituación es un fenómeno de aprendizaje básico el cual conforma un método experimental que puede ser usado como herramienta para caracterizar a los invertebrados como sujetos cognoscentes. El primer paso para considerar que un sujeto es cognoscente es que posea cierta memoria que permita recordar una información o conocimiento. La forma más básica de obtener dicho conocimiento es “entrar en contacto con lo que nos rodea” y, a partir de ahí, los sujetos son capaces de establecer relaciones significativas con y entre los estímulos de su medio. Por ejemplo, en el caso de la habituación, es la memoria de que el estímulo ha sido presentado previamente sin consecuencias, el que explicaría que se deje de responder ante el mismo. En el caso de la lombriz, la existencia de procesos mentales y su consecuente categorización como seres cognoscentes, fue ya inferida por Darwin (1881) al observar conductas que sugerían una inteligencia. Esta conducta fue por ejemplo el usar hojas para tapar las entradas de sus túneles. Según Darwin (1881), las lombrices situaban hojas en las entradas de sus túneles a modo de protección contra la lluvia. Según la forma de la hoja, las lombrices las arrastraban agarrándolas desde una posición u otra. En un estudio con hojas de su jardín, encontró que el 80% de las hojas utilizadas para tapar una madriguera habían sido introducidas por la punta mientras que sólo un 4% por el tallo y un 16% por el lado. Al cambiar las hojas por las de otro árbol alóctono que fuesen más simétricas, dichos porcentajes se mantenían. Sin embargo, cuando presentó otro tipo de hoja donde la forma de los tallos encajaba más con la forma de las galerías, las lombrices las

agarraban por el tallo en lugar de por la punta. Este resultado impulsó a Darwin a confirmar la inteligencia de este invertebrado, ya que no cogían cualquier hoja para tapar sus túneles ni lo hacían de una forma desordenada. Años más tarde, este experimento fue replicado por Zappler (1958) quien además sugiere que las lombrices se guían por señales químicas a la hora de agarrar las hojas.

El primer paso a la hora de estudiar la capacidad de aprendizaje en cualquier organismo consiste en determinar qué estímulos (y qué parámetros) son aquellos que provocan una reacción observable en él. En el caso de los animales habitualmente empleados en laboratorio (roedores o palomas) no resulta excesivamente complicado hacerlo debido a la similitud entre nuestros sistemas sensoriales. En el caso de los invertebrados con un sistema nervioso más simple y más alejado del nuestro, la labor resulta mucho más compleja. Es necesario un paradigma experimental que se centre en las capacidades específicas de cada especie y que permita explicar los resultados de una forma clara e inequívoca. En el estudio de Laverack (1961) se pone en evidencia esta problemática, mostrando que dependiendo de la especie estudiada se obtendría una respuesta u otra ante un determinado estímulo. Laverack (1961) comparó la respuesta de tres especies de lombriz ante un suelo con un pH específico. Encontró que mientras la especie *Aporrectodea longa* no excava en un suelo con pH 4-5, la *Lumbricus terrestris* no lo haría en un suelo con pH entre 1 y 4. Por otro lado, *Lumbricus rubellus* es capaz de vivir en suelos con pH incluso menores. Estas diferencias entre especies informan, por tanto, de la variabilidad de las respuestas que un determinado estímulo puede provocar en distintas especies del mismo filo animal.

En este capítulo se presentan las curvas de habituación simples de los estímulos empleados en los experimentos de aprendizaje con lombrices de tierra (luz, vibración y olor). Con ello pretendemos establecer los parámetros adecuados para el estudio de las distintas características de la habituación en este sujeto y, de esta forma, desarrollar un procedimiento estandarizado para dicho estudio.

En el mundo animal, una de las respuestas más comunes ante la presentación de un estímulo nuevo o potencialmente nocivo es el de huida/evitación. Atendiendo a la especie que se esté estudiando y a su nicho ecológico, se pueden encontrar diversas conductas que tienen ese fin. Por ejemplo, en el caso de un cangrejo, la proyección de una sombra que imita a una gaviota sobre ellos elicitará una reacción de huida hacia un espacio cubierto o semi-cubierto (Tomsic et al., 1993). En otro supuesto, un pollito recién nacido muestra la conducta de permanecer inmóvil o “congelado” ante un estímulo acústico (Chiandetti y Turatto, 2017). La respuesta de huida se encuentra también en la lombriz de tierra siendo utilizada como un indicador de la calidad del suelo donde se encuentren. Este es el caso de Verdejo-Araya et al. (2015), quienes observaron cómo las lombrices evitan los suelos contaminados por la minería.

Con respecto al mecanismo innato de defensa ante un depredador o estímulo nocivo, los anélidos no disponen de un caparazón donde resguardarse ni una velocidad de movimiento que les permita ponerse a salvo. Por ello, han tenido que depender de otras conductas adecuadas a su hábitat. Al tratarse de un animal prácticamente subterráneo, se deduce que su principal método de escape sea el de excavar en la tierra hasta desaparecer de la vista de sus depredadores. Esta conducta puede ser impedida si la superficie en la que se encuentran no es perforable, como podría ocurrir en un laboratorio. Por tanto, las principales respuestas que le quedarían a la lombriz serían la retracción de la cabeza y/o el “*hooking*” (contracción rápida de la parte posterior del animal seguido de un aplanamiento y enroscamiento ventral de aproximadamente los 15 primeros segmentos del anélido), las cuales ya han sido estudiadas por Gardner (1968). En su estudio se trató de habituar estas dos respuestas a una vibración que se presentaba cada dieciocho segundos y que tenía una duración de 0.25 segundos. El criterio para considerar que un sujeto había sido habituado fue el de mostrar 10 ensayos seguidos sin respuesta observable. El autor encontró que, agrupando los ensayos en bloques de diez, la respuesta de retracción desaparecía mucho antes que la de retorcimiento, concretamente en el bloque número siete mientras que la de retorcimiento

aguantaba hasta el bloque 20 antes de habituarse por completo.

El análisis de la literatura existente muestra que de estas tres conductas (retracción, excavación y retorcimiento) la más estudiada es la respuesta de retracción de la cabeza de la lombriz (Abramson y Buckbee, 1995; Gardner 1968; Glanville, Gilpin y Ratner, 1979; Herz, Peek y Wyers, 1964; Kuenzer, 1958; Ranter y Gilpin, 1974; Ratner y Miller, 1959; Ratner y Stein, 1965). Este movimiento defensivo de retracción ofrecería al sujeto la capacidad de hacerse más pequeño y poder ocultarse del depredador. En términos operacionales, la respuesta de retracción se describe como un encogimiento de al menos cinco milímetros llevada a cabo por una contracción de los segmentos anteriores del cuerpo de la lombriz.

Además, se ha estudiado otra respuesta como es la respuesta galvánica de la piel de las lombrices (Morgan, Ratner y Denny, 1965). En este estudio, la respuesta galvánica de la piel de los sujetos era registrada durante cinco ensayos donde se les presentaban luces de hasta cuatro intensidades diferentes (5166 luxes, 1937 luxes, 861 luxes y sin luz) durante un minuto y con un intervalo entre ensayos de 5 minutos. Los autores demostraron que dicha respuesta de la piel se habituaba a medida que avanzaba el entrenamiento y que era mayor cuando se presentaban las intensidades altas en comparación a cuando se presentaban las intensidades bajas.

La observación del nicho ecológico de la lombriz de tierra nos permite determinar los estímulos que elicitán la respuesta de retracción de forma natural. Teniendo en cuenta el hábitat de las lombrices de tierra descrito en el capítulo anterior, sabemos que la luz y las vibraciones del suelo son estímulos muy relevantes para ellas. La luz es un estímulo nocivo que puede provocar la muerte por deshidratación, haciendo que las lombrices vivan bajo tierra para evitarlo y salgan en horario nocturno a por comida.

Al carecer de vista y oído, las lombrices también perciben información de su ambiente a través de las vibraciones que emiten otros animales. La posible presencia de un depredador puede ser advertida por las vibraciones que producen sus pisadas o la excavación de túneles en el caso

de los topos. Esta idea implica, por tanto, que un estímulo vibratorio podría elicitar una respuesta de huida/evitación en la lombriz por lo que puede ser usado como estímulo en el estudio de la habituación e incluso en estudios de condicionamiento clásico (Ratner y Miller; 1959).

Por último, gracias a sus receptores sensoriales y al encontrarse en un hábitat húmedo y con vegetación, los olores desprendidos por la hierba, flores o plantas son percibidas por la lombriz. De hecho, dichos estímulos son empleados para buscar y localizar comida (Zirbes et al., 2011). Como un estímulo diferenciado, un olor podría ser considerado como candidato a estímulo para experimentación. Por ejemplo, Abramson y Buckbee (1995) diseñaron un nuevo paradigma experimental con el objetivo de explorar el condicionamiento clásico en las lombrices. Para ello, prepararon un olor vertiendo una gota de una esencia en un papel de filtro, el cual fue asegurado en el émbolo de una jeringa con una chincheta. Como estímulo incondicionado utilizaron un olor a disolvente que surtió un efecto aversivo sobre los anélidos. Los resultados de este experimento mostraron una sensibilización de la respuesta en los grupos control. Es por ello que los autores concluyeron que no se encontró un condicionamiento clásico sino el denominado efecto de pseudocondicionamiento. Aunque este estudio no mostró el aprendizaje asociativo, sacó a la luz un nuevo método de trabajo con lombrices que fue utilizado por Reyes-Jiménez, Abad y Paredes-Olay (2019). En este caso, los autores emparejaron un estímulo oloroso preparado del mismo modo que Abramson y Buckbee (1995) (olor a rosa) con un estímulo aversivo como la luz. Los resultados de este estudio mostraron que, en una fase de test donde sólo se presentaba el olor, la tasa de respuesta de retracción en el grupo que había sido emparejado con la luz era mayor que la de los grupos control. Por tanto, se demostró un correcto aprendizaje de condicionamiento clásico.

Una vez determinados los principales estímulos empleados y respuestas generalmente estudiadas en la literatura, se deben establecer los parámetros y diseños más adecuados basados en las capacidades sensoriales de la lombriz de tierra atendiendo a factores como el intervalo entre ensayos o la intensidad de los estímulos.

Para ello, se llevarán a cabo varios experimentos en los que se habituará la respuesta de retracción de la cabeza de la lombriz de tierra ante distintos estímulos (luz, vibración y olor) empleando distintos intervalos entre ensayos (IEEs). En un primer experimento se procedió a evaluar la habituación de los distintos estímulos luz, vibración y olor con un IEEs de treinta segundos mientras que en el experimento 2 el intervalo entre presentaciones fue de sesenta segundos. Por último, un tercer experimento fue llevado a cabo donde se entrenaban a los grupos de sujetos con los intervalos de 30 y sesenta segundos, permitiendo la comparación directa de ambos intervalos.

### **Experimento 1 (a, b y c), 2 (a, b y c) y 3 (a, b y c)**

En esta serie experimental se caracteriza la habituación de la respuesta de retracción de la cabeza de la lombriz de tierra ante distintos estímulos (luz, vibración y olor) empleando distintos intervalos entre ensayos (IEEs). En el experimento 1 se procedió a evaluar la habituación de los distintos estímulos luz (a), vibración (b) y olor (c) con un IEEs de treinta segundos. En el experimento 2, se llevó a cabo un diseño similar, pero con un IEEs de sesenta segundos. Por último, en el experimento 3, se compararon las curvas de habituación de la luz (a), vibración (b) y el olor (c) con treinta y sesenta segundos además de un intervalo de 10 segundos en el caso de la luz.

### **Método General**

#### ***Sujetos***

Ciento ocho lombrices (*Lumbricidae*) fueron usadas en estos experimentos. En cada experimento se dispuso de dos grupos con dieciocho sujetos en cada uno. Todos los sujetos fueron extraídos del medio natural individualmente y fueron almacenadas de forma conjunta en

maceteros (70×33×35 cm) con sustrato universal fertilizado “Ciemhus” mezclado con comida (lechuga, apio, zanahoria y remolacha). Las lombrices del experimento 1 tenían una longitud aproximada de entre 6 y 9 centímetros y un peso medio de 0,608 (a), 0,606 (b) y 0,593 (c) gramos. En el experimento 2, los sujetos tenían una longitud similar a la del experimento anterior y una media de pesos de 0,745 (b) y 0,5 gramos (c). Todas las lombrices eran sujetos adultos, identificados como tales por la presencia del clitelo. El clitelo es una sección no segmentada cercana a la parte de la cabeza (alrededor de los segmentos 14-17) cuya principal función es el almacenamiento y maduración de los huevos del animal.

### *Aparatos*

La luz fría empleada como estímulo (1550 lx, 3 segundos de duración) fue administrada por una lámpara de escritorio centrada sobre la plataforma a una altura de 24 centímetros. La lámpara empleada era activada por una computadora (Rapsberry Pi 2 modelo B con SO Rapsbian) y los tiempos de aplicación del estímulo fueron controlados por un programa de Python diseñado especialmente para esta tarea.

La vibración usada duraba ocho segundos y era administrada por dos motores (3V, 60mA, 1300 rpm/m) situados bajo la placa de metacrilato (16×27cm). Ambos estaban conectados a la computadora descrita anteriormente y administraban la estimulación por medio del programa Python. Encima de esta placa se situaban las placas de poliuretano (18x10 centímetros) sobre las que se depositarían a los sujetos para el experimento.

El estímulo oloroso fue administrado empleando el procedimiento descrito por Abramson y Buckbee (1995), por medio de una jeringuilla con 10 ml de aire a la cual se le aseguraba, con una chincheta, un papel de filtro (1cm<sup>2</sup>) en el cual se vertía una gota de esencia de vainilla (Radhe Shyam) al émbolo de la jeringa. Al presionar, el aire contenido en la jeringa que contiene el olor es expulsado, aplicando dicha esencia a una distancia de 1 cm de la cabeza de los sujetos.

## **Procedimiento**

El experimento fue llevado a cabo en rondas de dos sujetos observados por dos experimentadores. La realización del mismo tuvo lugar en una habitación privada de luz natural, siendo solo iluminada por una bombilla de color rojo cuya luz resulta imperceptible para los animales.

Inicialmente, los sujetos fueron recogidos del macetero de forma individual, lavados con agua destilada, pesados y colocados sobre las bandejas de poliuretano. A continuación, eran distribuidos de forma aleatoria entre el grupo *Experimental* y el grupo de control *Emparejado*.

El entrenamiento del grupo *Experimental* consistió en presentar el estímulo cada 30 segundos (IEEs de 30 segundos) o cada 60 segundos (IEEs de 60 segundos) dependiendo del experimento. El criterio para concluir que el sujeto había sido habituado era el pasar 10 ensayos consecutivos sin respuesta. Una vez alcanzado el criterio, los sujetos eran devueltos a su caja hogar. Los experimentadores registraban la aparición o no de la respuesta durante la presentación del estímulo y tres segundos más tarde del cese de este.

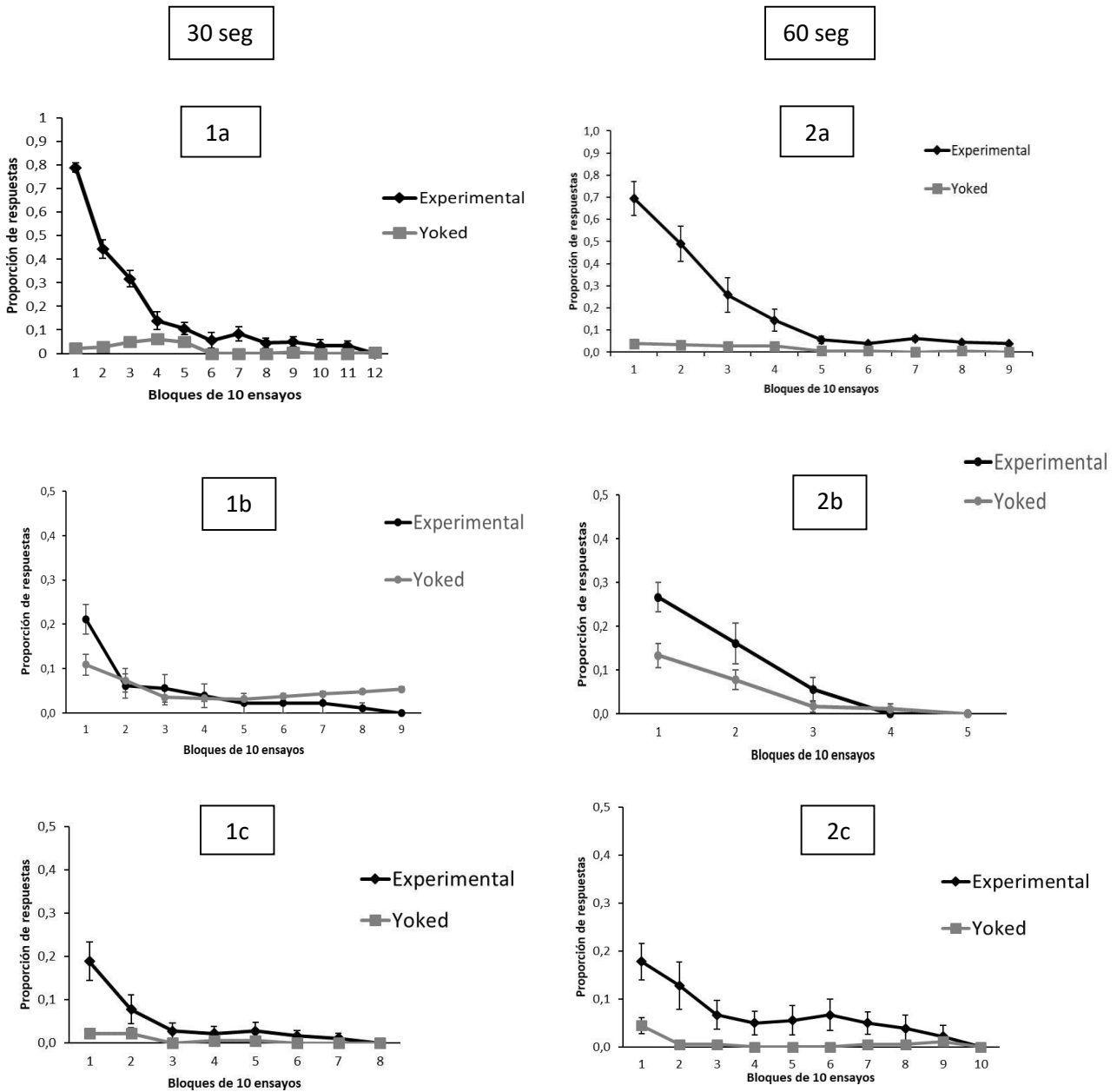
A cada sujeto experimental se le asignaba un sujeto control que era expuesto a la misma situación. Dicho sujeto debía permanecer en la placa durante el mismo tiempo que el sujeto del grupo experimental había tardado en alcanzar el criterio, pero sin presentarle el estímulo. Los experimentadores debían observar y anotar si el sujeto daba o no la respuesta medida cada treinta o cada sesenta segundos, dependiendo del grupo al que perteneciese. Estos sujetos constituían el grupo de control *Emparejado*, el cual nos proporciona la línea base de la respuesta de retracción cuando el sujeto experimental no recibe ninguna estimulación (Abramson, 1994).

Para asegurar que el descenso de la respuesta no fuese debida a la fatiga, se incluyó una fase en la cual se presentó un estímulo de distinta modalidad sensorial (táctil). Esta consistió en tocar levemente con el capuchón de un bolígrafo *Bic* en la cabeza de los sujetos durante cinco ensayos con el mismo intervalo entre ensayos empleado en el entrenamiento del sujeto. Si los

sujetos respondían significaba que no estaba fatigado (Abramson, 1994).

En los experimentos 1a y 2a se empleó la luz como estímulo, en los experimentos 1b y 2b se empleó la vibración y en los experimentos 1c y 2c se empleó el olor.

**Resultados y Discusión de los experimentos 1 (a, b y c) y 2 (a, b y c)**



**Figura 1.** Representación de las proporciones de respuesta en bloques de diez ensayos de los experimentos 1a (luz), 1b (vibración) y 1c (olor) con un intervalo entre ensayos de treinta segundos en la columna izquierda y los experimentos 2a (luz), 2b (vibración) y 2c (olor) con un intervalo entre ensayos de sesenta segundos a la derecha.

Los resultados del experimento 1 se pueden apreciar en la parte izquierda de la Figura 1. En estos gráficos se muestra, de arriba abajo, el nivel de respuesta de las lombrices ante los estímulos luz (1a), vibración (1b) y olor (1c) respectivamente, a lo largo del entrenamiento con un intervalo entre ensayos de treinta segundos, agrupando los ensayos en bloques de diez. En los tres gráficos se aprecia una diferencia en el nivel de respuesta de los grupos Experimentales frente a los *Emparejados*. En concreto, se observa el descenso progresivo de la respuesta ante la presentación del estímulo en los grupos experimentales.

Estos resultados fueron analizados con el paquete estadístico SPSS v.23 (Statistical Package for the Social Sciences). Se realizó un análisis de medidas repetidas con un factor intra “bloque” y un factor entre “grupo” (*Experimental vs Emparejado*).

Los resultados indican que en cada experimento se observa un efecto de bloque para los tres estímulos (luz, vibración y olor) [1a ( $F_{11, 374} = 57,473$ ;  $p < 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,85$ ), 1b ( $F_{8, 272} = 24,04$ ;  $p < 0,05$ ;  $\eta^2 = 0,414$ ) y 1c ( $F_{7, 238} = 13,44$ ;  $p < 0,05$ ;  $\eta^2 = 0,283$ )] y un efecto del grupo en la luz [1a ( $F_{1,34} = 31,491$ ;  $p = 0.00$ ;  $\eta^2 = 0,481$ )] y olor [1c ( $F_{1,34} = 6,34$ ;  $p < 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,157$ )] pero no en la vibración [1b ( $F_{1,34} = 1,25$ ;  $p > 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,035$ )]. Además, se encuentra una interacción bloque\*grupo con los tres estímulos [1a ( $F_{11, 374} = 50,05$ ;  $p < 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,595$ ); 1b ( $F_{8,272} = 2,03$ ;  $p = 0.043$ ;  $\eta^2 = 0,056$ ); 1c ( $F_{7,238} = 7,84$ ;  $p < 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,187$ )]. La interacción entre bloque y grupo refleja el efecto de la habituación en los grupos *Experimentales* cuya respuesta disminuye progresivamente hasta alcanzar el nivel de los grupos *Emparejados*. Al comparar las gráficas se observa que la luz provoca una mayor respuesta que la vibración y el olor, respondiendo en una proporción de 0.8 frente al 0.2 de los demás estímulos.

Los resultados del experimento 2 se presentan en la parte derecha de la Figura 1. En estos gráficos se observa el nivel de respuesta de las lombrices ante los estímulos luz (2a), vibración (2b) y olor (2c) de arriba hacia abajo respectivamente, a lo largo del entrenamiento con un intervalo entre ensayos de sesenta segundos, siendo este entrenamiento agrupado en bloques de

diez ensayos. En los tres gráficos se aprecia la diferencia en el mayor nivel de respuesta de los grupos *Experimentales* frente a los menores niveles de respuesta mostrados por los grupos *Emparejados*. Los sujetos mostraron una curva de habituación con el desarrollo de la exposición en los grupos *Experimentales* donde se presentaban los estímulos siendo, al final del entrenamiento, igualado a los grupos *Emparejados*.

El mismo análisis de medidas repetidas que el experimento 1 fue realizado con estos resultados, mostrando un efecto significativo del factor bloque [2a ( $F_{9, 306}=37,52$ ;  $p<0.05$ ;  $\eta^2=0,525$ ) 2b ( $F_{4, 136} = 32,28$ ;  $p<0.05$ ;  $\eta^2= 0,487$ ) y 2c ( $F_{9, 306} = 7,65$ ;  $p<0.05$ ;  $\eta^2= 0,184$ )] para los tres estímulos, al igual que el factor grupo con la luz ( $F_{1,34}= 14,72$ ;  $p=0.01$ ;  $\eta^2= 0,302$ ), vibración [2b ( $F_{1,34}= 6,079$ ;  $p<0.05$ ;  $\eta^2= 0,152$ )] y olor [2c ( $F_{1,34}= 6,533$ ;  $p<0,05$ ;  $\eta^2= 0,161$ )]. Además, se encuentra una interacción bloque\*grupo [2a ( $F_{9, 306}= 29,58$ ;  $p<0.05$ ;  $\eta^2= 0,465$ ), 2b ( $F_{4,136}=3,94$ ;  $p=0.005$ ;  $\eta^2= 0,104$ ) y 2c ( $F_{9,306}=3,58$ ;  $p<0.05$ ;  $\eta^2= 0,095$ )] en todos los estímulos.

De una forma similar a la del experimento 1, la desaparición de dicha diferencia inicial entre la tasa de respuestas de ambos grupos conforme avanza la sesión describe una habituación completa, mostrando un nivel de respuesta similar a si no se presentase ningún estímulo. Esta habituación ocurre, por tanto, en los tres estímulos estudiados. Como se puede observar, se encuentra nuevamente la diferencia de respuesta ante el estímulo luminoso en comparación con los otros dos.

Son diversos los factores posibles responsables de esta diferenciación en el nivel de respuesta atendiendo al estímulo empleado. Por un lado, podríamos estar ante un caso de diferencias de la intensidad de los estímulos. La luz, con estos parámetros, podría ser percibida de forma más intensa por la lombriz que una vibración con las características empleadas. Otra explicación podría venir dada por la relevancia biológica de los estímulos. No sería igual de peligroso para una lombriz el ser expuesta a una luz intensa que podría matarla que recibir un olor

a vainilla o una vibración superficial. Aunque no queda claro qué explicación podría ser la que definiría estos resultados, sería interesante estudiar en un futuro los umbrales de respuesta ante un mismo estímulo con diferentes intensidades.

Por otro lado, la inspección visual de las gráficas sugiere el efecto del intervalo entre ensayos que puede apreciarse al comparar el número de bloques hasta alcanzar la asíntota de respuesta. En las gráficas de la izquierda que muestran los experimentos en los que se empleó un intervalo entre ensayos de 30 segundos, podemos observar que el número de ensayos requeridos hasta alcanzar la asíntota de aprendizaje es menor (al menos un bloque) que con un intervalo entre ensayos de 60 segundos (gráfica derecha). Este resultado refleja otra de las características de la habituación: esta es más rápida cuando aumenta la frecuencia en la presentación del estímulo.

La reducción de la tasa de respuestas no pudo ser explicada en términos de fatiga en ninguno de los casos del experimento 1 ya que los sujetos respondían cuando se les presentó un nuevo estímulo de otra modalidad sensorial. Concretamente, de las cinco presentaciones del tacto, las lombrices se retrajeron las 5 veces (1a=33%; de los sujetos; 1b=68,75%; 1c=78%), 4 veces (1a=33%;1b=25%; 1c=11%) y 3 veces (1a=11% %; 1b=6% %; 1c= 5,6%), 2 veces (1a=16%; 1b= 0%; 1c= 5,6) y 1 vez (1a=6%; 1b= 0% 1c= 0%).

En el experimento 2, los sujetos respondieron 5 (2a= 68,75%; 2b= 36% 2c=66%), 4 (2a= 25%; 2b= 11%; 2c= 28%), 3 (2a= 6%; 2b=0%; 2c= 0%), 2 (2a= 0%; 2b=14%; 2c=0%), 1 (2a= 0%; 2b=14%; 2c= 6%) y 0 veces (2a= 0%; 2b=25%; 2c= 0%).

### Experimento 3 (a, b y c)

Los experimentos anteriores muestran la curva de habituación ante distintos estímulos además de sugerir, tal y como señalábamos en el apartado anterior, una diferencia en la curva de aprendizaje en función del IEEs empleado. Esta es una de las características de la habituación (Rankin et al. 2009; Thompson y Spencer, 1966) que ya ha sido estudiada en las lombrices de tierra (Ratner y Gilpin, 1974). En el estudio de Ratner y Gilpin (1974) se muestran una habituación y rehabilitación más rápidas a un soplo de aire con los IEEs más cortos (10 s frente a 60 s). El propósito de este tercer experimento fue comprobar dicho efecto comparando directamente el curso de la habituación entre los intervalos 30 y 60 ante un estímulo luminoso, vibratorio y oloroso. Basándonos en la literatura esperamos encontrar una habituación más rápida en el grupo de menor IEEs, el cual debería alcanzar su nivel asintótico con un menor número de ensayos que el grupo con un IEEs mayor. En el caso de la luz incluimos un grupo donde el intervalo entre ensayos fue de diez segundos, el cual nos permitiría diferenciar aún más los grupos del experimento para comprobar el efecto de un IEEs más reducido que el de 30 segundos, tal y como se propuso en las conclusiones del experimento anterior.

#### *Sujetos*

Setenta y ocho lombrices (*Lumbricidae*) fueron usadas en este experimento. Todos los sujetos fueron extraídos del mismo medio que en el experimento 1 y con un procedimiento similar a los experimentos 1 y 2. La media de peso de los sujetos fue de 1,295 gramos y una longitud aproximada de 11 centímetros.

### ***Aparatos***

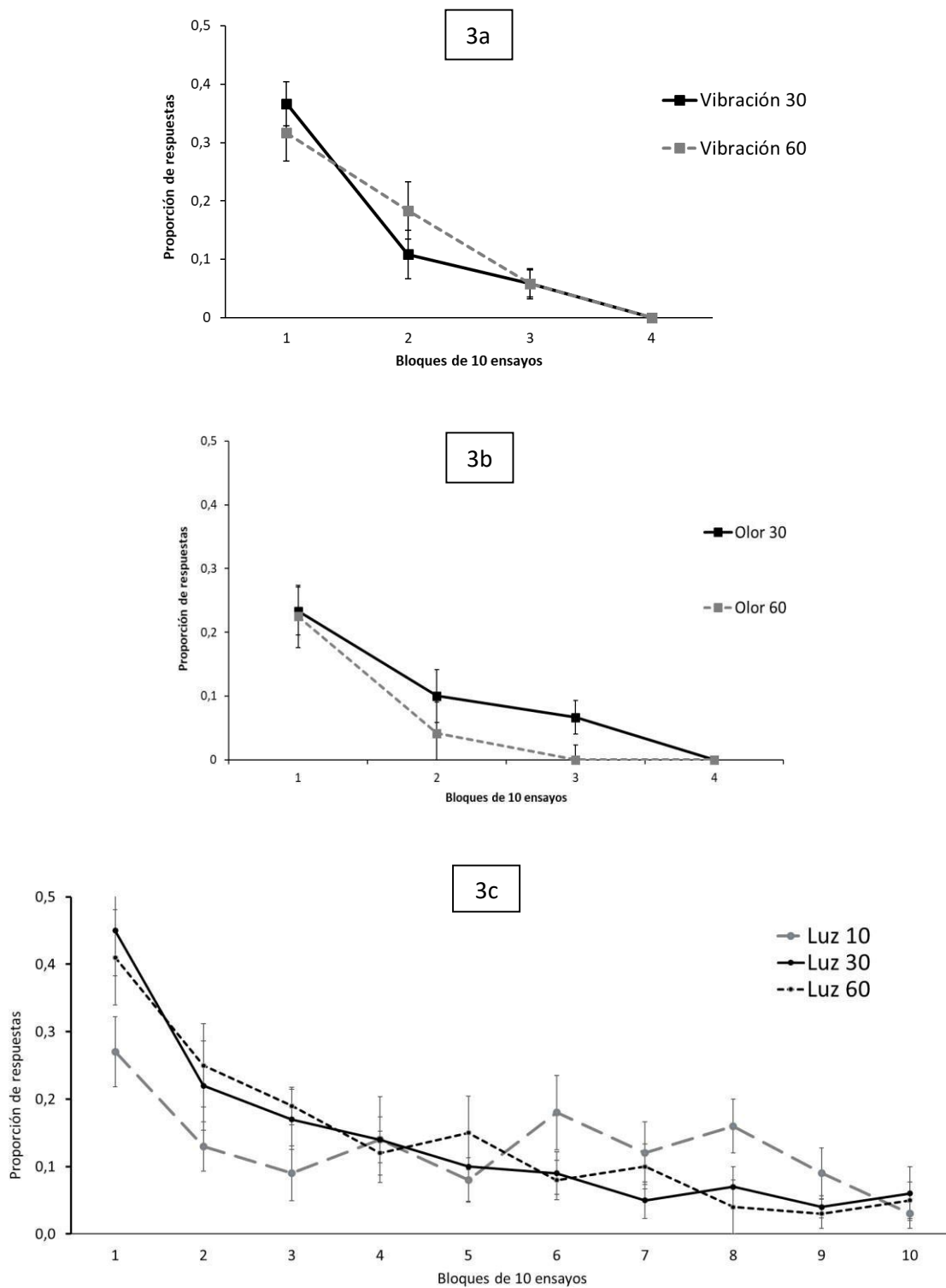
El laboratorio y los aparatos fueron los mismos que los empleados en los experimentos anteriores excepto por las placas de poliuretano, las cuales fueron sustituidas por placas de Petri de 9 centímetros de diámetro que limitaban el movimiento de la lombriz impidiendo que escapara sin necesidad de la intervención por parte de los experimentadores.

### ***Procedimiento***

Inicialmente, los sujetos fueron recogidos del macetero de forma individual, lavados con agua destilada, pesados y colocados sobre las placas de Petri humedecidas con 10 ml de agua corriente. A continuación, eran divididos de forma pseudoaleatoria entre los grupos *Vibración 30* (n=12) y *Vibración 60* (n=12) (Experimento 3a), *Olor 30* (n=12) y *Olor 60* (n=12) (Experimento 3b), *Luz 10* (n=10), *Luz 30* (n=10) y *Luz 60* (n=10) (Experimento 3c).

Tras ello, los sujetos fueron habituados al estímulo que indicaba el grupo al que pertenecían y con el intervalo entre ensayos designado. De esta forma, los sujetos del grupo *Vibración 30* recibiría el estímulo vibratorio cada treinta segundos, el grupo *Vibración 60* cada sesenta segundos; el grupo *Olor 30* recibiría la inyección de olor cada treinta segundos, el grupo *Olor 60* cada sesenta segundos; los sujetos del grupo *Luz 10* recibieron la presentación repetida de la luz cada diez segundos, *Luz 30* cada treinta segundos y *Luz 60* cada sesenta segundos. La habituación se dio por concluida en el caso de la vibración y el olor cuando los sujetos mostraban diez ensayos consecutivos sin responder. Para la luz, el entrenamiento alcanzaba los 100 ensayos fijos puesto que, según los datos del experimento anterior, eran suficientes para alcanzar la asíntota de la habituación y así se evitaba el alargar el entrenamiento a causa de escasos sujetos. Para asegurar que el descenso de respuesta no se debió a la fatiga se tocó 5 veces en la cabeza de las lombrices con el capuchón de un bolígrafo *Bic*.

## Resultados y Discusión



**Figura 3.** Resultados del experimento 3a, 3b y 3c. Proporción de respuestas ante el estímulo vibración cada 30 o 60 segundos (3a), olor cada 30 y 60 segundos (3b) y luz cada 10, 30 y 60 segundos (3c).

Los resultados de este experimento para la vibración, olor y luz se muestran en la Figura 3 (gráficas 3a, 3b y 3c, respectivamente). Esta refleja la proporción de respuestas de los distintos grupos *Vibración 30 y Vibración 60 (3a)*, *Olor 30 y Olor 60 (3b)*, *Luz 10, Luz 30 y Luz 60 (3c)*.

En todos ellos se observa una progresiva reducción en la proporción de respuestas a medida que avanza el entrenamiento. Para apreciar si existen diferencias estadísticas entre los grupos se llevó a cabo un ANOVA de medidas repetidas con el factor intra “bloque” y el factor entre “intervalo”.

Los resultados de estos análisis mostraron un efecto significativo del factor bloque para los tres estímulos (vibración, olor y luz) [3a ( $F_{3,66} = 55,77$ ;  $p < 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,717$ ), 3b ( $F_{3,66} = 33,04$ ;  $p < 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,600$ ) y 3c ( $F_{9,243} = 19,44$ ;  $p < 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,419$ )]. No hubo efecto del grupo cuando se presentaba el estímulo luz ( $F_{2,27} = 0,073$ ;  $p > 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,005$ ) vibración ( $F_{1,22} = 0,36$ ;  $p > 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,002$ ) ni el olor ( $F_{1,22} = 2,33$ ;  $p > 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,096$ ). Se encuentra una interacción bloque\*grupo en el caso de la luz [3c ( $F_{18,243} = 2,05$ ;  $p < 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,132$ )] pero no en la vibración ( $F_{3,66} = 1,66$ ;  $p > 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,07$ ) ni en el olor ( $F_{3,66} = 0,929$ ;  $p > 0.05$ ;  $\eta^2 = 0,041$ ).

La observación de la gráfica de la figura 3c sugiere que la interacción bloque\*grupo encontrada podría ser debida a la diferencia en el nivel de respuesta de los grupos en función del bloque estudiado. Sin embargo, el ANOVA realizado mostró que no hubo diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los bloques ( $F_{s\ 2,27} \leq 2,85$ ;  $p > 0,05$ ), ni siquiera en el primero de los bloques ( $F_{2,27} = 2,203$ ;  $p = 0,130$   $\eta^2 = 0,140$ ).

Los resultados no pueden ser explicados por la fatiga ya que los sujetos que recibieron como estímulo una vibración, respondieron a los 5 (36% de los sujetos), 4 (36%), 3 (16%), 2 (8%) y 1 toques (4%) con el capuchón del bolígrafo.

En el experimento donde se presentaba el olor, los sujetos respondieron al capuchón del bolígrafo las 5 (36% de los sujetos), 4 (36%), 3 (16%), 2 (8%), y 1 (4%) veces.

Con respecto a los sujetos que recibieron la luz, estos respondieron a los 5 (43,33% de sujetos), 4 (26,66%), 3 (20%), 2 (6,3%) y 1 (3,33%) toques.

El efecto encontrado de bloque indica que todos los grupos se habitúan al estímulo empleado. Además, la ausencia de diferencias en el factor grupo, señala que dicha habituación ocurre por igual independientemente el intervalo entre ensayos empleado.

Esta ausencia del efecto del intervalo entre ensayos indica que los tiempos designados de 30 y 60 segundos no tienen efectos distintos sobre la velocidad en la que se habitúan a los estímulos. Otros autores (Ratner y Gilpin, 1974) sí observaron un mayor descenso de la respuesta cuando el intervalo entre estímulos era de 10 segundos en comparación con un intervalo de 60 segundos al utilizar un soplo de aire como estímulo. Tal vez esta diferencia entre los intervalos utilizados en este experimento y los empleados por Ratner y Gilpin (1974) podría explicar la discrepancia entre los resultados. Sería por tanto conveniente diseñar un nuevo experimento donde los intervalos entre ensayos a emplear fuesen más distantes.

Finalmente, es interesante señalar (aunque las diferencias no son significativas) la menor proporción de respuestas ante el estímulo luminoso en el experimento 3c en comparación con grupos con ITI mayor. Este hecho sugiere, tal como plantean Gilpin y Ratner (1978), que la habituación se estaría desarrollando de forma más rápida e incluso dentro de los diez primeros ensayos del entrenamiento.

## **Discusión general**

Los resultados de los experimentos muestran el efecto de la habituación de la respuesta de retracción de la lombriz de tierra tal y como lo definen Thompson y Spencer (1966), esto es, un descenso en la proporción de respuestas ante un estímulo debido a la presentación repetida del mismo y que no puede explicarse en términos de fatiga o adaptación sensorial. A su vez, permiten establecer unos parámetros válidos para la exploración de las restantes características de la habituación en este sujeto experimental. Se puede confirmar que este invertebrado ha sido capaz de percibir los estímulos luz, olor y vibración, aunque con una sensibilidad diferente para cada estímulo tal y como parece indicar la diferencia en la tasa de respuestas entre ellos.

Esta diferencia puede estar teniendo lugar debido a la relevancia estimular de la que cada estímulo goza para una determinada especie. Este caso es ilustrado en el estudio de Wilcoxon, Dragoin y Kral (1971) donde los autores llevaron a cabo un experimento de condicionamiento aversivo gustativo con ratas y codornices, asociando un malestar gastrointestinal con un determinado sabor amargo y un color verdoso del agua. Según cabría esperar, el dolor estomacal se asocia de forma natural más fácilmente con un sabor, pero los datos de este experimento mostraron que las codornices asociaban dicho dolor con el color del agua más que con el sabor, dejando claro que ambos animales diferían en la importancia atribuida a cada clave. En el caso de las lombrices puede estar ocurriendo que, debido a la importancia de la luz en el nicho ecológico de la misma, produzca una respuesta mucho mayor. Pensando en términos adaptativos, podemos inferir que mientras una luz puede causar la muerte del animal por deshidratación, el olor es un estímulo asociado a la presencia de nutrientes en el suelo. Así mismo, la vibración no es un estímulo que resulte aversivo en sí mismo, pero es naturalmente asociable a la presencia de depredadores (Catania, 2018; Mitra et al., 2009). En estos estudios, los experimentadores producen una vibración en el suelo donde habitan las lombrices. Tras aplicarla, observan la respuesta de huida y ascenso a la superficie de los sujetos, supuestamente porque estarían

imitando las vibraciones de un depredador natural como es el topo. Este tipo de estudios plantea la conveniencia de tener en cuenta otras respuestas naturales de la lombriz de tierra ante la vibración como son la respuesta de escape o huida. No obstante, hay experimentos que demuestran que dicha retracción de la cabeza es una respuesta válida de estudio ante la vibración ya que está presente con mayor intensidad que otras como el enroscamiento o *hooking* (Gardner, 1968).

Otra posible explicación de estos resultados puede ser la intensidad de los estímulos, la cual puede no ser la más adecuada para producir determinadas respuestas. Debemos distinguir la intensidad *física* de la intensidad *percibida*. Ghirlanda y Enquist (2003), utilizan el ejemplo de un sonido de 100kHz (intensidad física) que no produce respuesta en el oído humano a pesar de tratarse de un receptor especializado para los sonidos. Esto se debe a que la intensidad de 100kHz no alcanza el umbral de intensidad necesaria para ser percibido (intensidad percibida). En el caso de las lombrices, es posible que una luz con estas características sea más fácilmente percibida que la vibración o el olor. Quizás una vibración más fuerte o un olor más intenso provocarían una mayor tasa de respuestas. Establecer los umbrales de respuesta ante distintas intensidades estimulares resultaría de gran utilidad para este tipo de estudios.

Con respecto a los resultados obtenidos en los experimentos sobre la comparación de niveles de respuesta entre grupos de distintos intervalos entre ensayos, no encontramos diferencias entre los parámetros estudiados para ninguno de los estímulos. Esto resulta en contra de nuestras hipótesis iniciales ya que según Ratner y Gilpin (1974) con su experimento de habituación al soplo, se debería encontrar una habituación más rápida en el intervalo menor. En un estudio más reciente con el nematodo *C. elegans* también aparece este efecto de los intervalos (Rankin y Broster, 1992). En él, las autoras habitúan a los nematodos a una vibración que se presenta cada 2, 10, 30 y 60 segundos. Encuentran que los animales habituados con un intervalo entre ensayos menor (10 segundos) muestran una habituación más rápida que los de mayor intervalo (30 y 60

segundos). Estos datos nos sugieren la necesidad de estudiar distintos intervalos entre ensayos en el caso de la lombriz de tierra, procurando que sean más distantes entre ellos.

Finalmente, estos estudios nos permitieron determinar el intervalo entre ensayos que utilizaremos como diseño estándar en nuestros próximos experimentos y el cual fue elegido por dos razones: i) al no haber diferencias en la velocidad de habituación, sería posible utilizar cualquiera de los tiempos estudiados, ii) un intervalo de 30 frente al de 60 permitiría a los investigadores poder entrenar a más sujetos en una menor cantidad de tiempo. Fue por ello que se decidió utilizar como diseño estándar un intervalo entre ensayos de 30 segundos en los estudios venideros.

## Referencias

- Abramson, C. I. (1994). Habituation and sensitization. En *A primer of invertebrate learning: The behavioral perspective*, (Vol. 15, pp. 103-119) Washington, DC, US: American Psychological Association.
- Abramson, C. I., y Buckbee, D. A. (1995). Pseudoconditioning in Earthworms (*Lumbricus terrestris*): Support for Nonassociative Explanations of Classical Conditioning Phenomena Through an Olfactory Paradigm. *Journal of Comparative Psychology*, 109(4), 390–397. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.109.4.390>
- Catania, K. C. (2008). Worm grunting, fiddling, and charming—humans unknowingly mimic a predator to harvest bait. *PLoS One*, 3(10), e3472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003472>
- Chiandetti, C., y Turatto, M. (2017). Context-specific habituation of the freezing response in newborn chicks. *Behavioral Neuroscience*, 131(5), 437. <https://doi.org/10.1037/bne0000212>
- Darwin, Ch. (2010/1881). *La formación del manto vegetal por la acción de las lombrices*. Oviedo, España: KRK ediciones.
- Gardner, L. E. (1968). Retention and Overhabituation of a Dual-Component Response in *Lumbricus Terrestris*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 66(2), 315–318. <https://doi.org/10.1037/h0026357>
- Ghirlanda, S., y Enquist, M. (2003). A century of generalization. *Animal Behaviour*, 66(1), 15-36. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2174>.
- Glanville, B. B., Gilpin, A. R., y Ratner, S. C. (1979). Effects of Interpolated Stimulation on Retention of Habituation in the Earthworm. *The Journal of General Psychology*, 100(2), 287-294. <https://doi.org/10.1080/00221309.1979.9710960>
- Herz, M. J., Peeke, H. V. S., y Wyers, E. J. (1964). Temperature and conditioning in the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Animal Behaviour*, 12(4), 502–507. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(64\)90071-5](https://doi.org/10.1016/0003-3472(64)90071-5)

- Kuenzer, P. (1958). Verhaltensphysiologische untersuchungen über das zucken des regenwurms. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 15(1), 31-49. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1958.tb00553.x>
- Laverack, M.S. (1961). Tactile and chemical perception in earthworms—II responses to acid pH solutions, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2 (1), 22-34. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(61\)90070-6](https://doi.org/10.1016/0010-406X(61)90070-6).
- Mitra, O., Callaham Jr, M. A., Smith, M. L., y Yack, J. E. (2009). Grunting for worms: seismic vibrations cause Diplocardia earthworms to emerge from the soil. *Biology letters*, 5(1), 16-19. <https://10.1098/rsbl.2008.0456>
- Morgan, R. F., Ratner, S. C., y Denny, M. R. (1965). Response of earthworms to light as measured by the GSR. *Psychonomic Science*, 3(1-12), 27-28. <https://doi.org/10.3758/bf03343000>
- Rankin, C. H., Abrams, T., Barry, R. J., Bhatnagar, S., Clayton, D. F., Colombo, J., Coppola, G., Geyer, M. A., Glanzman, D. L., Marsland, S., McSweeney, F. K., Wilson, D. A., Wu, C. F., y Thompson, R. F. (2009). Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 135-138. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>
- Rankin, C. H., y Broster, B. S. (1992). Factors affecting habituation and recovery from habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Behavioral Neuroscience*, 106(2), 239-249. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.106.2.239>
- Ratner, S. C., y Gilpin, A. R. (1974). Habituation and retention of habituation of responses to air puff of normal and decerebrate earthworms. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 86(5), 911-918. <https://doi.org/10.1037/h0036396>
- Ratner, S. C., y Miller, K. R. (1959). Classical conditioning in earthworms, *Lumbricus terrestris*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 52(1), 102-105. <https://doi.org/10.1037/h0042412>
- Ratner, S. C., y Stein, D. G. (1965). Responses of worms to light as a function of intertrial interval and ganglion removal. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 59(2), 301-305. <https://doi.org/10.1037/h0021814>

- Reyes-Jiménez, D., Abad, M. J., y Paredes-Olay, C. (2019). Classical conditioning in earthworms employing an odorous conditioned stimulus. *Behavioural processes*, 164, 214-216. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2019.05.014>
- Thompson, R. F., y Spencer, W. A. (1966). Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological Review*, 73(1), 16-43. <https://doi.org/10.1037/h0022681>
- Tomsic, D., Massoni, V., Maldonado, H., Zoologica, S., y Dohrn, A. (1993). Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs: ontogenic, ecological and opioid modulation correlates. *Journal of Comparative Physiology A*, 173(5), 621-633. <https://doi.org/10.1007/BF00197770>
- Verdejo Araya, J., Bustos, V., Mondaca, P., Celis-Diez, J. y Neaman, A. (2015). Lombrices de tierra como indicadores de la calidad de suelos afectados por actividades mineras (Earthworms as indicators of soil quality in soils affected by mining activities). *América Economía*. 108. 43.
- Wilcoxon, H. C., Dragoin, W. B., y Kral, P. A. (1971). Illness-induced aversions in rat and quail: Relative salience of visual and gustatory cues. *Science*, 171(3973), 826-828. <https://doi.org/10.1126/science.171.3973.826>
- Zappler, G. (1958). Darwin's worms. *Natural History*, 67(9), 488-495.
- Zirbes, L., Mescher, M., Vrancken, V., Wathelet, J.P., Verheggen, F.J., Thonart, P., y Haubruge, E. (2011) Earthworms Use Odor Cues to Locate and Feed on Microorganisms in Soil. *PLoS ONE*, 6(7): e21927. <https://doi:10.1371/journal.pone.0021927>



## **Capítulo III. Estudios sobre recuperación espontánea**

La recuperación espontánea es definida como la reaparición de la respuesta al volver a presentar un estímulo que cesó tras ser habituado (Thompson y Spencer, 1966). En la descripción de las características de la habituación (McDiarmid, Yu y Rankin, 2019, Rankin et al., 2009; Thompson, 2009; Thompson y Spencer, 1966) se afirma que dicha recuperación espontánea es afectada por diversos factores. Dentro de la literatura con invertebrados, uno de los estudios más detallados sobre los factores que afectan a la habituación es el de Rankin y Broster (1992), ya mencionado en el capítulo anterior. Las autoras estudian la influencia de factores como el intervalo entre ensayos (IEEs) empleado, el grado de habituación y el número de presentaciones del estímulo.

Rankin y Broster (1992), con sus experimentos llevados a cabo con el nematodo *Caenorhabditis elegans*, destacan sobre los demás la influencia del intervalo entre ensayos (IEEs). Concretamente, las autoras encontraron que un entrenamiento con un intervalo corto (10 segundos) provoca una mayor y más temprana recuperación espontánea de la respuesta que entrenamientos con IEEs más largos (30 y 60 segundos). En su trabajo experimental, habituaron a los nematodos a una vibración producida por unos toques en la placa donde se situaban cada 10, 30 y 60 segundos. Esta fase de habituación consistió en presentar durante 60 ensayos dicha vibración observando si los sujetos mostraban o no la respuesta de retirada. Una vez finalizado el entrenamiento, se medía la respuesta al presentar de nuevo el estímulo a los 30 segundos, 10, 20 y 30 minutos, hallando que los sujetos respondían antes y en mayor cantidad si el entrenamiento había sido llevado a cabo con un IEEs más corto frente a los más largos.

Para el estudio de la influencia del grado de habituación en la recuperación espontánea realizaron un segundo experimento con dos grupos según el intervalo entre ensayos empleado en la habituación (10 vs 60 segundos) y con una fase de test similar.

Los sujetos eran a su vez divididos entre los que habían sido habituados con 60 ensayos y los que alcanzaron un criterio de mostrar 4 respuestas seguidas de “retiradas

incompletas”. Los resultados mostraron una recuperación espontánea más rápida en los primeros bloques del test para los sujetos que cumplían el criterio en comparación con los habituados con 60 ensayos. Dicha diferencia se igualó en ensayos posteriores del test. Estos dos experimentos estudiaban la recuperación espontánea tras alcanzar la asíntota de habituación. Rankin y Broster (1992) diseñaron un tercer experimento que permitió estudiar la recuperación de la respuesta con sujetos que aún no habían alcanzado la asíntota de la habituación. Para ello presentaron la vibración durante 8 ensayos a todos los sujetos del experimento, permitiendo así la creación de una media de respuesta que se usaría como referente para crear los grupos experimentales. Basándose en esta curva, las investigadoras dividieron a los nematodos en dos grupos: los que tenían un nivel de respuesta superior a la curva y los que mostraron una respuesta menor. Los que según este criterio estaban aún habituándose, es decir, los de por encima de la media de respuestas, mostraron una recuperación espontánea más rápida que los sujetos más habituados.

En un estudio posterior, las mismas autoras (Broster y Rankin, 1994) estudiaron si la variabilidad del IEEs empleado durante la habituación podría afectar a la recuperación espontánea. Encontraron que, cuando el intervalo utilizado era de 10 segundos de forma fija durante todo el entrenamiento, la recuperación de la respuesta era más rápida que cuando el intervalo entre ensayos variaba con un tiempo en torno a una media de 10 segundos (por ejemplo, utilizando 8 segundos entre dos ensayos y luego 12 segundos entre otros dos). Al utilizar unos intervalos fijos y variables de 60 segundos en lugar de 10 no se encontraron diferencias.

Otro factor estudiado es el efecto producido por el cambio de IEEs durante la habituación. Concretamente, Broster y Rankin (1994) realizaron un experimento donde se presentó la vibración cambiando el IEEs cada quince ensayos. Esto es, le presentaban al primer grupo la vibración cada 10 segundos y a los quince ensayos cambiaban el IEEs a 60 segundos para ser presentado quince veces más. Se contrabalanceó este grupo añadiendo un

segundo donde se presentaba en primer lugar la vibración con un IEEs de 60 segundos y después de 10. Los experimentadores encontraron que al cambiar de un intervalo largo a uno corto se producía una recuperación mayor y más rápida que cuando se pasaba de un intervalo corto a otro más largo.

A la luz de estos estudios, la importancia del intervalo entre ensayos en la recuperación espontánea de la respuesta habituada queda evidenciada al jugar un papel tan importante en la magnitud del fenómeno. De hecho, este factor ha sido la base de propuestas que tratan de resaltar la importancia de esta característica de la habituación. Rose y Rankin (2001) proponen que la sensibilidad de la recuperación espontánea atendiendo al intervalo entre ensayos del entrenamiento debería ser el método para distinguir entre habituación y fatiga y no la deshabituación como defendían Groves y Thompson (1970). Según las autoras, el nivel de recuperación espontánea tras la habituación usando un intervalo entre ensayos largo y corto es la opuesta a la que se esperaría encontrar en caso de fatiga o adaptación sensorial. Un intervalo entre ensayos corto produce un mayor descenso de la respuesta que un intervalo entre ensayos largo. Si este decremento fuese el resultado de fatiga o adaptación podríamos predecir que el decremento ocasionado por el intervalo entre ensayos más largo se recuperaría más rápido que el decremento provocado por el intervalo corto. Sin embargo, en la habituación se encuentra lo contrario: un IEEs corto con un decremento mayor de la respuesta se recupera más rápidamente que un IEEs largo que produjo un menor decremento.

Además de los estudios llevados a cabo con el *C. elegans*, es posible encontrar varios estudios de recuperación espontánea en otros invertebrados. Por ejemplo, en el molusco *Aplysia*, se observa una progresiva recuperación de la respuesta de contracción del sifón cuando fue medida a las 24 horas, 7 y 21 días del final de la habituación de una estimulación táctil (Carew, Pinsker y Kandel, 1972). Otro caso es el del poliqueto *Hesperonoë adventor* (Dyal y Hetherington, 1968) cuyo experimento fue descrito en el primer capítulo. Estos animales fotófobos fueron colocados en el escenario experimental bajo una luz aversiva. Para

evitar dicha luz debían recorrer el escenario experimental en el menor tiempo posible hasta una caja con sombra. A medida que avanzaron los ensayos, los experimentadores notificaron que tardaban más tiempo en recorrer el mismo escenario, indicando una habituación a la luz. También se observó que, tras finalizar una sesión y comenzar la siguiente al próximo día, los sujetos volvían a recorrer el escenario de forma más rápida. Esta recuperación de la velocidad de movimiento fue explicada por los autores en términos de recuperación espontánea entre ambas sesiones.

La anémona *Anthopleura elegantissima* es otro animal donde se ha estudiado esta característica, pero obteniendo un resultado diferente (Logan y Beck, 1978). A estos sujetos se les presentaba una estimulación táctil a través de una pequeña corriente de agua marina producida por los experimentadores durante 35-80 ensayos cada sesenta segundos, la cual producía la respuesta de contracción del disco oral del animal. El criterio por el cual determinaban el número de ensayos de cada sesión era si la anémona mostraba una respuesta del 80% de retracción del diámetro del disco seguido de otros dos ensayos donde este no variaba su tamaño. En el caso de que este criterio se cumpliera, los experimentadores concluían que el animal había sido habituado mientras que si no se cumplía seguían hasta los 90 ensayos. Los sujetos fueron entrenados en dos sesiones por día con una separación entre ellas de sesenta minutos. Dicho entrenamiento se llevaba a cabo en dos partes: una primera parte donde se entrenaban el día 1 y el día 4, y otra parte donde se entrenaban el día 1, 2 y 4. Dichas partes fueron contrabalanceadas pero los sujetos siempre recibieron diez sesiones de entrenamiento. Los resultados mostraron que todos los sujetos presentaron un patrón de habituación a largo plazo y que, a partir de las 72 horas del último entrenamiento, reducían la intensidad de la respuesta ante el mismo estímulo. Esto mostró una retención de la habituación en la anémona y una ausencia de recuperación espontánea.

Si nos centramos en el campo de las lombrices de tierra se encuentra el experimento de Gardner (1968), quien mostró que la retención de la habituación a un estímulo vibratorio

se podría extender hasta 24 horas después del entrenamiento tal y como informó Kuenzer (1958; citado en Gardner, 1968) quien utilizaba un estímulo mecánico distinto (shock). Gardner (1968) observó que las reacciones de retracción y retorcimiento aún permanecían habituadas después de este tiempo. Concretamente, en su experimento comparaba las medias de respuesta que mostraban los sujetos hasta habituarse alcanzando un criterio de diez ensayos consecutivos sin respuesta. Encontró que la habituación de dichas respuestas seguía vigente hasta las 24 horas después de la finalización del experimento. Gardner (1968) informó que la media de respuestas había aumentado alrededor de un 40% a las 24 horas, siendo mayor en los siguientes test a las 48 y 96 horas.

Con el fin de estudiar este efecto, fueron diseñados varios experimentos en los que se evaluaría la recuperación espontánea en la lombriz de tierra. El primero de ellos evalúa la recuperación espontánea de la habituación a la vibración siguiendo el mismo paradigma de Gardner (1968) mientras que el segundo experimento se evaluó el fenómeno con un estímulo luminoso.

### **Experimento 1**

En este experimento se habituó un estímulo vibratorio que volvería a ser presentado tras un periodo de tiempo para explorar la recuperación espontánea de la respuesta habituada. El procedimiento, aunque no todos los parámetros, fue similar al empleado por Gardner (1968). Los tiempos de recuperación empleados fueron los informados por Kuenzer (1958) y Gardner (1968) donde se establecía un efecto de recuperación de la respuesta a las 24 horas. Además, se analizan intervalos colindantes como 1 hora, 12 horas y 48 horas para observar la progresión de la recuperación espontánea.

## **Método General**

### ***Sujetos***

Cincuenta y ocho lombrices (*Lumbricidae*) fueron usadas en este experimento y divididas en cuatro grupos de dieciséis por grupo. A lo largo del experimento murieron 6 sujetos, dejando a los dos grupos de mayor duración con trece sujetos cada uno. Todos los sujetos fueron extraídos del medio natural individualmente y fueron almacenadas de forma conjunta en maceteros (70×33×35 cm) con sustrato ecológico mezclado con comida (lechuga, zanahoria y remolacha). Las lombrices tenían una longitud aproximada de entre 8 y 12 centímetros, así como un peso medio de 1,215 gramos. Los sujetos empleados fueron adultos, los cuales mostraban un clitelo visible.

### ***Aparatos***

La vibración usada duraba ocho segundos y era administrada por dos motores (3V, 60mA, 1300 rpm/m) situados bajo la placa de metacrilato (16×27cm). Ambos estaban conectados a una computadora (Rapsberry Pi 2 modelo B con SO Rapsbian) que administraba el estímulo de forma automática y el tiempo de aplicación fue controlado por un programa de Python.

Las lombrices fueron depositadas en placas de Petri transparentes de 9 centímetros de diámetro.

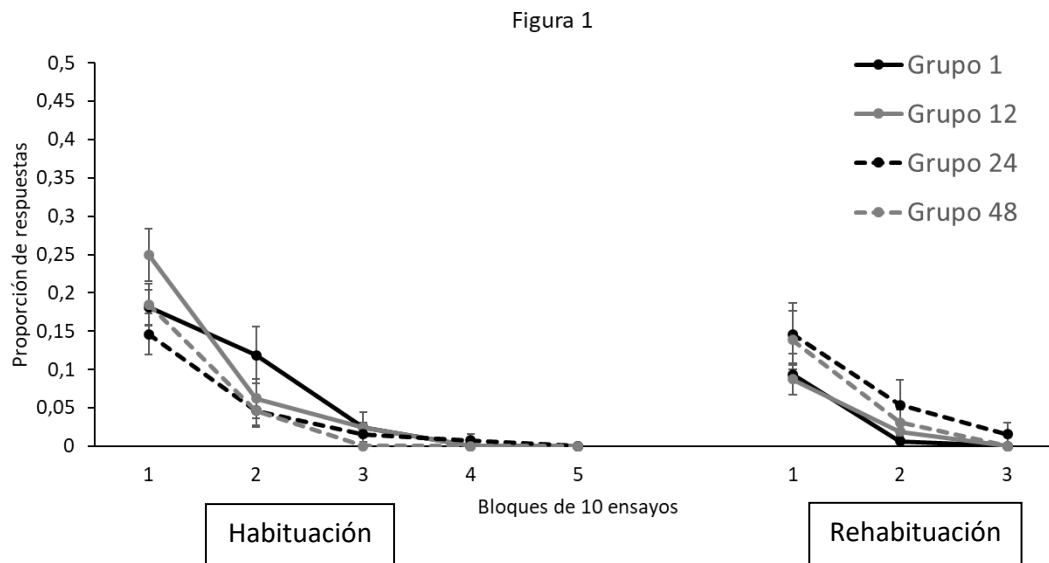
### ***Procedimiento***

El experimento fue llevado a cabo en rondas de dos sujetos observados por dos experimentadores al igual que ha sido descrito en el capítulo anterior. La realización del mismo tuvo lugar en una habitación privada de luz natural, siendo solo iluminada por una bombilla de color rojo cuya luz resulta imperceptible para los animales.

Inicialmente los sujetos eran recolectados de su caja hogar, limpiados con agua destilada y pesados. Inmediatamente después se colocaban en las placas de Petri con 10 ml de agua de grifo y se dejaban pasar dos minutos para permitir la familiarización al ambiente experimental. Después de la familiarización, comenzaba el entrenamiento donde se presentaba la vibración. Tras el experimento, eran devueltas de nuevo a una caja con las mismas condiciones que la caja hogar, pero donde sólo se encontraban lombrices que ya hubiesen sido empleadas en los experimentos. El intervalo entre ensayos empleado fue de treinta segundos.

El experimento estuvo dividido en tres fases. La primera de ellas consistió en la habituación de la vibración hasta alcanzar el criterio de 10 ensayos consecutivos sin responder. Tras esta fase, se empezó inmediatamente con la denominada fase de transición, donde se depositaba a las lombrices en cajas de plástico individuales rellenas con sustrato igual al de la caja hogar. El tiempo hasta la tercera fase (rehabituación), se empezaba a contar justo al finalizar el último ensayo de la habituación y era en estas cajas donde permanecían el tiempo que indicaba el grupo al que perteneciese cada sujeto. Estos grupos fueron cuatro: Grupo 1, Grupo 12, Grupo 24 y Grupo 48. En el Grupo 1 los animales permanecerían esperando una hora entre las fases uno y tres, el Grupo 12 esperaría en su habitáculo durante 12 horas entre esas mismas fases, el Grupo 24 esperaría un día completo y el Grupo 48 esperaría dos días. Al transcurrir este tiempo, las lombrices volvían a ser lavadas y depositadas en las placas de Petri para ser de nuevo habituadas a la vibración hasta alcanzar de nuevo el criterio de diez respuestas consecutivas sin respuesta.

## Resultados y discusión



**Figura 1.** Gráfica de los resultados del experimento 1 en los que aparecen los grupos cuya recuperación se evaluó 1, 12, 24 y 48 horas tras acabar el entrenamiento.

La figura 1 ilustra los resultados del experimento 1. En ella se aprecia una bajada en el nivel de respuesta de los sujetos de todos los grupos durante la fase de habituación del experimento y la recuperación de la misma al inicio de la rehabilitación, la cual vuelve a descender rápidamente. Aunque no se aprecien diferencias a primera vista, es conveniente comparar en qué medida han recuperado las respuestas los sujetos según el grupo al que pertenezcan.

Para analizar la existencia de la habituación se realizó un ANOVA de medidas repetidas de las respuestas mostradas en los primeros cinco bloques de la primera fase y en los tres de la fase posterior.

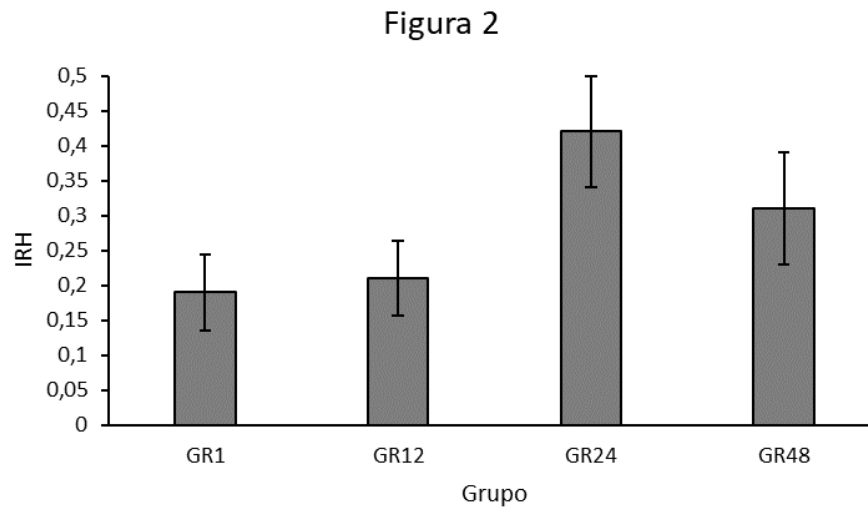
Para comprobar el efecto de recuperación espontánea se necesitó un índice que permitiese comparar la recuperación de la respuesta dentro de los mismos sujetos. Este índice se calculó dividiendo el número de respuestas mostradas en el primer bloque de la rehabilitación entre la suma de ese mismo valor más las respuestas del primer bloque del

entrenamiento (habituaación). La realizaaón de esta operaaón da como resultado el denominado Índice de Recuperaaón de la Habituaación (IRH). Un valor bajo de este índice mostraría una ausencia de recuperaaón en el nivel de respuesta en la rehabituaación mientras que un valor 0,5 reflejaría una recuperaaón de la respuesta a un nivel similar al del bloque inicial del entrenamiento.

Los resultados del primer análisis que estudiaba la habituaación muestra una disminuaón de la respuesta en todos los grupos ( $F_{4,216}=82,842$ ;  $p<0.00$ ;  $\eta^2=0,605$ ) lo cual indica una habituaación. No hubo efecto del grupo ( $F_{3,54}=1,233$ ;  $p>0.05$ ;  $\eta^2=0,064$ ) por lo que podemos decir que todos los grupos se habituaron, pero sí hayamos una interacción grupo\*bloque ( $F_{12,216}=2,039$ ;  $p<0.05$ ;  $\eta^2=0,102$ ). Esta interacción indica que, aunque la habituaación ocurrió en todos los grupos, hubo determinados bloques donde las tasas de respuesta de los sujetos fueron significativamente diferentes. Concretamente, esta diferencia se encuentra en el bloque 1 donde los grupos 12 y 24 muestran una tasa de respuesta diferente ( $p=0,013$ ).

En la fase de rehabituaación se encuentra un descenso de la respuesta ( $F_{2,108}=50,933$ ;  $p<0.00$ ;  $\eta^2=0,485$ ). No hubo efecto del grupo ( $F_{3,54}=1,219$ ;  $p>0.05$ ;  $\eta^2=0,063$ ) ni de la interacción grupo\*bloque ( $F_{6,108}=0,675$ ;  $p>0.05$ ;  $\eta^2=0,036$ ). Podemos concluir que la rehabituaación se llevó a cabo por igual en todos los grupos.

Las medias de los índices de recuperaaón de la habituaación para los grupos 1, 12, 24 y 48 fueron 0,23, 0,24, 0,43 y 0,31 respectivamente (ver Figura 2). Para comparar el nivel de recuperaaón de la respuesta atendiendo al grupo estudiado se realizó un ANOVA de un factor (grupo). El resultado de este análisis no muestra diferencias significativas ( $F_{3,54}=1,680$ ;  $p=0,182$ ;  $\eta^2=0,085$ ).



**Figura 2.** Gráfica de los Índices de Recuperación de la Habitación según el grupo (1, 12, 24 y 48).

Los resultados obtenidos sugieren que no hay una recuperación espontánea claramente significativa en los tiempos e intensidades explorados, aunque se aprecia una tendencia de recuperación a partir de las 24 horas. Este hecho iría en concordancia con el estudio realizado por Gardner (1968) y Kuenzer (1954), quienes encontraron que la respuesta se empezaba a recuperar pasadas 24 horas desde el fin del entrenamiento. No obstante, la ausencia de significatividad podría volver a ser explicada en términos de bajos niveles de respuesta ante la vibración empleada y la posible variabilidad de respuesta entre los sujetos, en comparación con los mostrados en el estudio referido. Los sujetos del estudio de Gardner (1968) mostraban una tasa de respuesta del 100% en los ensayos iniciales con vibración. Estos factores también podrían explicar el descenso que se observa en el IRH del grupo 48 horas con respecto al de 24 horas, aunque como decimos, las diferencias no fueron significativas.

En el siguiente experimento se evaluó la recuperación espontánea ante un estímulo luminoso.

## **Experimento 2**

En este experimento se estudió la recuperación espontánea al estímulo luminoso, el cual es más intenso y produce una mayor tasa de respuestas que la vibración. Por tanto, esperamos encontrar una menor retención de la respuesta y, en consecuencia, una recuperación espontánea más rápida que en el experimento anterior. Estos tiempos utilizados fueron de 15 minutos, 30 minutos, una hora y 12 horas.

### ***Sujetos***

Sesenta y cuatro lombrices fueron usadas en este experimento y divididas en cuatro grupos en función del tiempo de recuperación. Todos los sujetos fueron tratados igual que en el Experimento 1. Las lombrices tenían una longitud entre 7 y 9 centímetros y un peso medio de 0,663 gramos.

### ***Aparatos***

Los aparatos empleados en este experimento fueron los mismos que los utilizados en el experimento previo a excepción de la vibración. En este caso, se usó un estímulo luminoso (1550 lx, 3 segundos de duración) que fue administrado por una lámpara de escritorio centrada sobre la plataforma a una altura de 24 centímetros. La lámpara empleada era activada de manera automática por una computadora (Raspberry Pi 2 modelo B con SO Raspbian) y los tiempos de aplicación del estímulo fueron controlados por un programa de Python diseñado especialmente para esta tarea.

### *Procedimiento*

Inicialmente los sujetos eran recolectados de su caja hogar, limpiados con agua destilada y pesados. Inmediatamente después se colocaban en las placas de Petri de 9 cm de diámetro previamente humedecidas con 10 ml de agua de grifo y se dejaban pasar dos minutos para permitir la familiarización al ambiente experimental. Tras el experimento, eran devueltas de nuevo a una caja con las mismas condiciones que la caja hogar, que se utilizaba para alojar lombrices que ya habían sido empleadas en los experimentos.

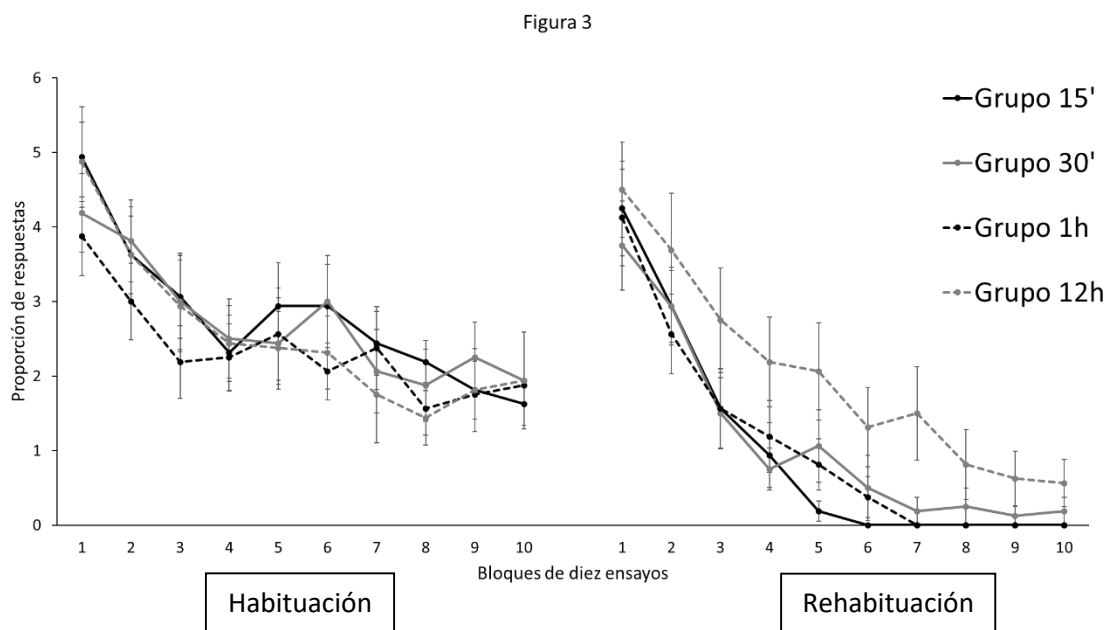
El experimento estuvo formado por tres fases al igual que en el Experimento 1. La primera de ellas consistió en la habituación del estímulo luminoso a lo largo de 100 ensayos de entrenamiento, con un intervalo entre ensayos de 30 segundos. Tras esta fase, se empezó inmediatamente con la fase de transición, donde los sujetos eran colocados en cajas individuales con tierra similar a la de la caja hogar y donde debían permanecer el tiempo que su grupo indicase. Al finalizar este tiempo, los sujetos eran lavados y depositados nuevamente en las placas de Petri donde comenzaría una nueva fase de rehabilitación en las que se les presentó el estímulo a lo largo de 100 ensayos, con un intervalo entre ensayos de 30 segundos. Se utilizó un número fijo de ensayos, tanto en la fase de habituación como en la de rehabilitación. Este número de ensayos fue de 100 debido a que según los experimentos realizados en el capítulo dos, son suficientes ensayos para alcanzar la asíntota de habituación a la luz.

De nuevo como en el experimento anterior, los sujetos fueron divididos en cuatro grupos: Grupo 15, Grupo 30, Grupo 1 y Grupo 12. Los sujetos del Grupo 15 esperaron quince minutos en la caja individual entre las fases 1 y 3. Los del Grupo 30 esperaron media hora en las cajas entre las mismas fases, en Grupo 1 permanecieron una hora y, por último, los del Grupo 12 aguardaron durante doce horas en las cajas individuales entre la habituación y la rehabilitación. Dichos tiempos comenzaban a contar desde el momento que acababan la fase

de habituación.

Los tiempos de recuperación fueron de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora y 12 horas debido a la alta tasa de respuestas de las lombrices ante la luz.

### Resultados y discusión



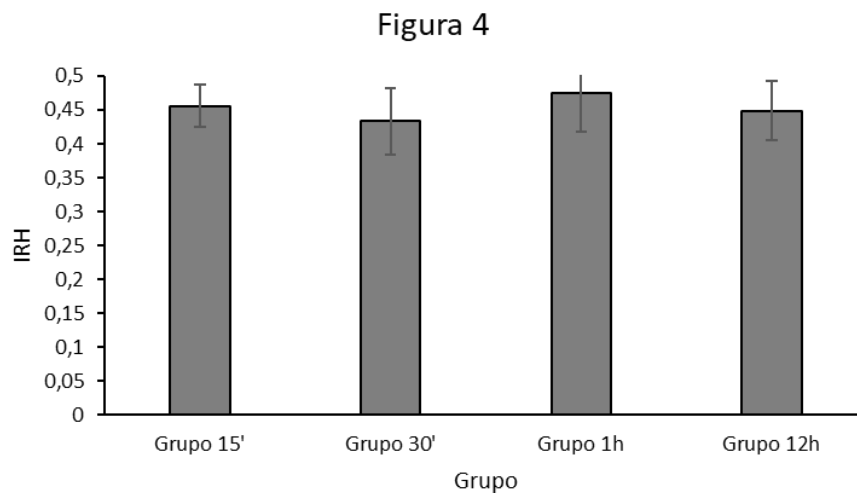
**Figura 3.** Gráfica de los resultados del experimento 2 en los que aparecen la habituación y rehabilitación a un estímulo luminoso de los sujetos de los grupos 15', 30', 1h y 12h.

Los resultados del experimento 2 están representados en la Figura 3. En ella se aprecia un descenso en la proporción de respuestas de todos los grupos en todas las fases. Para evaluar el efecto de descenso de la respuesta se realizó un ANOVA de medidas repetidas para los bloques de la fase de habituación y de rehabilitación.

Con respecto a la recuperación espontánea, se observa una recuperación prácticamente total de la respuesta a partir de 15 minutos de transición, tal como se muestra en la Figura 4. Se realizó el mismo análisis del experimento anterior con el índice de recuperación de la habituación.

Los resultados del primer análisis muestran diferencias significativas en la fase de habituación ( $F_{9,540}=20,994$ ;  $p<0.05$ ;  $\eta^2=0,259$ ). No hubo efecto del grupo ( $F_{3,60}=0,245$ ;  $p>0.05$ ;  $\eta^2=0,012$ ) ni de la interacción grupo\*bloque ( $F_{27,540}=0,638$ ;  $p>0.05$ ;  $\eta^2=0,031$ ). En la fase de rehabilitación hubo un descenso de la respuesta habituada ( $F_{9,531}= 78,509$ ;  $p< 0.05$ ;  $\eta^2=0,571$ ). No hubo efecto del grupo ( $F_{3,59}= 2,135$ ;  $p> 0.05$ ;  $\eta^2=0,098$ ) ni de la interacción grupo\*bloque ( $F_{27,531}= 0,657$ ;  $p> 0.05$ ;  $\eta^2=0,032$ ).

Por último, las medias de los índices de recuperación de la habituación obtenidas fueron 0,45, 0,43, 0,47 y 0,45 para los grupos 15', 30', 1 hora y 12 horas respectivamente. El análisis del IRH no muestra diferencias significativas entre los grupos ( $F_{3,60}=0,137$ ;  $p>0.05$ ;  $\eta^2=0,007$ ).



**Figura 4.** Gráfica de los Índices de Recuperación de la Habituación según el grupo 15', 30', 1h y 12 h.

Estos resultados respaldan la existencia tanto de una habituación en la primera de las fases como una rehabilitación en la fase final en todos los grupos. La respuesta a la luz es recuperada por completo ya a partir de 15 minutos. Dicha recuperación es evidenciada en todos los grupos ya que no hay diferencias en el IRH.

## Discusión general

El objetivo principal de este capítulo fue el de explorar la recuperación espontánea de la respuesta habituada en la lombriz de tierra. En el primer experimento se empleó una vibración mientras que en el segundo experimento se utilizó un estímulo luminoso.

En el primer experimento llevado a cabo con vibración, los datos sugieren una tendencia de la recuperación espontánea de la respuesta a partir de las 24 horas. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Gardner (1968) quien tampoco encontró una recuperación de la respuesta en intervalos menores a las 24 horas. En el segundo experimento los resultados evidencian una recuperación de la respuesta muy temprana, con un intervalo mucho menor que con la vibración (15 minutos).

La conclusión a la que llevan estos experimentos es que la aparición de esta recuperación espontánea depende del estímulo que sea habitado. Esta diferencia podría explicarse en términos de la relevancia biológica del estímulo ya que el tiempo necesario para que aparezca una recuperación de la respuesta es mucho menor cuando se trata de un estímulo tan nocivo para el sujeto como es la luz en comparación de cuando se trata de un estímulo más predictor como es la vibración. Esta capacidad de la luz de poder deshidratar e incluso hacer morir a los sujetos la convierten en un estímulo mucho más relevante que una vibración que sirve como predictor de un depredador, pero no produce un daño en sí misma.

Sin embargo, también debe considerarse una explicación alternativa el número de ensayos empleados. Mientras que en el primer experimento los ensayos se extienden hasta que los sujetos alcanzan un criterio de no responder durante diez ensayos seguidos, en el segundo se estableció un número fijo de ensayos. Esto hizo que en el segundo experimento no se llegara a alcanzar la asíntota de habituación. Esta diferencia podría estar jugando un papel importante en el nivel de respuesta tal y como sugirieron anteriormente Rankin y Broster (1992) en su estudio donde el estímulo que no había sido habitado completamente

mostró una recuperación espontánea más temprana. Es posible que la recuperación tan temprana observada en nuestro experimento puede deberse a que no se alcanzó la asíntota de la habituación en la primera fase del experimento.

## Referencias

- Broster, B. S., y Rankin, C. H. (1994). Effects of changing interstimulus interval during habituation in *Caenorhabditis elegans*. *Behavioral Neuroscience*, 108 (6), 1019–1029. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.108.6.1019>
- Carew, T. J., Pinsker, H. M., y Kandel, E. R. (1972). Long-term habituation of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, 175 (4020), 451-454. <https://doi.org/10.1126/science.175.4020.451>
- Dyal, J. A., y Hetherington, K. (1968). Habituation in the polychaete *Hesperonoë adventor*. *Psychonomic Science*, 13 (5), 263-264. <https://doi.org/10.3758/BF03342515>
- Gardner, L. E. (1968). Retention and Overhabituation of a Dual-Component Response in *Lumbricus Terrestris*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 66 (2), 315–318. <https://doi.org/10.1037/h0026357>
- Groves, P. M., y Thompson, R. F. (1970). Habituation: A dual-process theory. *Psychological Review*, 77 (5), 419–450. <https://doi.org/10.1037/h0029810>
- Kuenzer, P. (1958). Verhaltensphysiologische untersuchungen über das zucken des regenwurms. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 15 (1), 31-49. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1958.tb00553.x>
- Logan, C. A., y Beck, H. P. (1978). Long-term retention of habituation in the sea anemone (*Anthopleura elegantissima*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92 (5), 928–936. <https://doi.org/10.1037/h0077532>
- McDiarmid, T. A., Yu, A. J. y Rankin, C. H. (2019). Habituation Is More Than Learning to Ignore: Multiple Mechanisms Serve to Facilitate Shifts in Behavioral Strategy. *BioEssays*, 41(9), 1900077-. <https://doi.org/10.1002/bies.201900077>
- Rankin, C. H., y Broster, B. S. (1992). Factors affecting habituation and recovery from habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Behavioral Neuroscience*, 106 (2), 239–249. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.106.2.239>

- Rankin, C.H., Abrams, T., Barry, R.J., Bhatnagar, S., Clayton, D.F., Colombo, J., Coppola, G., Geyes, M.A., Glanzman, D.L., Marsland, S., McSweeney, F.K., Wilson, D.A., Wu, C.F., y Thompson, R.F. (2009). Habituation revised: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92 (2), 135-138. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>
- Rose, J. K., y Rankin, C. H. (2001). Analyses of Habituation in *Caenorhabditis elegans*. *Learning & Memory*, 8 (2) 63–69. <https://doi.org/10.1101/lm.37801>
- Thompson, R. F. (2009). Habituation: A history. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92 (2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.011>
- Thompson, R. F., y Spencer, W. A. (1966). Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological review*, 73(1), 16-43. <https://doi.org/10.1037/h0022681>



## **Capítulo IV. Generalización de la habituación.**

En los capítulos anteriores exploramos algunas variables paramétricas temporales y cómo estas afectan al curso de la habituación. En este capítulo analizaremos una de las características más controvertidas de la habituación: su especificidad. Esta controversia surge de los datos contradictorios que se encuentran en la literatura a lo largo de la revisión de las distintas características de la habituación. Por un lado, hay estudios que sugieren que la habituación es específica de un estímulo (McDiarmid, Yu y Rankin, 2019; Rankin et al., 2009) y otros muestran que la habituación se generaliza a otros estímulos (Rankin et al., 2009; Thompson, 2009; Thompson y Spencer; 1966).

Decimos que la habituación se ha generalizado cuando un organismo es habituado a un determinado estímulo y extrapola dicha habituación a otro estímulo diferente (modalidad, intensidad, etc.), de forma que su habituación es más rápida que en el caso de que se presentara solo (Thompson y Spencer, 1966). Cuando la generalización se produce entre estímulos de la misma modalidad sensorial hablamos de generalización intraestimular. Por ejemplo, Crampton y Shwam (1960) estudiaron la habituación del nistagmo (movimiento involuntario de los ojos) en gatos al rotar la plataforma sobre la que eran situados. Los autores encontraron que a medida que variaban la aceleración, los gatos no recuperaban la respuesta del nistagmo por lo que pudieron concluir que la habituación a las primeras rotaciones se había generalizado a las siguientes. Cuando esta se produce entre estímulos de distinta modalidad sensorial, hablamos de generalización entre estímulos. Por ejemplo, Porter (1938) demostró una generalización de la habituación de la respuesta galvánica de la piel entre una luz y un tono. Desde un punto de vista funcional, la idea de que la habituación sea específica del estímulo iría en consonancia con la función adaptativa de la misma, la cual permite al organismo dejar de responder ante estímulos inocuos, mientras permanece aún reactivo a la presentación de nuevos estímulos. Por otro lado, la idea de la generalización de la habituación a otros estímulos es consistente con la idea de que la habituación está ocurriendo de manera

centralizada más que a nivel de receptores sensoriales aferentes (Rankin et al., 2009).

En el caso de los invertebrados, la mayoría de los estudios muestran una generalización intra-estimular, pero no entre estímulos de distinta modalidad sensorial. (Brunner y Maldonado, 1988; Clark, 1960; Cook, 1971; May y Hoy, 1991; Thon y Pauzi, 1984). Un ejemplo de esto es el estudio llevado a cabo con los cangrejos "*Chagmagnathus granulatus*", los cuales fueron habituados a una sombra que era proyectada sobre ellos repetidamente reduciendo así su respuesta de huida (Brunner y Maldonado, 1988). Tras el entrenamiento, los experimentadores separaron a los sujetos en dos grupos a los cuales se les presentaron dos sombras diferentes. El primero de ellos, la duración de la proyección fue la misma que la del entrenamiento, pero en el segundo grupo la sombra se proyectó durante más tiempo en cada ensayo. Encontraron que la sombra de larga duración, a pesar de ser más intensa, no llegaba al nivel de respuesta que mostraba la sombra corta en los primeros bloques del entrenamiento inicial. Si a esto se le añade que la velocidad de habituación de la sombra larga fue más rápida que la corta, es posible afirmar que se trataría de un caso de generalización de la habituación de la sombra corta a la larga.

En el caso del poliqueto "*Nereis pelagica*", Clark (1960) ya encontró que la habituación a un estímulo luminoso débil que no mostraba una respuesta visible afectaba reduciendo la respuesta dada a un estímulo de la misma modalidad, pero más intenso. Sin embargo, los niveles de respuesta ante un shock o una sombra no se vieron influenciados por la habituación previa del otro. También con luces se encuentra el experimento con caracoles "*Limnaea stagnalis*" de Cook (1971), quien demostró que cuando se habitúa un estímulo de la misma modalidad sensorial (en este caso una luz y una sombra) se produce una generalización del que se presente primero al segundo. En cambio, al habitar primero un estímulo mecánico (vibración o shock) y después uno visual (luz), la habituación del primero no afecta al nivel de la respuesta del segundo y viceversa.

En el caso de los grillos, May y Hoy (1991) los habituaron a un determinado ultrasonido y midieron como respuesta el frote de las patas traseras. Tras habituarse, al reproducir un nuevo ultrasonido, los grillos no recuperaban la respuesta por lo que las autoras concluyeron que se trataba de un ejemplo de generalización. Así mismo, la habituación la respuesta motora de la moscarda "*Calliphora vomitoria*" fue habituada a la presencia de un disco que giraba y proyectaba el reflejo de su base sobre ellas. Tras poner el disco a distintas distancias se encuentra que la habituación de la respuesta motora ante el disco se generaliza a cualquier distancia (Thon y Pauzi, 1984).

Así mismo, se puede encontrar evidencias incluso en el protozoo "*Stentor cueruleus*" al no encontrar generalización entre un estímulo mecánico y otro luminoso (Wood, 1973). Por último, en un estudio más reciente, Dehaudt et al. (2019) demostraron que la almeja gigante *Tridacna máxima* muestra una habituación específica del estímulo. En este estudio las almejas eran habituadas a un estímulo táctil, un toque en su caparazón, mientras los autores medían su respuesta de contracción del cuerpo y cierre de caparazón. Tras el entrenamiento, los autores volvieron a habituar a las almejas a una sombra, un estímulo visual que simulaba la presencia de un depredador en el medio natural de las almejas. Los resultados indicaron que la habituación de la respuesta de contracción y cierre se recuperaron, mostrando que la habituación llevada a cabo en el primer entrenamiento era específica de la estimulación táctil y no se había generalizado a otros estímulos. Los autores interpretan este resultado como una evidencia de que las almejas eran capaces de detectar la peligrosidad de los estímulos utilizados, mostrando una respuesta defensiva proporcional ante ambos.

Todos estos estudios secundan que la habituación es específica del estímulo. Sin embargo, en la literatura sobre la lombriz de tierra, es posible encontrar evidencias del proceso de generalización inter-estimular (Gilpin y Ratner, 1978; Glanville, Gilpin y Ratner, 1979). En el estudio de Gilpin y Ratner (1978), las lombrices *Lumbricus terrestris* eran

habitadas a dos estímulos, luz y vibración, en el orden que indicase el grupo al que pertenecieran. Los autores dividieron a las lombrices en cuatro grupos: i) Vibración-Luz-Vibración, ii) Luz-Vibración-Luz, iii) Vibración-Nada-Vibración y iv) Luz-Nada-Luz. Una vez designado el grupo, las lombrices eran habituadas al primero de los estímulos hasta alcanzar un criterio de diez ensayos consecutivos sin mostrar respuesta de retracción. Tras esta primera fase, avanzaban a la siguiente donde las lombrices eran habituadas a un segundo estímulo hasta alcanzar el mismo criterio. Por último, en la tercera fase, eran de nuevo presentados los estímulos iniciales tras dos horas desde el final de la segunda fase. Esta tercera fase la añadieron con el objetivo de explorar el efecto que tendría la presentación intercalada de un nuevo estímulo en la rehabilitación. Para analizar los datos, se comparó la respuesta de los sujetos a los estímulos cuando no eran precedidos con los del mismo estímulo cuando era precedido del otro. Los resultados mostraron que la habituación de un estímulo se ve afectada por la habituación previa del otro sin importar la modalidad sensorial, esto es, se observa una generalización de la luz a la vibración y viceversa. Con respecto a la retención de la habituación encontraron que el presentar la vibración interrumpió la habituación en el grupo LVL, pero la luz no interrumpió la habituación de la vibración en el grupo VLV. Esto lo achacaron a que la vibración era un elicitador más potente que la luz y, por tanto, su habituación sería más difícil de interrumpir que en el caso de esta.

Un año más tarde, Glanville, Gilpin y Ratner (1979) diseñaron un nuevo experimento que apoya la generalización encontrada. Para ello, dividieron a lombrices en los grupos 0, 24 y 48, los cuales representan el número de presentaciones de un soplo que recibían en una primera fase. En una segunda fase, la mitad de los sujetos de cada grupo descansó siendo situado sobre la placa experimental mientras que a la otra mitad se les administraron cinco presentaciones de luz con una duración de dos segundos. Ya en una tercera fase se volvió a presentar el soplo hasta alcanzar un criterio de 5 ensayos seguidos sin respuesta. El resultado

principal de este estudio es que el nivel de respuesta ante la luz en la segunda fase y el soplo en la tercera, descendían si eran precedidos por el otro, es decir, existía una generalización de la habituación entre ambos estímulos. Además, hallaron que el número de presentaciones de soplos estaba inversamente relacionado con el nivel de respuesta ante la luz describiendo una mayor actividad cuando el número de soplos era menor.

Con respecto a la generalización entre estímulos de la misma modalidad sensorial en las lombrices encontramos el estudio de Gilpin, Ratner y Glanville (1978) quienes las habituaron a dos luces de distinta intensidad. Encontraron que, cuando una luz de baja intensidad es habituada en primer lugar, esta generalizará su habituación a otra luz de mayor intensidad. Por el contrario, si se habitúa en primer lugar la más intensa, no generalizará su habituación a la más débil.

Puesto que hay resultados contradictorios, surge una oportunidad de utilizar el paradigma desarrollado que permita añadir nueva evidencia sobre esta característica en la lombriz de tierra. Para ello, utilizando los estímulos ya estudiados, se diseñaron dos procedimientos para evaluar el efecto de generalización. En el primer experimento se exploró la generalización entre un estímulo mecánico y un estímulo luminoso (vibración y luz) y en el segundo experimento se analizó la generalización intra estimular entre dos estímulos mecánicos (soplo y vibración).

## Experimento 1

En este experimento se explora la característica de la generalización de la habituación de retracción de la lombriz entre dos estímulos de distinta modalidad sensorial con un método similar al empleado por Gilpin y Ratner (1978). Para esto se procedió a habituar una luz que se presentaba un número fijo de veces seguido de una habituación a una vibración con un número fijo de ensayos y viceversa. También se incluyó una tercera fase de rehabilitación del primer estímulo para analizar el efecto potencial de la presentación de un estímulo sobre la retención de la respuesta habituada.

### Método General

#### *Sujetos*

Treinta y dos lombrices (*Lumbricidae*) fueron usadas en este experimento y divididas en cuatro grupos. Todos los sujetos fueron extraídos del medio natural individualmente y fueron almacenadas de forma conjunta en maceteros (70×33×35 cm) con sustrato ecológico mezclado con comida (lechuga, apio, zanahoria y remolacha). Las lombrices tenían una longitud aproximada entre 9 y 13 centímetros y una media de 1,23 gramos de peso. Los sujetos empleados fueron adultos, los cuales mostraban un clitelo visible.

#### *Aparatos*

Las lombrices eran colocadas sobre dos bandejas de poliuretano (18x12x2 centímetros) previamente humedecidas y, a su vez, colocadas sobre una placa de metacrilato (16x27cm).

La luz empleada como estímulo (1550 lx, 3 segundos de duración) fue administrada por una lámpara de escritorio centrada sobre la plataforma a una altura de 24 centímetros. La lámpara empleada era activada de manera automática por una computadora (Rapsberry Pi 2 modelo B con SO Rapsbian) y los tiempos de aplicación del estímulo fueron controlados por un programa de Python diseñado especialmente para esta tarea.

La vibración usada duraba ocho segundos y era administrada por dos motores (3V, 60mA, 1300 rpm/m) situados bajo la placa de metacrilato (16×27cm). Ambos estaban conectados a la computadora descrita anteriormente.

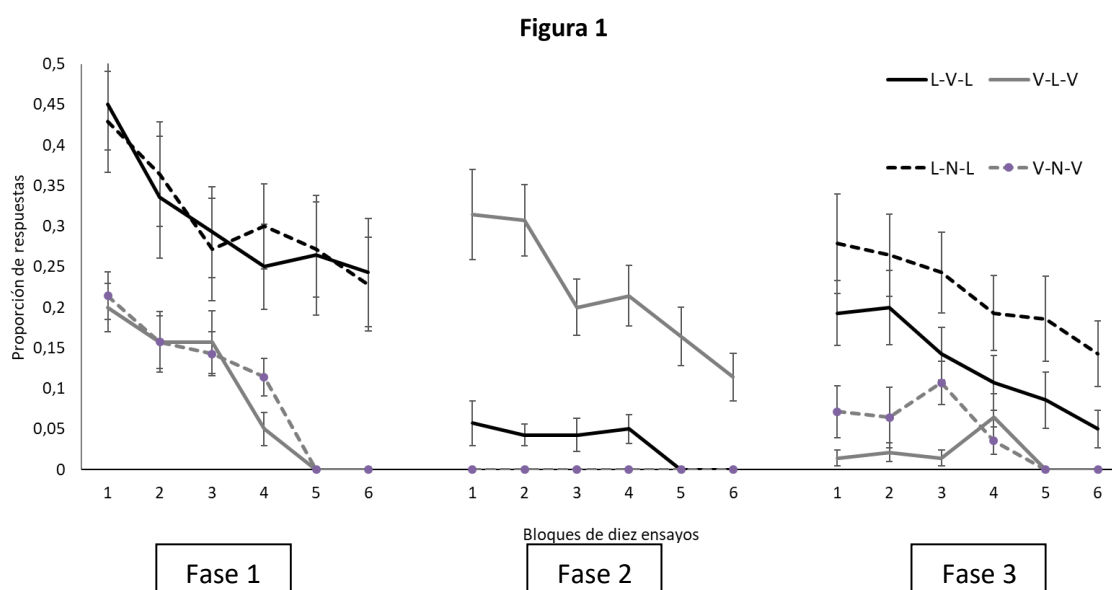
### ***Procedimiento***

Inicialmente los sujetos eran recolectados de su caja hogar, limpiados con agua destilada y pesados. Inmediatamente después se colocaban en las bandejas humedecidas y se dejaban pasar dos minutos para permitir la familiarización al ambiente experimental. Tras el experimento, eran devueltas de nuevo a una caja con las mismas condiciones que la caja hogar, pero donde sólo se encontraban lombrices que ya hubiesen sido empleadas en los experimentos. El experimento fue llevado a cabo en rondas de dos sujetos observados por dos experimentadores al igual que ha sido descrito en el segundo capítulo. La realización del mismo tuvo lugar en una habitación privada de luz natural, siendo solo iluminada por una bombilla de color rojo cuya luz resulta imperceptible para los animales. El experimento se realizó en tres fases diferenciadas. La primera de ellas consistió en la habituación del primero de los estímulos, acabando tras un número fijo de ensayos (60 para la luz y 40 para la vibración). Tras esta fase, se empezó inmediatamente con la segunda, donde en el caso de los grupos experimentales era habituado el segundo estímulo y en el caso de los controles se dejaba a la lombriz sobre la placa sin ninguna estimulación. Por último, la fase tres comenzaba treinta minutos después de acabar la fase 2. En esta última fase se presentó el estímulo de la fase inicial el mismo número de veces. El intervalo entre ensayos fue de treinta

segundos.

Los cuatro grupos en los que los sujetos fueron divididos atendían a los estímulos (Luz o vibración) y condición (Experimental y control) a la que perteneciesen. El grupo “Luz-Vibración-Luz” (grupo L-V-L) recibió un entrenamiento de sesenta ensayos de luz en la primera fase, cuarenta de vibración en la segunda y nuevamente sesenta a la luz. El grupo “Luz-Nada-Luz” (L-N-L) recibió la presentación de la luz en la primera y tercera fase. Durante la segunda fase se mantuvieron en situación experimental, pero sin estimulación durante veinte minutos. En el grupo “Vibración-Luz-Vibración” (V-L-V) se presentó sesenta veces la vibración en la primera fase, cuarenta la luz en la segunda y cuarenta de nuevo la vibración en la tercera. Por último, el grupo “Vibración-Nada-Vibración” (V-N-V) recibió el entrenamiento de cuarenta ensayos de vibración en la fase uno y tres. En la segunda fase, los sujetos permanecían en la situación experimental, pero sin recibir estimulación durante treinta minutos.

### Resultados y discusión



**Figura 1.** Gráfica de los resultados del experimento 1 en los que aparecen los grupos donde se compara la luz (negro) y la vibración (gris) junto con las condiciones “Experimental” (Continua) y “Control” (Discontinua).

Los resultados del experimento 1 se muestran en la Figura 1. Las fases 1 y 3 representan la habituación del estímulo antes y después de presentar el nuevo estímulo respectivamente. La fase dos muestra las respuestas de los sujetos ante la luz habiendo sido precedida por la vibración (línea gris continua) y de la vibración habiendo sido precedida por la luz (línea negra continua). En todas las fases se muestra un patrón típico de la habituación, esto es una disminución progresiva de la respuesta en todos los grupos. Se aprecia, además, una diferencia en la tasa de respuesta ante los estímulos, siendo esta mayor ante la luz que a la vibración.

Para medir la generalización de la habituación del primer estímulo hacia el segundo se analizaron los bloques 1 de las fases uno y dos con un t-test de dos colas asumiendo varianzas iguales.

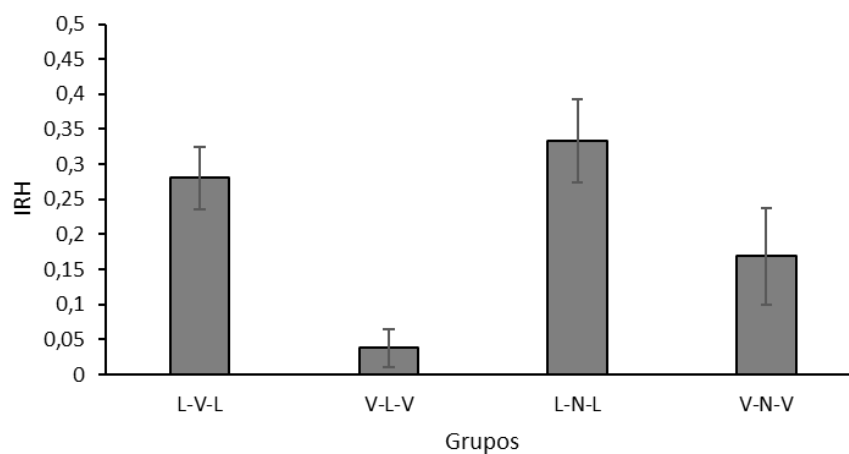
Para analizar la existencia de la habituación se realizó una ANOVA de medidas repetidas en cada fase. Para medir la generalización de la habituación del primer estímulo hacia el segundo se compararon los niveles de respuesta del primer bloque de las fases 1 y 2 atendiendo a la primera vez que era presentado cada estímulo por medio de dos pruebas t de dos colas para muestras independientes asumiendo varianzas iguales. Esto es, se comparó la fase 1 de **L-N-L** con la fase 2 de **V-L-V** y también se comparó la fase 1 de **V-N-V** con la fase 2 de **L-V-L**. Por último, para analizar el efecto que ha tenido la presentación de un estímulo en la retención de la habituación se realizó un ANOVA de los índices de recuperación de la habituación calculados dividiendo las respuestas registradas en el primer bloque de la tercera fase divididas entre la suma de las mismas y las respuestas del primer bloque de la fase 1. En este ANOVA se compararon los valores del IRH atendiendo al factor condición (intercalado vs no intercalado) y al factor estímulo (luz vs vibración).

El análisis de varianzas de la primera fase muestra diferencias significativas en el factor bloque ( $F_{5,260}=22,652$ ;  $p<0,05$ ;  $\eta^2=0,303$ ), y un efecto de grupo ( $F_{3,52}=10,75$ ;  $p=0,00$ ;  $\eta^2=0,383$ ). No se encuentra interacción bloque\*grupo ( $F_{15,260}=0,966$ ;  $p>0,05$ ;  $\eta^2=0,053$ ). Si observamos la fase 1 de la gráfica 1, se aprecia una mayor tasa de respuesta en los grupos donde se presenta la luz en comparación con los grupos donde se presenta la vibración. Un análisis posterior introduciendo el factor estímulo (luz vs vibración) mostró que estas diferencias fueron significativas. Los resultados de este análisis mostraron diferencias significativas en el factor estímulo ( $F_{1,52}=24,51$ ;  $p=0,00$ ;  $\eta^2=0,320$ ). Esto confirmaba que el nivel de respuesta ante la luz era significativamente mayor que ante la vibración, independientemente del grupo en el que se encontrase.

En la fase 2, se encuentra un efecto del bloque ( $F_{5,130}=6,49$ ;  $p<0,05$ ;  $\eta^2=0,200$ ) que indicaría una habituación. Además, se encuentra un efecto del estímulo ( $F_{1,26}=58,89$ ;  $p<0,05$ ;  $\eta^2=0,694$ ) y una interacción grupo\*estímulo ( $F_{1,26}=4,474$ ;  $p=0,044$ ;  $\eta^2=0,147$ ) indicando nuevamente diferencias en el nivel de respuesta a cada estímulo. Esta interacción es explicada por la diferencia en las pendientes de habituación, siendo la pendiente mucho más pronunciada en el caso de la luz que en el de la vibración.

Las pruebas t realizadas no muestran diferencias significativas al comparar los bloques 1 de las fases 1 del grupo LVL con el de la fase 2 del VLV ( $t(26) = 1,721$ ;  $p=0,09$ ) pero sí al comparar el bloque 1 de la fase 1 del grupo VLV con el de la fase 2 del grupo LVL ( $t(26) = -3,553$ ;  $p=0,001$ ). Esto indicaría una generalización de la habituación de la luz hacia la vibración, pero no a la inversa.

Figura 2



**Figura 1.** Gráfica de los índices de recuperación de la habituación para los grupos Luz-Vibración-Luz (L-V-L), Vibración-Luz-Vibración (V-L-V), Luz-Nada-Luz (L-N-L) y Vibración-Nada-Vibración (V-N-V).

Los IRH de todos los grupos son mostrados en la figura 2. Los resultados del ANOVA del IRH muestran que no hubo diferencias significativas entre los grupos intercalado y no intercalado ( $F_{1,60} = 0,285$ ;  $p > 0,05$ ;  $\eta^2 = 0,005$ ). Sí se encontraron diferencias en el factor estímulo ( $F_{1,60} = 4,650$ ;  $p = 0,035$ ;  $\eta^2 = 0,072$ ). No hubo efecto de la interacción estímulo\*condición ( $F_{1,60} = 0,354$ ;  $p > 0,05$ ;  $\eta^2 = 0,006$ ). Estos resultados indican que el índice de recuperación de la habituación de la luz fue mayor que el de la vibración, independientemente de si se había intercalado o no el otro estímulo durante la fase dos. Esto estaría a su vez relacionado con la diferencia en el nivel de respuesta ante cada estímulo.

Los resultados obtenidos en los ANOVA de medidas repetidas demuestran que hay un proceso de habituación al descender la tasa de respuestas en todas las fases. Con respecto a la generalización, al mostrar una diferencia significativa en el bloque inicial de las fases donde se presenta la vibración por primera vez, podemos confirmar que ha habido una generalización de la habituación de la luz hacia la vibración. Sin embargo, el mismo análisis atendiendo a los grupos donde se presenta la luz, no muestra diferencias significativas. Esto sugiere que la habituación de la vibración no se generaliza hacia la luz. Con respecto a la retención de la habituación, no hay diferencias en el factor condición por lo que se puede

concluir que la presentación de un estímulo nuevo no afecta de manera significativa a la retención de la habituación. La diferencia hallada en el factor estímulo indica que el nivel de respuesta difiere entre los estímulos, siendo esta mayor ante la luz que ante la vibración.

Los resultados obtenidos coinciden sólo parcialmente con los encontrados por otros autores (Gilpin y Ratner, 1978). En este estudio, Gilpin y Ratner (1978) encontraron una generalización de la habituación de un estímulo a otro independientemente de su modalidad mientras que nosotros sólo observamos una generalización de la luz a la vibración. Además, la retención de la habituación a la luz se veía afectada cuando se presentaba la vibración entre la fase de habituación y rehabilitación, hecho que no ocurre en nuestros resultados. Estos resultados difieren de los nuestros tal vez debido a los diferentes niveles de respuesta. En nuestro caso, la luz produce un nivel de respuesta superior al de la vibración, hecho que es inversamente informado en el estudio de Gilpin y Ratner (1978), donde encuentran incluso el doble de respuestas ante la vibración que ante la luz.

## **Experimento 2**

En este segundo experimento se analizó el efecto de generalización de la habituación intra estimular empleando dos estímulos mecánicos: un soplo oloroso y una vibración que, además, presentan un nivel de respuesta similar. El procedimiento fue similar al del experimento anterior.

### ***Sujetos***

Sesenta y cuatro lombrices (*Lumbricidae*) fueron usadas en este experimento y divididas en cuatro grupos. Todos los sujetos fueron tratados igual que en el experimento 1. Las lombrices tenían una longitud aproximada de entre 8 y 12 centímetros de longitud y un peso medio de 0,912 gramos.

## ***Aparatos***

Los aparatos empleados en este experimento fueron los mismos que los utilizados en el experimento previo a excepción de la lámpara que administraba la luz. A cambio, se incluyó un soplo oloroso administrado por medio de una jeringuilla con 10 ml de aire a la cual se le aseguraba con una chincheta un papel de filtro (1cm<sup>2</sup>) con una gota de esencia de rosa (Radhe Shyam) al émbolo de la jeringa (Abramson y Buckbee, 1955). Al presionar, el aire expulsado aplicaba el olor a una distancia de 1 cm de la cabeza de los sujetos.

La vibración usada fue la misma que en el experimento 1.

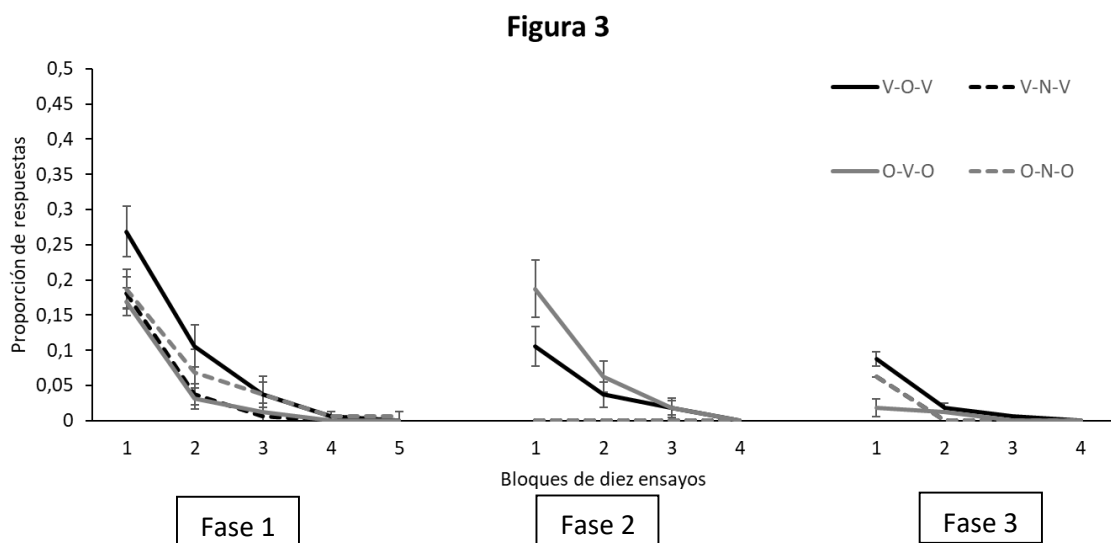
## ***Procedimiento***

Inicialmente los sujetos eran recolectados de su caja hogar, limpiados con agua destilada y pesados. Inmediatamente después se colocaban en las bandejas humedecidas y se dejaban pasar dos minutos para permitir la familiarización al ambiente experimental. Tras el experimento, eran devueltas de nuevo a una caja con las mismas condiciones que la caja hogar, pero donde sólo se encontraban lombrices que ya hubiesen sido empleadas en los experimentos.

El experimento estuvo formado por tres fases al igual que en el experimento 1. La primera de ellas consistió en la habituación del primero de los estímulos, acabando tras conseguir alcanzar el criterio de habituación de diez ensayos consecutivos sin respuesta. Tras esta fase, se empezó inmediatamente con la segunda, donde en el caso de los grupos experimentales era habituado el segundo estímulo y en el caso de los controles se dejaba a la lombriz sobre la placa sin ninguna estimulación. Al finalizar, los sujetos esperaron treinta minutos antes de continuar con la tercera fase, donde se habituaba de nuevo el estímulo inicial. El intervalo entre ensayos fue de treinta segundos.

Los cuatro grupos en los que los sujetos fueron divididos atendían a los estímulos (vibración u olor) y condición (experimental y control) que perteneciesen. El grupo “Vibración-Olor-Vibración” (grupo V-O-V) recibió una exposición a la vibración en la primera fase, de olor en la segunda y nuevamente de vibración en la tercera. El grupo “Vibración-Nada-Vibración” (V-N-V) recibió la presentación de la vibración en la primera y tercera fase, pero se dejó sin estimulación sobre la bandeja en la segunda fase con una duración de media hora. En el grupo “Olor-Vibración-Olor” (O-V-O) se presentó el olor en la primera fase, vibración en la segunda y de nuevo el olor en la tercera. Por último, el grupo “Olor-Nada-Olor” (O-N-O) recibió el entrenamiento de olor en la fase uno y tres, estando treinta minutos sin estimulación sobre la bandeja en la fase dos.

### Resultados y discusión



**Figura 3.** Gráfica de los resultados del experimento 2 en los que aparecen los grupos donde se compara la vibración (negro) y el olor (gris) junto con las condiciones “Experimental” (Continua) y “Control” (Discontinua).

Los resultados del experimento 2 se muestran en la Figura 2. En ella se aprecia un descenso en el nivel de todos los grupos en todas las fases.

Se realizaron varias ANOVA de medidas repetidas para cada fase que permitieron corroborar la existencia de una habituación. Para comparar la generalización de la habituación de un estímulo a otro, se compararon los niveles de respuesta del primer bloque de las fases 1 y 2 atendiendo a la primera vez que era presentado cada estímulo por medio de dos pruebas t de dos colas para muestras independientes tal y como se hizo en el experimento 1. Esto es, se comparó la fase 1 de **V-N-V** con la fase 2 de **O-V-O** y también se comparó la fase 1 de **O-N-O** con la fase 2 de **V-O-V**. Por último, para explorar el efecto de la exposición de un nuevo estímulo en la retención de la habituación, se llevó a cabo un ANOVA de los índices de recuperación de la habituación tal y como se hizo en el primer experimento.

Los resultados del ANOVA de medidas repetidas muestran diferencias significativas en la fase 1 para el factor bloque ( $F_{3,180}=122,30$ ;  $p=0,00$ ;  $\eta^2=0,671$ ) pero no en el factor grupo ( $F_{3,60}=2,58$ ;  $p>0,05$ ;  $\eta^2=0,114$ ) ni interacción grupo\*bloque ( $F_{9,180}=1,64$ ;  $p=0,00$ ;  $\eta^2=0,076$ ). Esto significa que se llevó a cabo una habituación de la respuesta y que fue igual para ambos estímulos.

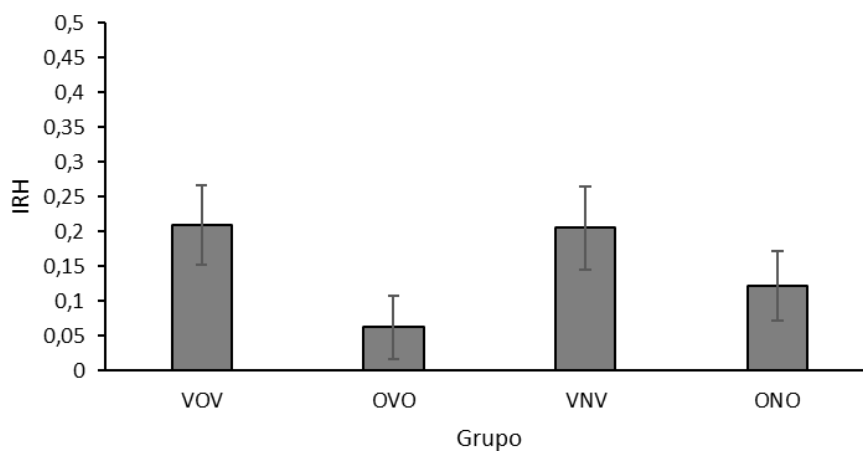
En la fase 2 se encontraron diferencias en el factor bloque ( $F_{3,90}=25,46$ ;  $p=0,00$ ;  $\eta^2=0,459$ ) pero no un efecto de grupo ( $F_{1,30}=1,84$ ;  $p>0,05$ ;  $\eta^2=0,058$ ) ni una interacción ( $F_{3,90}=2,19$ ;  $p>0,05$ ;  $\eta^2=0,068$ ) lo cual indicaba que la habituación se había llevado a cabo en ambos estímulos por igual. Finalmente, en la fase 3, se encontró de nuevo un efecto del bloque ( $F_{2,120}=24,40$ ;  $p=0,00$ ;  $\eta^2=0,289$ ) pero no del grupo ( $F_{3,60}=1,91$ ;  $p>0,05$ ;  $\eta^2=0,087$ ) ni de la interacción bloque\*grupo ( $F_{6,120}=1,73$ ;  $p>0,05$ ;  $\eta^2=0,079$ ), indicando nuevamente una habituación similar para todos los grupos.

Los resultados del análisis de las pruebas t muestran que no hubo diferencias significativas al comparar los niveles de respuesta ante la vibración en el bloque 1 de las fases 1 del grupo **VOV** y fase 2 del grupo **OVO** ( $t(30)=1,492$ ;  $p=0,146$ ) ni ante el olor al comparar el bloque 1 de la fase 1 del grupo **OVO** y la fase 2 del grupo **VOV** ( $t(30)=1,818$ ;  $p=0,079$ ).

Esto indica que no hubo efecto de generalización de la habituación entre ninguno de los estímulos.

Para analizar el efecto que ha tenido el intercalar un estímulo nuevo entre las fases una y tres se utilizaron los IRH descritos en el experimento anterior. Los IRH se muestran en la figura 4. Los resultados del ANOVA muestran que no hubo un efecto significativo de la condición (pre-expuesto vs no pre-expuesto) ( $F_{1,60}=0,285$ ;  $p>0,05$ ;  $\eta^2=0,005$ ). Sí se encontraron diferencias en el IRH atendiendo el estímulo empleado (vibración vs olor) ( $F_{1,60}=4,65$ ;  $p<0,05$ ;  $\eta^2=0,072$ ), lo cual indicaría que el nivel de recuperación variaba dependiendo del estímulo que se estuviese presentando, en concreto se observó una mayor recuperación ante la vibración que ante el olor. No se halló ninguna interacción condición\*estímulo ( $F_{1,60}=0,354$ ;  $p>0,05$ ;  $\eta^2=0,006$ ). Como se puede apreciar en la figura 4, la presentación de un olor entre las fases 1 y 3 de la habituación a la vibración no afecta en ningún modo.

Figura 4



**Figura 4.** Gráfica de los IRH de los grupos Vibración-Olor-Vibración (VOV), Olor-Vibración-Olor (OVO), Vibración-Nada-Vibración (VNV) y Olor-Nada-Olor (ONO).

En este caso parece que la habituación es específica del estímulo, por lo que los resultados del experimento anterior podrían depender, en parte, de la intensidad de respuesta generada por los estímulos. Además de esto, los resultados del análisis llevado a cabo con el IRH de la fase tres de este segundo experimento, sugiere que la presentación del estímulo vibratorio entre dos fases de habituación al olor no produce ningún efecto sobre la retención de la misma. Por el contrario, si es el olor el estímulo que se presenta entre dos fases de vibración, encontramos que afecta a la retención de la habituación de la vibración.

## **Discusión general**

El objetivo principal de este capítulo fue el de explorar la característica de la especificidad de la habituación. Los análisis de nuestros experimentos respaldan la idea de que la habituación es específica del estímulo. Concretamente, la habituación no se generaliza excepto en el caso de que una luz preceda a una vibración. Es únicamente en este caso cuando encontramos que la generalización ocurre. La explicación de esta generalización de la luz a la vibración podría venir dada por la diferencia en las tasas de respuestas de los sujetos ante ambos estímulos y la intensidad de los mismos. El efecto de la intensidad del estímulo en el proceso de generalización no es nuevo ya que fue notificado por varios autores (Brunner y Maldonado, 1988; Coombs, 1938; Gilpin y Ratner, 1978; Gilpin, Ratner y Glandville, 1978; Ghirlanda y Enquist, 2003). Según nuestros resultados, el estímulo que produce una mayor tasa de respuesta se generaliza hacia el que genera una menor tasa, concretamente de la luz a la vibración. Sería lógico pensar, que la luz resulta mucho más intensa para la lombriz que la vibración. Sin embargo, Gilpin, Ratner y Glandville (1978) realizaron un experimento donde habituaban a las lombrices a dos luces de distinta intensidad, mostrando cómo la habituación de la luz débil se generalizaba a la luz más fuerte, al contrario que encontramos en este capítulo.

Esta contradicción nos hace volver a plantear la importancia de lo que consideramos intensidad física y la diferencia con la medida en la que es percibida por los sujetos (intensidad percibida). La intensidad física de un estímulo está relacionada con la potencia del mismo, es decir, de forma empírica sería adecuado afirmar que una intensidad de 7000 luxes en una luz es más intensa que una de 1600 luxes. Sin embargo, nos referimos a la intensidad percibida cuando hablamos de la capacidad del sujeto de percibir dicha diferencia a través de sus receptores sensoriales. Ghirlanda y Enquist (2003) ejemplifican esta idea con un sonido que posee una intensidad física de 100Hz, el cual puede no produce ninguna

activación en el oído humano.

Además de la explicación de los resultados en términos de intensidad, comparando los resultados de estos experimentos con los obtenidos en el estudio de Gilpin y Ratner (1978) coincidimos en que el estímulo más intenso va a ser el que se generalice al menos intenso. Saliendo del campo de los invertebrados, encontramos evidencias de esta conclusión en experimentos llevados a cabo con ratas (Davis y Wagner, 1968), quienes, tras habituar a ratas a diversos tonos de distinta intensidad, encuentran una generalización del tono más intenso a los tonos menos intensos.

## Referencias

- Abramson, C. I., y Buckbee, D. A. (1995). Pseudoconditioning in earthworms (*Lumbricus terrestris*): Support for nonassociative explanations of classical conditioning phenomena through an olfactory paradigm. *Journal of Comparative Psychology*, 109(4), 390-397. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.109.4.390>
- Brunner, D., y Maldonado, H. (1988). Habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*: effect of morphine and naloxone. *Journal of Comparative Physiology*, 162(5), 687-694. <https://doi.org/10.1007/BF01342643>
- Clark, R. B. (1960). Habituation of the polychaete *Nereis* to sudden stimuli. 1. General properties of the habituation process. *Animal Behaviour*, 8(1-2), 82-91. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(60\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0003-3472(60)90013-0)
- Cook, A. (1971). Habituation in a freshwater snail (*Limnaea stagnalis*). *Animal Behaviour*, 19(3), 463-474. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(71\)80099-4](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(71)80099-4)
- Coombs, C. H. (1938). Adaptation of the galvanic response to auditory stimuli. *Journal of Experimental Psychology*, 22(3), 244-268. <https://doi.org/10.1037/h0063313>
- Crampton, G. H., y Schwam, W. J. (1961). Effects of arousal reaction on nystagmus habituation in the cat. *American Journal of Physiology*, 200, 29-33. <https://doi:10.1152/ajplegacy.1961.200.1.29>
- Davis, M. y Wagner, A. R. (1968). Startle responsiveness after habituation to different intensities of tone. *Psychonomic Science*, 12(7), 337-338. <https://doi.org/10.3758/BF03331339>
- Dehault, B., Nguyen, M., Vadlamudi, A., y Blumstein, D. T. (2019). Giant clams discriminate threats along a risk gradient and display varying habituation rates to different stimuli. *Ethology*, 125(6), 392-398. <https://doi:10.1111/eth.12863>

- Ghirlanda, S., y Enquist, M. (2003). A century of generalization. *Animal Behaviour*, 66(1), 15-36. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2174>.
- Gilpin, A. R., y Ratner, S. C. (1978). Intermodal Stimulus Generalization and Retention of Habituation in Earthworms. *Psychological Reports*, 42(3), 683–690. <https://doi.org/10.2466/pr0.1978.42.3.683>
- Gilpin, A. R., Ratner, S. C. y Glanville, B. B. (1978). Stimulus Generalization of Contraction Response to Light in Earthworm. *Perceptual and Motor Skills*, 47 (1), 230-230. <https://doi.org/10.2466/pms.1978.47.1.230>
- Glanville, B. B., Gilpin, A. R., y Ratner, S. C. (1979). Effects of Interpolated Stimulation on Retention of Habituation in the Earthworm. *The Journal of General Psychology*, 100(2), 287-294. <https://doi.org/10.1080/00221309.1979.9710960>
- May, M. L., y Hoy, R. R. (1991). Habituation of the ultrasound-induced acoustic startle response in flying crickets. *Journal of Experimental Biology*, 159(1), 489-499. <https://doi.org/10.1242/jeb.159.1.489>
- McDiarmid, T. A., Yu, A. J., y Rankin, C. H. (2019). Habituation Is More Than Learning to Ignore: Multiple Mechanisms Serve to Facilitate Shifts in Behavioral Strategy. *BioEssays*, 41(9), 1–10. <https://doi.org/10.1002/bies.201900077>
- Porter, J. M., Jr. (1938). Adaptation of the galvanic skin response. *Journal of Experimental Psychology*, 23(5), 553–557. <https://doi.org/10.1037/h0054236>
- Rankin, C.H, Abrams, T., Barry, R.J., Bhatnagar, S., Clayton, D.F., Colombo, J., Coppola, G., Geyes, M.A., Glanzman, D.L., Marsland, S., McSweeney, F.K., ilson, d.A., Wu, C.F., y Thompson, R.F. (2009). Habituation revised: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92 (2), 135-138. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>
- Thompson, R. F. (2009). Habituation: A history. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.011>
- Thompson, R. F., y Spencer, W. A. (1966). Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological review*, 73(1), 16-43.

<https://doi.org/10.1037/h0022681>

Thon, B., y Pauzie, A. (1984). Differential sensitization, retention, and generalization of habituation in two response systems in the blowfly (*Calliphora vomitoira*). *Journal of Comparative Psychology*, 98(2), 119-130. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.98.2.119>

Wood, D. C. (1973). Stimulus specific habituation in a protozoan. *Physiology y behavior*, 11(3), 349-354. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(73\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(73)90011-5)



## **Capítulo V. Estudios sobre la especificidad contextual de la habituación en la lombriz de tierra.**

Como hemos visto, la habituación se ha considerado un fenómeno de aprendizaje básico no asociativo que podría verse afectada por la intensidad y frecuencia del estímulo presentado. No obstante, existen evidencias de que otro factor que puede estar influyendo en ella es el contexto en el que tiene lugar. Concretamente, la habituación que tiene lugar en un contexto determinado desaparece cuando se presenta el mismo estímulo en otro contexto diferente. Esto sugeriría que la habituación podría tener un carácter asociativo y, por consiguiente, unos mecanismos de aprendizaje más complejos de lo que se creían. Los datos empíricos que muestran la especificidad contextual de la habituación provienen de estudios con humanos y animales tanto vertebrados como invertebrados (Siegel, 1977; Tomsic, Massoni y Maldonado, 1993; Turatto, Bonetti y Pascucci, 2017).

Esta influencia del contexto en la habituación ya fue contemplada por Wagner, quien lo definió como un estímulo que, al estar presente, evocaba a los distintos elementos de los estímulos al estado de activación secundario (A2). Sin embargo, esta influencia del contexto sólo se produce con los parámetros de habituación a largo plazo. En el caso de la habituación a corto plazo, los elementos del estímulo que producían la aparición de la respuesta ante el estímulo presente decaen de A1 a A2, haciendo que dejen de producir dicha respuesta. Tras ello, decaen al estado de inactividad I.

No obstante, estudios recientes con invertebrados sugieren la posibilidad de que esta especificidad contextual también está presente en condiciones paramétricas correspondientes a la habituación a corto plazo (Dissegna, Turatto y Chiandetti, 2021). Estos datos abundan en la complejidad de la habituación y en el papel que juega el contexto en el aprendizaje de organismos inferiores. Sería de gran interés explorar si la lombriz de tierra es un sujeto experimental con potencial en el estudio de la habituación y los contextos.

La relevancia adaptativa que posee este fenómeno es enorme ya que indicaría a los organismos que determinados estímulos que no son nocivos en un contexto, sí pueden serlo en

otro. Esta especificidad contextual es cuestionada por Lubow (2010), quien sugiere que la simplicidad neural de los invertebrados los incapacita para distinguir estímulos y contextos y, por lo tanto, para establecer asociaciones entre ellos. De esta forma, Lubow (2010) argumenta que al cambiar el contexto entre una fase de entrenamiento y otra de test, el nivel de la respuesta habituada varía debido a una reducción de la generalización de la habituación presente durante el entrenamiento, en lugar del deterioro de la asociación contexto-estímulo.

En este capítulo se presenta una serie de experimentos recogidos en dos artículos publicados recientemente en los que se examina la especificidad contextual de la habituación en las lombrices de tierra. En el primer experimento se presenta el paradigma experimental utilizado en esta tesis y, además, se demuestra que esta especificidad contextual puede estar presente también en escenarios más complejos donde las lombrices son habituadas a dos estímulos distintos. En el segundo artículo, se explora la naturaleza asociativa de esta especificidad contextual. Para ello, se utilizan procedimientos de pre-exposición (inhibición latente) y post-exposición (extinción) al contexto. Ambos paradigmas experimentales deberían afectar a la capacidad asociativa del contexto y provocar una recuperación de la respuesta de retracción. Los resultados de estos tratamientos son dispares, mostrando la necesidad de conjugar procesos asociativos y no-asociativos a la hora de explicar el papel del contexto en la habituación.

## Referencias

- Dissegna, A., Turatto, M., y Chiandetti, C. (2021). Context-Specific Habituation: A Review. *Animals*, 11(6), 1767. <https://doi.org/10.3390/ani11061767>
- Lubow, R. (2010). The phylogenetic distribution of latent inhibition. En R. E. Lubow y I. Weiner (Eds.), *Latent inhibition: Cognition, neuroscience and applications to schizophrenia* (pp. 201–224). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511730184.011>
- Siegel, S. (1977). Morphine tolerance acquisition as an associative process. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 3(1), 1-13. <https://doi.org/10.1037//0097-7403.3.1.1>
- Tomsic, D., Massoni, V., y Maldonado, H. (1993). Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs: ontogenic, ecological and opioid modulation correlates. *Journal of Comparative Physiology A*, 173(5), 621-633. <https://doi.org/10.1007/BF00197770>
- Turatto, M., Bonetti, F., y Pascucci, D. (2018). Filtering visual onsets via habituation: A context-specific long-term memory of irrelevant stimuli. *Psychonomic bulletin & review*, 25(3), 1028-1034. <https://doi.org/10.3758/s13423-017-1320-x>

### **Experimental Study I: Contextual Specificity of Habituation in Earthworms.**

Reyes-Jiménez, D., Iglesias-Parro, S., & Paredes-Olay, C. (2020). Contextual specificity of habituation in earthworms. *Journal of Experimental Psychology: Animal Learning and Cognition*, 46(3), 341–353. <https://doi.org/10.1037/xan0000255>

## Contextual Specificity of Habituation in Earthworms

David Reyes-Jiménez, Sergio Iglesias-Parro, and Concepción Paredes-Olay  
University of Jaén




This article reports the context specificity of habituation in earthworms (*Lumbricidae* family). Using earthworms as subjects—which are typically sensitive to odors—the present study sought to evaluate the context specificity of habituation by giving subjects repeated exposures to a bright light in one odorous context, after which they were presented again with the same stimulus in a different context. The recovery of responding in this second context was higher in the group where the odor of this context was different, in comparison with a control group for which the context was the same. To provide further support for these findings, a second experiment was run using a within-subject design where all subjects were trained in both of the conditions. In this case, in addition to the light, vibration was used as a second stimulus. The subjects again displayed a higher increase in responding in the condition where the context was different (in odor) in comparison with the case in which the context was the same, thus replicating the results obtained in the first experiment. We discuss the implications of these results in the light of current data and learning theories.

**Keywords:** context specificity, habituation, earthworms, within-subject design

Habituation, a decrease in responding that results from repeated stimulation, is highly adaptive, because it enables organisms to ignore irrelevant stimuli, conserving their cognitive resources to attend to stimuli that are truly meaningful and necessary for their survival and reproduction. For example, in the context of avoiding predators, habituation enables prey to learn not to respond to situations in which there is low risk of predatory attack (Roberts, 2014). Habituation has been maintained through evolution and has been observed in a variety of responses and in an extensive range of species from single-celled organisms such as amoeba (Jennings, 1906), to invertebrates (Baglan, Lazzari, & Guerrieri, 2017; Perry, Barron, & Cheng, 2013; Pinsky, Kupfermann, Castellucci, & Kandel, 1970; Wyers, Peeke, & Herz, 1973) and all major vertebrate groups including humans (Bradley, Lang, & Cuthbert, 1993; Jeffrey & Cohen, 1971). This phenomenon has even been observed in plants (Gagliano, Renton, Depczynski, & Mancuso, 2014).

*Habituation* is defined as a decrement in responding that results from repeated stimulation and that cannot be explained by sensory adaptation or fatigue. The behavioral characteristics of habituation are well known (Groves & Thompson, 1970; Thompson & Spencer, 1966; Thompson, 2009). Recently, Rankin et al. (2009; see also McDiarmid, Yu, & Rankin, 2019) published a review of these characteristics and explicitly included an additional feature (the

distinction between short-term and long-term habituation): (a) the decrease in responding can affect frequency and/or magnitude of the response and this is usually (but not always) an exponential function of the number of stimulus presentations; (b) habituation dissipates with the passage of time; when the stimulus is withheld following a decrement in responding, the response recovers at least partially (spontaneous recovery); (c) nevertheless, after multiple presentations of the stimulus and spontaneous recoveries, the response decrement becomes successively more rapid; (d) the magnitude of habituation depends on the interstimulus interval (ISI), that is, shorter ISIs will produce more rapid but less resistant habituation in comparison with longer ISIs; (e) habituation is dependent on the intensity of the stimulus, so that a less intense stimulus will produce a rapid and more pronounced decrement in responding; (f) within the same stimulus modality, the response decrement shows some stimulus specificity; (g) the effect of stimulation may continue to accumulate even after the response has declined to zero or reached an asymptotic level; (h) the presentation of a different (usually strong) stimulus results in the recovery of responding to the original stimulus (dishabituation), (i) although repeated presentations of the dishabituation stimulus will result in habituation of dishabituation; and (j) there are two forms of habituation, short-term habituation and long-term habituation, both of which are dependent on the ISI. *Short-term habituation* or *within-session habituation* refers to the response decrement within a test session and may last from a few seconds to minutes or hours. *Long-term habituation* or *between-session habituation* can persist for hours, days, and weeks and it is produced by specific stimulus repetition protocols that usually require longer ISIs than those that produce short-term habituation. Moreover, short-term and long-term habituation depend on different mechanisms. For example, Rankin and colleagues (Ardiel & Rankin, 2010; Beck & Rankin, 1997; Rankin & Broster, 1992; Rose & Rankin, 2001) using the nematode *Caenorhabditis elegans* as a model, have described

 David Reyes-Jiménez,  Sergio Iglesias-Parro, and  Concepción Paredes-Olay, Department of Psychology, University of Jaén.

This research was financially supported by the research group HUM 642: Comparative Psychology: Learning, Attention and Memory from University of Jaén. We thank Juan A. Membrive-Galera for their assistance in the experiments. Finally, we would also like to thank Ricardo F. Paredes Álvarez, who collected and supplied the earthworms.

Correspondence concerning this article should be addressed to Concepción Paredes-Olay, Departamento de Psicología, Universidad de Jaén, Paraje de las Lagunillas s/n, 23071 - Jaén, Spain. E-mail: [cparedes@ujaen.es](mailto:cparedes@ujaen.es)

some of the cellular and genetic mechanisms involved in both short-term and long-term habituation, and provide support for the hypothesis that short ISIs could act on molecular pathways that are different from those associated with longer ISIs. This finding has also been demonstrated in various organisms such as the marine snail *Aplysia californica* (Byrne, Antzoulatos, & Fioravante, 2009; Glanzman, 2009) and the crab *Chasmagnatus granulatus* (Tomsic, de Astrada, Sztarker, & Maldonado, 2009).

Although *habituation* is defined as “the simplest form of learning,” the considerable body of research that has been conducted for more than 80 years (Harris, 1943; Prosser & Hunter, 1936) indicates that this phenomenon may be somewhat more complex than originally thought. In fact, current knowledge about their cellular mechanisms reveals their complexity. It is known that habituation is mediated by various cellular processes that depend not only on the temporal parameters used in the experiments (Bolívar, 2009; Ezzeddine, & Glanzman, 2003; Rose & Rankin, 2001; Tomsic et al., 2009), but also on the different components of the response measured (Ardiel et al., 2018; Randlett et al., 2019). In a recent study, Lau, Timbers, Mahmoud, and Rankin (2013) found that *C. elegans* are capable of both short-term and long-term memory for context conditioning of habituation using an olfactory cue as a context. Further, they demonstrated that the contextual cue enhanced long-term memory for habituation produced by spaced trials with a shorter, 10-s, ISI, but not when a longer interval was used (60-s ISI). Moreover, they found evidence to suggest a dissociation between the mechanisms involved in short-term and long-term habituation and in short-term and long-term memory for the context, using different strains of *C. elegans* mutants. Comparing wild and mutant strains they dissociated the different genes required for long-term memory (*crh-1* gene), and for associative learning (*nmr-1* gene). Moreover, several studies have revealed different mechanisms that mediate the habituation of various response components. For instance, Randlett et al. (2019) identified eight components of the dark flash response in larval Zebra fishes, including probability of response and latency, which are controlled by multiple circuit loci with different molecular requirements. Sanyal et al. (2004) demonstrated the role of dopamine in the modulation of the response probability habituation but not in response distance habituation. In a recent article, McDiarmid et al. (2019) speculates about the adaptive significance of the multiple mechanisms involved in habituation. They propose that these multiple mechanisms facilitate shifts in the behavioral strategy of the organism depending on the characteristics of the stimulus and the context. For example, habituation to an aversive stimulus would produce a decrease in the duration of the response, but not in its probability, which could favor escape. On the other hand, the mechanisms involved in habituation with different ISIs might allow an animal to remain more alert to a stimulus that appears less frequently. Thus, habituation is not a passive form of learning, but instead requires organisms to play an active role in adapting their behavioral strategy according to particular stimuli and contexts.

The complexity of habituation is also evident at a theoretical level, where there is no consensus regarding the precise mechanism underlying the phenomenon (Hall, 1991; Mackintosh, 1987). Sokolov’s *comparator theory* (1963) assumes that the repeated presentation of a stimulus yields the formation of a “neuronal model.” When a stimulus is presented, a comparator looks for a match between the stimulus and the model. If there is a match, the

stimulus is blocked and no behavioral response is produced (habituation), but if there is no such match then it enters into the processor, and a behavioral response appears. Other models have also been proposed, such as S-R theories or Groves and Thompson’s (1970) dual-process theory (Thompson, 2009). The basic assumption of S-R is that habituation occurs simply because the repeated presentation of the stimulus decreases the efficiency of the direct pathway that connects the stimulus (S) with the response (R). Furthermore, the dual-process theory (Groves & Thompson, 1970) suggests that the presentation of any effective stimulus will lead to the operation of two independent processes in the central nervous system, one that is decremental (habituation) and another that is incremental (sensitization), and it is the interaction between them that determines the resulting behavioral response.

The sometimes opponent process model (SOP; Vogel, Ponce, & Wagner, 2019; Wagner, 1981; the extended version of the SOP model [AESOP], Wagner & Brandon, 1989; Whitlow & Wagner, 1984; see also, Uribe-Bahamonde, Becerra, Ponce, & Vogel, 2019, for a quantitative analysis of the model) is perhaps the most widely cited approach. This model states that the representation of any stimulus comprises a large set of elements that can be in one of the three states of activity: inactivity (I), primary activity (A1), and secondary activity (A2). To be fully effective in evoking the unconditioned response (UR), the stimulus should be in the A1 state. The presentation of a stimulus drives a proportion of the inactive elements into A1. Once in the A1 state, the elements decay, first to the A2 state, and then back to the inactivity state. The transition of the elements throughout the three states could account for habituation. In particular, short-term habituation occurs as a consequence of the fact that during the presentation of the stimulus with short ISI intervals, most of its elements will be in the A2 state by the presentation of the eliciting stimulus close in time and, consequently these become less effective in provoking an A1 state (self-generated priming). Long-term habituation, however, is explained differently. In this case, the model assumes that when a stimulus is continuously presented in a given context, an association is formed between the context (conditioned stimulus [CS]) and the stimulus (unconditioned stimulus [US]). The context then drives the elements directly from I to A2, so the stimulus receives less processing (retrieval/associatively generated priming). This does not preclude the role of the context in short ISI intervals, but in this case, the presentation of the stimulus close in time reduces the proportion of elements available to be driven to the A1 state and additionally, there is less time for joint activation of the context and the stimulus in the A1 state. These factors reduce the opportunity for the formation of an association between the stimulus and the context in experiments using a short-term habituation protocol (Bolívar, 2009; Whitlow & Wagner, 1984).

Although *habituation* is defined as a nonassociative form of learning, recent studies in several different species have demonstrated that an organism can form associations during habituation training that can affect later performance, as predicted by the SOP model. In particular, the context conditioning effect has been shown in some habituation experiments with mammals (Evans & Hammond, 1983; Jordan, Strasser, & McHale, 2000) and also invertebrates. For instance, Jordan et al. (2000) found that the contextual control of habituation depends on the response system. They used rats as experimental subjects and measured the generalization of habituation to an auditory stimulus across contexts, but

in different responses systems (i.e., the startle response and lick suppression). Although habituation was found for both of these responses, only the response of lick suppression recovered when the stimulus was tested in a context different to that in which habituation occurred. Pinto, Becerra, Ponce, and Vogel (2014) reported similar dissociations in humans; these authors found contextual specificity of habituation of human heart-rate acceleration in response to an auditory stimulus, but not for habituation of the eyeblink response to a tactile stimulus. These differences could be explained by parametric differences in the temporal course of both responses. Wagner and Vogel (2010) interpreted these results using the AESOP (Wagner & Brandon, 1989) which assumed a distinction between sensorial units (related to the eyeblink and startle response) and emotional units (related to heart rate and lick suppression). Emotional processing is slower than sensorial processing, and thus more susceptible to being associated with the context.

In the case of invertebrates, Tomsic, Pedreira, Romano, Hermitte, and Maldonado (1998) demonstrated a context-US association in long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*, although they also proposed the existence of nonassociative components in long-term habituation in this species (Maldonado, Romano, & Tomsic, 1997). The crab showed an escape response to the sudden presentation of a visual stimulus that signals danger (in nature, crabs are chased by gulls), a response that can be attenuated by the repeated presentation of the stimulus. In their study, Tomsic et al. (1998, see also Tomsic et al., 2009) showed contextual memory for the visual cue as well as latent inhibition and extinction of the context. Similarly, Rankin (2000) also reported context conditioning in habituation in the nematode *C. elegans*. By using a chemosensory cue ( $\text{NaCH}_3\text{COO}$ ) as the context, this study demonstrated that retention of habituation was significantly greater if training and testing were run in the presence of the same chemosensory cue. Additionally, these experiments revealed extinction and latent inhibition of the context, demonstrating that *C. elegans* are capable of associative context conditioning. Interestingly, Rankin (2000) found contextual conditioning using not only a 60-s ISI, which brings about long-term habituation, but also when using 10-s ISI, which is not expected to produce long-term habituation (Beck & Rankin, 1997).

More recently, similar results were observed with newborn chicks. Chiangetti and Turatto (2017) showed that, three days after hatching, chicks showed generalized habituation of the freezing response to sudden acoustic stimuli across different contexts. On Days 3 and 4 after hatching, they exposed chicks suddenly to auditory stimuli (which provoked a freezing response) under different contextual conditions (changing the spatial layout of the cues). The habituated response recovered completely when the chicks were tested in a context different to that used for training. One of the most striking facts of this study is that this context specificity emerged rapidly—after only 15 trials (chicks received two daily sessions of five trials, separated by 1 hr). The authors suggested that this rapid learning could be attributable to the plasticity of the nervous system that corresponds to this period of the life span (the imprinting period).

Moreover, the discrimination between contexts in which stimuli appear is of adaptive significance. For example, in territorial species, it has been shown that habituation to a stimulus in a familiar environment decreases the alarm response, thereby en-

hancing reproductive probability (Wyers et al., 1973). However, to show habituation to a predator in any environment is not an adaptive behavior (Balderrama & Maldonado, 1971).

In summary, all of these findings indicate that the context plays a relevant role in habituation, and thus the study of habituation in different species is of relevance. Therefore, the aim of the present work was to extend the spectrum of species studied in this regard. The species studied in the experiments reported here is the common earthworm (*Lumbricidae* family), a readily available and manageable animal that has received some experimental attention. Earthworms belong to the phylum Annelida (class *Clitellata*, subclass *Oligochaeta*). They live in humid environments, avoid light, and feed on dead organic material, playing a basic role in the formation of vegetable mold (Darwin, 1881). They respond to tactile stimuli (touch, vibration), luminous stimuli (bright light is aversive; whereas they are attracted to dim illumination), chemical, and odorous stimuli. The most striking response to these stimuli is the withdrawal response, which consists of the retraction of the anterior segments of the body, and this is the UR that is often studied in behavioral experiments conducted with this species.

A number of studies have explored some of the characteristics of habituation, such as the influence of stimulus intensity or the number of stimulus presentations (Glanville, Gilpin, & Ratner, 1979; Morgan, Ratner, & Denny, 1965; Ratner & Gardner, 1968; Ratner & Stein, 1965) on the retention of habituation (Gardner, 1968). The effect of the ISI has also been tested in some experiments. For instance, Ratner and Gilpin (1974) found more rapid habituation and rehabilitation to an air puff stimulus with the shortest ISIs (10 s vs. 60 s). In addition, other studies have explored the effect of habituation using stimuli of different sensorial modalities, and the generalization between them (Gilpin & Ratner, 1978). Finally, the role played by certain ganglion structures in habituation has also been considered (Ratner & Gardner, 1968; Ratner & Gilpin, 1974; Ratner & Stein, 1965). No other characteristics of habituation have yet been evaluated.

## Experiment 1

This aim of this experiment was to determine whether the context plays a role in habituation of the withdrawal response in earthworms. Here, the subjects received habituation training in an odorous context (A) and were then rehabilitated to the target stimulus in a second context (B), which could have the same or different odor to that of Context A. If the context plays a role in habituation, we will observe a higher rate of response recovery in the different context than in the same context.

## Method

**Subjects.** Forty earthworms (*Lumbricidae*) were used. All of these were individually collected from a garden and then housed together in standard flowerpots (70 × 33 × 35 cm) filled with garden soil mixed with food. The earthworms were between 8 and 14 cm in length and weighed between 0.75 and 2.1 g. The mean length was 10 cm and the mean weight was 1.124 g. The animals used were adults, as evidenced by the fact that they possessed a clear clitellum. The clitellum is a thickened nonsegmented section of the body wall near the head of the earthworms (around the 14th–17th segments), the main function of which is to store the eggs of the worms.

**Apparatus.** The experiment was run by arranging the subjects in rows of two, observed by two researchers. The experiment was conducted in a dark room illuminated with red light, which is imperceptible to earthworms. The earthworms were placed in two petri dishes (9 cm in diameter) that were located over a methacrylate platform (16 × 27 cm). The light stimulus (1,550 lx, 3 s in duration) was provided by a desk lamp centered over the platform at a height of 24 cm. The desk lamp was connected to a CPU (Raspberry Pi 2 Model B with SO Raspbian) and the timings for applying the stimuli were controlled by Python software designed for this purpose. The odor used as a context was administered by means of a piece of filter paper secured in the middle of the top cover of the petri dish. This was prepared by placing a drop of attar of roses or vanilla (Rhade Shyam) onto a piece of 1 cm<sup>2</sup> filter paper secured to the cover with a small piece of tape. The top covers were treated with the odors at the beginning of the sessions in order to maintain the same intensity of the odors throughout the experiment.

**Procedure.** The earthworms were randomly divided into two groups: “group different” and “group same.” Two subjects from the same group were run at the same time. First, the earthworms were taken from the flowerpots, cleaned with distilled water, and finally placed onto the petri dishes where they remained for a 10-min adaptation period prior to training. During this time, they were exposed to both the rose and vanilla odors for 5 min each to become equally familiar with both of these contexts. This allowed us to reduce the possibility that the change of context produced a recovery of the response because the context produces generalized arousal or sensitization. The change of context was achieved by simply replacing the odor-treated lid (after 5 min) with the one used previously. The order in which the odors were presented during familiarization and training was counterbalanced. Following this phase, the habituation phase began.

Second, the lids were replaced with those that had previously been treated with the odor that must be presented. The different and same groups received 100 exposures to the light, with an ISI of 30 s. The researchers recorded the number of head retraction responses (withdrawal responses, minimum 0.5 cm.) elicited in the presence of the light. Once habituation had finished, the lid was replaced with a metallic grid that prevented the subject from escaping, while allowing the odor to dissipate for 10 min to avoid any mixing of the odors. Further, a small fan was used to generate air flow to eliminate any residual odor. This fan was located close to the subjects but was placed above them to prevent the air flow from being directed toward their bodies.

After 10 min, the rehabilitation phase began. The grid and the fan were removed and the lids with odors were again put in place. In the case of group same the odor was the one used during the habituation phase whereas group different was exposed to the alternative odor. Thus, if group same was exposed to the vanilla odor during the habituation phase, then it was also exposed to vanilla during rehabilitation whereas group different was exposed to the rose odor. Once the covers had been changed, the light was again presented throughout 60 trials of habituation with an ISI of 30 s, and the researchers again recorded the number of head retraction responses.

**Statistical analysis.** To analyze the data, we conducted a mixed-effects analysis of variance (ANOVA). Random intercepts were included for subjects. The analyses were conducted in R (R

Core Team, 2019) using the lmer () function of the lme4 package (Bates, Mächler, Bolker, & Walker, 2014). We used the restricted maximum likelihood as the estimation procedure due to our relatively small sample size (Gumedze & Dunne, 2011) and the Kenward-Roger (Luke, 2017) approximation of the degrees of freedom. The null hypothesis rejection criterion was established at  $p < .05$ .

## Results and Discussion

The results displayed in Figure 1 show the pattern of decline in responding corresponding to habituation training during both the habituation and rehabilitation phases. The repeated presentation of the light led to a progressive decrease in the proportion of retraction responses. The most important result is the recovery of the response shown by group different throughout the rehabilitation phase, which can be attributed to the change of context. Statistical analysis of the habituation and rehabilitation data confirmed this impression of the results.

**Habituation.** A mixed-effect ANOVA was conducted to analyze possible differences in the number of responses across blocks (1 to 10) and groups (different vs. same). Obtained residuals showed nonrelevant departures from normality (Normal Q-Q plot not reported), and Levene’s test for homogeneity of variance was not significant,  $F(19, 380) = 1.23, p = .22$ . Further, the Mauchly test was not significant,  $W(44) = .26, p = .40$ , suggesting a nonsignificant departure from sphericity of the variance-covariance matrix. The results of the ANOVA (see Figure 1, left panel) revealed no significant effect of group,  $F(1, 69.57) < 1$ , but a significant effect of block,  $F(1, 358) = 102.34, p < .01$ , showing effective habituation. The interaction Group × Block was nonsignificant,  $F(1, 358) < 1$ .

**Rehabilitation.** The obtained residuals again revealed nonsignificant departures from normality (Normal Q-Q plot not reported), and Levene’s test for homogeneity of variance was not significant,  $F(11, 228) = 1.06, p = .38$ . Moreover, the Mauchly test was not significant,  $W(14) = .55, p = .10$ , suggesting a nonsignificant departure from sphericity of the variance-covariance matrix. We used the restricted maximum likelihood as the estimation procedure due to our relatively small sample size (Gumedze & Dunne, 2011) and the Kenward-Roger (Luke, 2017) approximation of the degrees of freedom. The obtained results (see Figure 1, right panel) revealed a significant effect of group,  $F(1, 393.95) = 8.44, p < .01$ , of block,  $F(1, 198) = 30.23, p < .01$ , and, more importantly, a significant Group × Block interaction,  $F(1, 198) = 5.72, p < .02$ . For analysis of the interaction we used the emmeans package (Lenth, Singmann, Love, Buerkner, & Herve, 2018). We compared the estimated interaction means obtained from the model, and we adjusted and compared these with the expected means under the null hypothesis. Specifically, we compared differences between groups across blocks. The results revealed significant differences for Block 1,  $t = 2.13, p < .04$ , marginal differences for Block 2,  $t = 1.85, p = .06$ , significant differences for Block 3,  $t = 2.23, p < .03$ , but no differences for Block 4 ( $t = .6$ ), Block 5,  $t = 1.47, p = .13$ , or Block 6,  $t = -.18, p = .85$ .

To analyze whether or not habituation is context specific, we divided the proportion of responses in the first block of the rehabilitation phase by the sum of the proportion of responses in

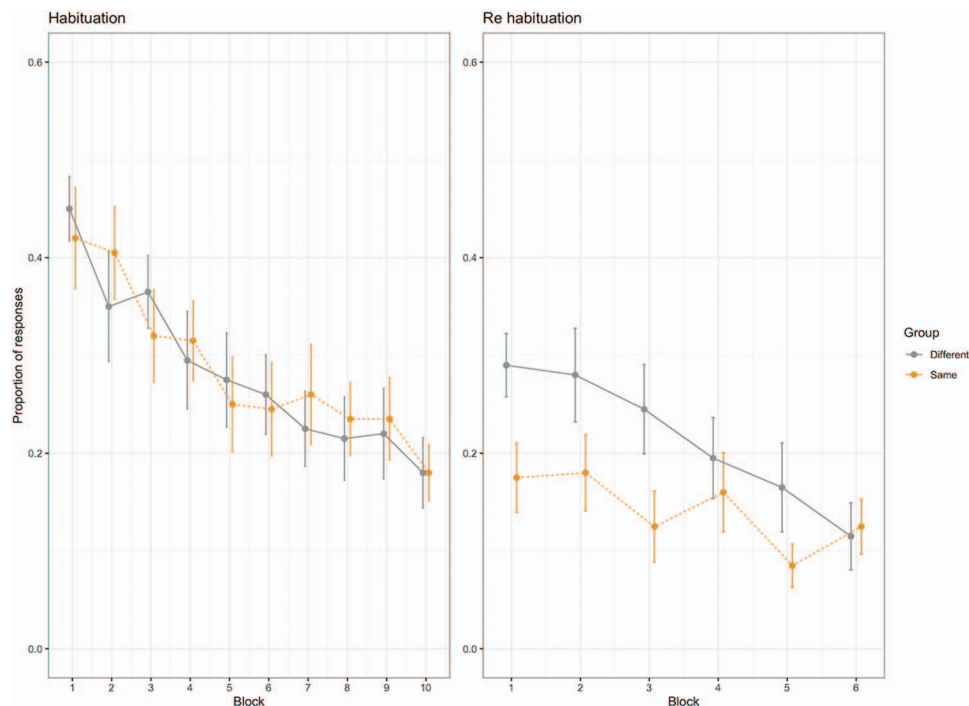


Figure 1. Experiment 1. Proportion of responses for different (gray solid lines) and same (yellow dashed lines) groups across 10-trial blocks in each study phase. See the online article for the color version of this figure.

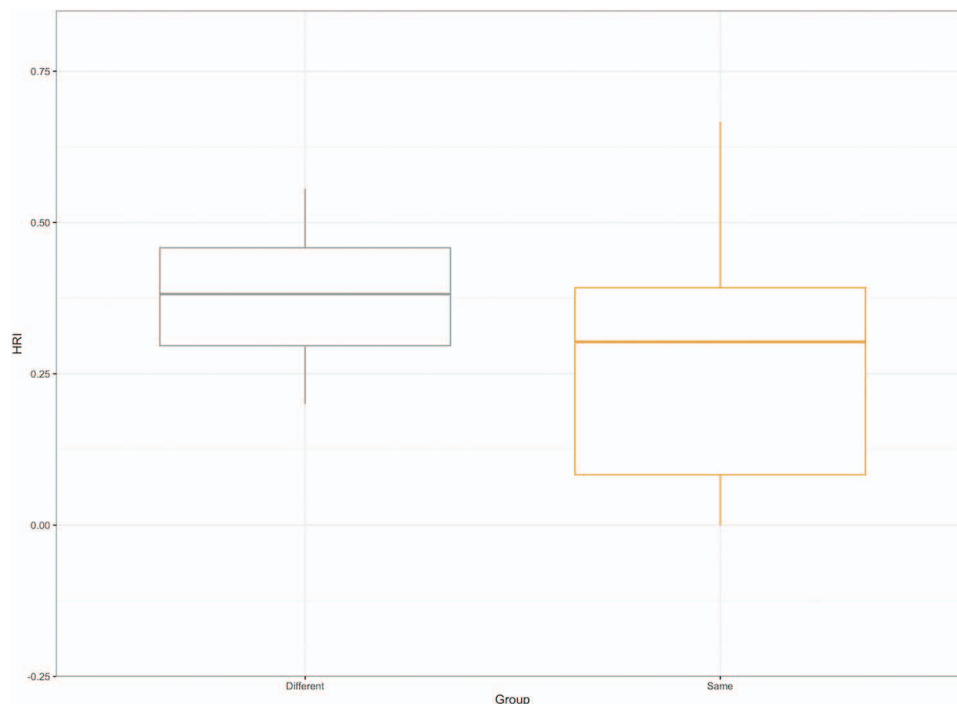
the first block of the habituation phase and the proportion of responses in the first block of the re-habilitation phase (see Figure 2). We referred to this measure as the habituation recovery index (HRI), with lower HRI values being taken to indicate less of a change in responding during re-habilitation, and higher values indicating a recovery of the response. Although Levene's test was significant,  $F(1, 38) = 7.95, p < .05$ , the obtained residuals showed nonsignificant departures from normality (Normal Q-Q plot not reported). As expected, HRI was significantly lower for re-habilitation in the same context ( $M = .27, SD = .21$ ) when compared with the different context ( $M = .38, SD = .10$ ),  $F(1, 38) = 4.38, p < .05$ .

These results demonstrate contextual specificity of the habituation response to the light, that is, a contextual association between the odorous context and the light appeared to be established. The change of context during re-habilitation (group different) brought about a significant recovery of the retraction response, whereas the response for group same remained at similar levels to those obtained at the end of habituation training. It seems reasonable to attribute these results to the change of context, because this was the only way in which the groups differed in terms of the treatment received. However, alternative explanations for the contextual effects of habituation should also be considered. One possibility is that the introduction of a new context during re-habilitation for group different might have produced a form of generalization decrement resulting in increased responding in this group. However, the results reported in the literature show generalization between stimuli of different modalities, that is, the habituation of a stimulus reduces the responsiveness to another stimulus (Gilpin & Ratner, 1978; Glanville et al., 1979). This is precisely the

opposite pattern of results to that expected if there was generalization decrement, and therefore we can rule out this possibility. Further, an explanation in terms of spontaneous recovery could also be discarded, because this would be expected to affect both groups equally. In addition, any arousal artifact produced by the change of the context was also prevented by the familiarization period given to the subjects prior to training. Finally, we can also rule out the possibility of a dishabituation effect brought about by the "new" odor in the different context, because the odor had previously been presented to the subjects. Moreover, the stimuli used as dishabitators are usually stronger than the habituated stimulus and are presented separately from the latter.

## Experiment 2

Lights, vibration, and odors are part of the ecological niche of earthworms, and they are also the stimuli used in the study of learning in this species (Peeke, Herz, & Wyers, 1965, 1967; Ratner & Miller, 1959). In Experiment 1, we demonstrated the contextual specificity of habituation to the light. Thus, it seems reasonable to think that this contextual specificity also affects other stimuli. In this experiment, we introduced a new stimulus (vibration) in order to, first, replicate the effect found in Experiment 1 and, second, to provide further evidence to support the generality of this contextual specificity effect with a new stimulus, using a within-subject design. As in the case of light, vibrations are also part of the ecological niche of earthworms (cues for detecting predators). This experimental protocol offers a complex context that more closely resembles their natural environment. In this experiment, subjects were trained on both of the conditions, same and different. The



*Figure 2.* Experiment 1. Habituation recovery index (HRI) for each group (same vs. different). The HRI was estimated by dividing the proportion of responses in the first block of the rehabilitation phase by the sum of the proportion of responses in the first block of the habituation phase plus the proportion of responses in the first block of the rehabilitation phase. Lower HRI values are taken to indicate less of a change in responding during rehabilitation, whereas higher values indicate a recovery of the response. See the online article for the color version of this figure.

subjects were habituated and rehabilitated to both stimuli, one stimulus under the same condition and the other under the different condition, in a counterbalanced manner. It was also expected that the results of this experiment would provide us with information regarding the sensitivity of earthworms to various environmental contingencies.

## Method

**Subjects.** Twenty-four animals were used in this experiment, all of which were individually collected from the garden and then housed in flowerpots under the same conditions as described for Experiment 1. All the animals were fed and watered once a week. The earthworms were between 8 and 14 cm in length and weighed between 0.65 and 1.4 g. The mean length was 10 cm and the mean weight was 0.9 g. All of the animals were adults, with the clitellum clearly visible.

**Apparatus.** The subjects were placed on the Petri dishes over the same platform that was used in the previous experiment. The light was similar to that used in Experiment 1. A new stimulus was used in this experiment, this being a vibration of 8-s in duration. This was provided by three vibration micromotors of a cell phone (Pinzhi, bio00149-es), that were attached below the methacrylate platform (16 × 27 cm). As with the lamp, the motors were also connected to a CPU (Rapsberry Pi 2 Model B with SO Rapsbian) and the timings for applying the stimuli were controlled by Python software designed for this purpose. The ISI used was 30 s. The

contextual odors (rose, vanilla, and carnation) were prepared in the same way as in the previous experiment. The change of context consisted of replacing the lids, as described in Experiment 1.

**Procedure.** The design of this experiment is shown in Table 1. First, as in the previous experiment, the earthworms were taken from the flowerpots, cleaned with distilled water, and finally placed into the Petri dishes where they remained for a 15-min familiarization period prior to training. During this period, the subjects were exposed to the odors that would be used: rose,

Table 1  
*Design of Experiment 2: Counterbalanced Arrangement Using a Within-Subject Procedure*

Familiarization			Same training		Different training	
			Hab	10' Rehab	24 h	Hab
(A)	(B)	(C)	(A)	(A)	(B)	(C)
			US1	US1	US2	US2

*Note.* Stimuli: US1 = light and US2 = vibration; Hab = habituation phase; Rehab = rehabilitation phase. Stimuli and training phases (same training and different training) were counterbalanced between subjects. Half of the subjects were exposed to light during the same training and to the vibration during the different training; for the other half of subjects this arrangement was reversed. Similarly, half of the subjects received the same training on the first day and the different training on the second day, this arrangement being reversed for the other half of subjects.

vanilla, and carnation (5-min each) by changing only the lids with the odors. The order in which the odors were presented was counterbalanced in this phase.

The training started following the familiarization period. All the subjects received the training “same” with one stimulus and the training “different” with the other stimulus in a counterbalanced fashion, that is, on half of the occasions the light was used in the same training and vibration in the different training, and vice versa. Twenty-four hours elapsed between the training periods. Training consisted of a session of habituation followed by a rehabilitation session 10 mins later. As in Experiment 1, during the 10 min that elapsed between habituation and rehabilitation, the odorous lid was replaced by a metallic grid that prevented the subject from escaping while allowing the odor to dissipate. In the training condition same, the subjects were habituated and rehabilitated to the stimulus (light or vibration) in Context A. In contrast, in the training condition different, the subjects were habituated to the stimulus (light or vibration) in Context B, and rehabilitated to the corresponding stimulus (that is, the one used for habituation) in Context C. The order of the training sessions was also counterbalanced; that is, half of the subjects received the same training first, followed by the different training 24 hr later, and for the other half of subjects this arrangement was reversed. No further counterbalancing was possible due to the limited number of subjects. The light was presented 100 times during habituation and 60 times during rehabilitation, while the vibration was presented 60 times during habituation and 40 times during rehabilitation. We estimated the number of stimulus presentations needed to reach an asymptotic level of habituation on the basis of a previous experiment run in our laboratory (Paredes-Olay, Abad, Membrive-Galera, & Reyes-Jiménez, 2019), to avoid an overhabituation effect (Rankin et al., 2009).

## Results and Discussion

In Experiment 2, subjects received habituation training with two different stimuli (light and vibration) and a subsequent rehabilitation phase was conducted either in the same or in a different context. As a result, there were four possible scenarios: light habituation and rehabilitation in the same context (same light [SL]), light habituation and rehabilitation in the different context (different light [DL]), vibration habituation and rehabilitation in the same context (same vibration [SV]) and vibration habituation and rehabilitation in the different context (different vibration [DV]). See Figure 3 for a representation of the habituation curves corresponding to each scenario.

To examine whether or not effective habituation occurred in each phase, we ran adjusted regression models for each of the scenarios (SL, DV, DL, SV), to examine whether the slope of the regression line was significant. We proceeded to adjust regression equations on the percentage of responses (criterion variable) according to the blocks (predictor variable). In the upper part of Figure 3, scenarios SL and DV are presented. The results indicate that the slope of SL habituation (standardized coefficient =  $-.42$ ,  $t = -5.35$ ,  $p < .01$ ) and the slope of DV rehabilitation (standardized coefficient =  $-.46$ ,  $t = -3.54$ ,  $p < .01$ ) were both significant. However, neither the slope of SL rehabilitation (standardized coefficient =  $-.17$ ,  $t = 1.46$ ,  $p = .14$ ), or the slope of DV

habituation (standardized coefficient =  $-.18$ ,  $t = -1.59$ ,  $p = .11$ ) were significant.

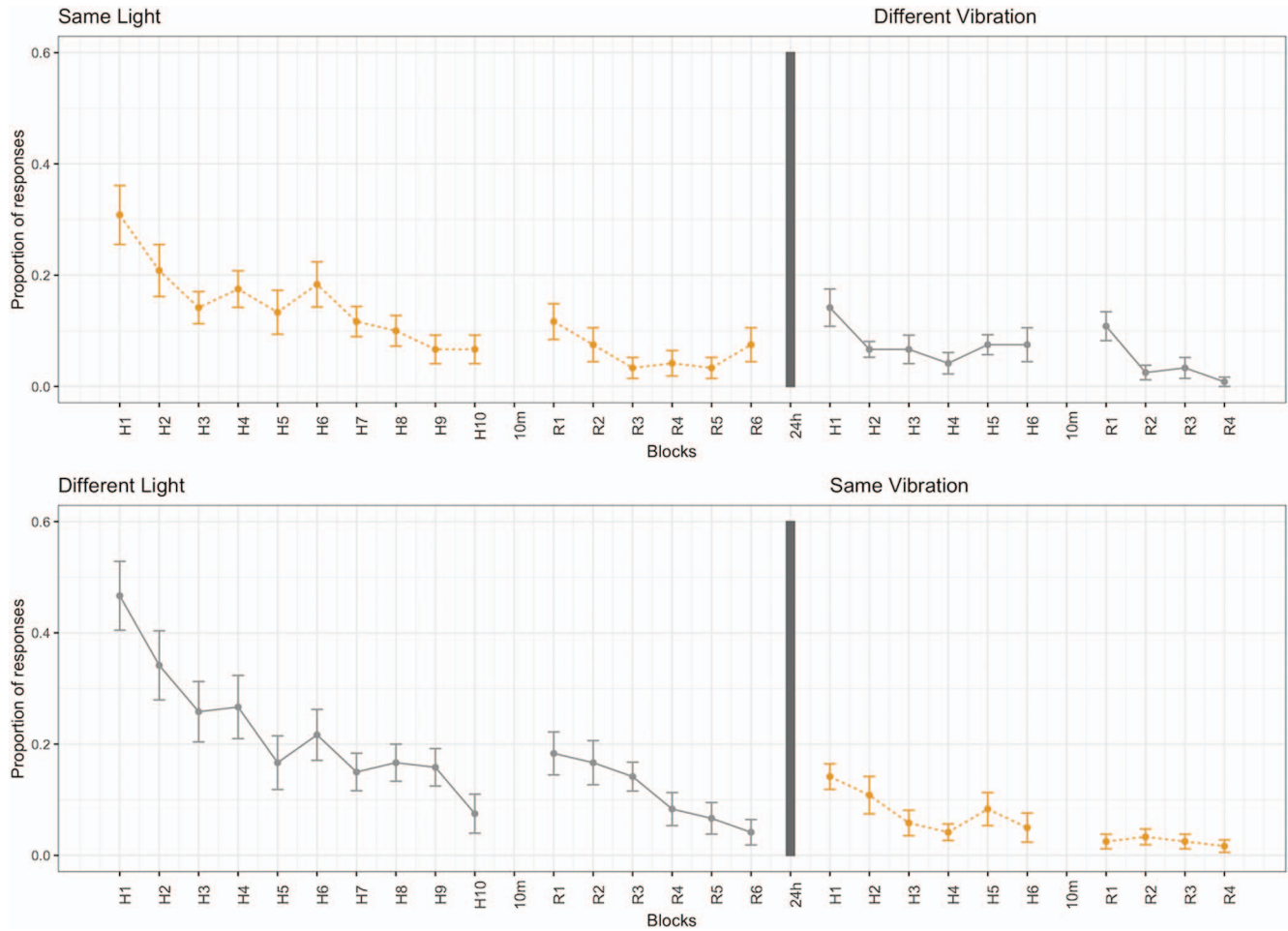
The lower part of Figure 3 displays the results for the DL and SV scenarios. The results indicate that the slope for DL habituation (standardized coefficient =  $-.51$ ,  $t = -6.37$ ,  $p < .01$ ); the slope of DL rehabilitation (standardized coefficient =  $-.44$ ,  $t = -4.15$ ,  $p < .01$ ), and the slope for SV habituation (standardized coefficient =  $-.29$ ,  $t = -2.54$ ,  $p < .01$ ) were significant. However, the slope for SV rehabilitation (standardized coefficient =  $-.08$ ) was not significant ( $t < 1$ ).

These analyses revealed that during the habituation phase a significant decrease in the proportion of retraction responses was observed in all the scenarios except for DV. The low level of responding to the vibration, and the limited number of subjects used in this design could explain this result. In fact, a Wilcoxon’s test comparing the mean proportion of responses during habituation to the light (0.188) and vibration (0.079) showed that there were significant differences between them ( $Z = 2.57$ ;  $p > .05$ ). The most striking results, however, can be observed in the rehabilitation phase. During rehabilitation, there was a significant decrease in responding in the different scenarios (DV and DL) but not in the same scenarios (SL and SV). When there was no context change during the rehabilitation phase (same scenarios, SL and SV), subjects continued to maintain the same level of responding as that shown at the end of the habituation phase (which is likely to be a consequence of having reached an asymptotic level of responding). However, the change of context in the different scenarios (DV and DL) favored the recovery of responding during rehabilitation training. This pattern of responding appears to indicate a contextual specificity effect.

Figure 4 shows the data and results collapsed for each stimulus (light, left panel and vibration, right panel), due to the different number of presentations that the subjects received during training (for further details, see the Procedure section). To display the data for the light and the vibration separately, we calculated the mean number of responses made to the light throughout the habituation phase (same training and different training, see Table 1), and then we calculated the mean responses made during rehabilitation for both the same training (i.e., rehabilitation in same context) and the different training (i.e., rehabilitation in different context); see Figure 4, left panel.

We conducted nonparametric Wilcoxon’s tests to compare the mean responses across conditions. For the light, the results of these analyses revealed a significant difference in responding between the habituation and rehabilitation phases when conducted in the same context ( $Z = 2.90$ ,  $p < .01$ ), but not when the phases were conducted in different contexts ( $Z = 1.92$ ,  $p = .06$ ). Once habituation had occurred, rehabilitation in the different context brought about a recovery of responding, which increased to levels that were similar to those observed in the habituation training, whereas in the same context, the subjects showed a lower level of responding than that observed during habituation training.

We repeated this procedure for the data obtained on the vibration trials. Thus, we calculated the mean number of responses made to the vibration during the habituation phase (same training and different training), and then we calculated the mean responses made during rehabilitation for both the same training and the different training (see Figure 4, right panel). Wilcoxon’s tests revealed significant differences in responding between the habit-



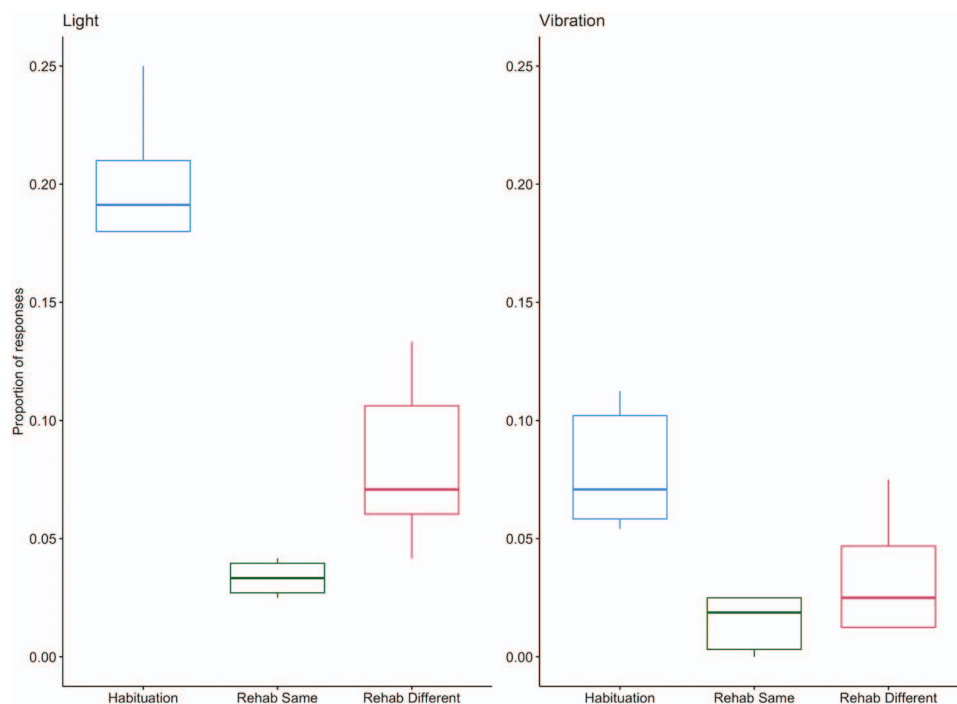
*Figure 3.* Experiment 2. Proportion of responses for groups (different and same) across 10-trial blocks throughout habituation (H) and rehabilitation (R) as a function of stimulus and training. Light and vibration refers to the exposed stimulus, and same (yellow dashed lines) and different (gray solid lines) refers to the training conditions (*same* means that both habituation and rehabilitation were conducted in Context A; *different* means that habituation was run in Context B, whereas rehabilitation was run in context C). Both stimulus and training order were counterbalanced. See the online article for the color version of this figure.

uation and rehabilitation phases in the same context ( $Z = 2.91, p < .01$ ), with this difference also being significant when these phases were conducted in different contexts ( $Z = 2.24, p < .01$ ). In this case, the mean number of responses in both same and different contexts were lower than those observed during habituation training.

Finally, *Figure 5* shows the HRI (similar to those of Experiment 1) to analyze the sensitivity of earthworms to the contextual specificity of habituation for each stimulus (light and vibration) as a function of training condition (same vs. different). In the SL DV scenario, subjects were habituated and then rehabilitated to the light in the same context and to the vibration in different contexts; in the DL SV scenario, the subjects were habituated and rehabilitated to the light in different contexts and to the vibration in the same context. To study the effect of condition and training order (same training first or different training first) on HRI, we conducted a mixed-effects ANOVA on the HRI data with condition and order as variables. Random intercepts were included for sub-

jects. As in Experiment 1, the analyses were conducted in R (R Core Team, 2019) using the `lmer()` function of the `lme4` package (Bates et al., 2014). The obtained residuals showed nonrelevant departures from normality (Normal Q-Q plot not reported). We found a significant effect of context,  $F(1, 33) = 4.30, p < .05$ ; specifically, HRI was significantly lower for rehabilitation in the same context ( $M = .18, SD = .23$ ) when compared with the different context ( $M = .31, SD = .12$ ). No significant effect was found for order,  $F(1, 33) = 3.95, p = .06$ , or for the interaction Order  $\times$  Context,  $F(1, 33) < 1$ . These results can be taken to indicate a context specificity effect, because the recovery rate shown by subjects to the stimulus rehabilitated in the different context is higher than that shown to the stimulus rehabilitated in the same context.

Taken together, these results appear to replicate and extend the results found in Experiment 1, that is, we have demonstrated context specificity of habituation, using a within-subjects design. *Figure 3* shows the recovery of responding during the rehabilita-



**Figure 4.** Experiment 2. Mean proportion of responses for habituation, rehab same, and rehab different for each stimulus (light, left panel and vibration, right panel). *Habituation* plots the mean habituation response to each stimulus, *rehab same* plots the mean habituation response for the conditions with the same contexts, and *rehab different* plots the mean habituation response for the conditions with the different contexts. See the online article for the color version of this figure.

tion training in the different scenarios (DV and DL) but not in the same scenarios (SL and DL) as a significant slope in the rehabilitation curves brought about by the change of context. When the data are analyzed independently for each stimulus (see Figure 4) the effect of contextual specificity seems to be different depending on the stimulus trained. When the light was rehabilitated in the same context, the mean number of responses differed from the mean number of habituation responses, whereas when the light was rehabilitated in the different context, responding did not differ from that shown during habituation. This result confirms that responding recovers with the change of context, that is, a contextual specificity effect. However, although responding to the vibration stimulus showed a similar pattern to that of the light, responding during rehabilitation differed from the habituation phase in both the different and the same contexts, thus suggesting a lack of contextual specificity of habituation to the vibration stimulus. However, this conclusion must be treated with caution. Figure 4 also shows that, in general, responding to the vibration was lower than that shown to the light. In fact, the mean proportion of responses during habituation differed significantly between the light and the vibration (see above). We can rule out the possibility that this lower response rate is a consequence of the effect of generalization between the light and vibration, because the order of stimulus presentation was counterbalanced. However, this very low level of responding, and the limited number of subjects used, could have produced a floor effect that hinders the detection of potential differences in responding between the same and different rehabilitation conditions when using the vibration stimulus. It

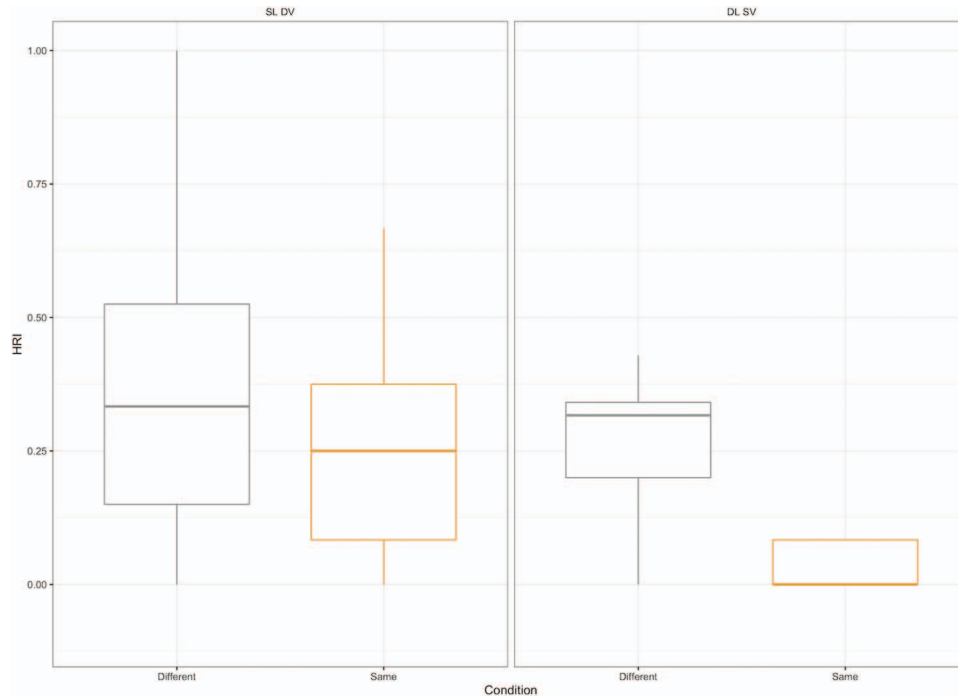
would perhaps be more reasonable to attribute these results to the limitations of our particular design than to a real lack of contextual specificity.

Further, the HRI analysis (see Figure 5) revealed that subjects were able to discriminate between the stimulus that was rehabilitated in the same context and the one rehabilitated in a different context. This is due to the fact that when the stimuli were rehabilitated, their rate of recovery was higher when this phase was conducted in the different context compared with the same context. These results support the generality of the contextual specificity effect and provide evidence that earthworms are capable of learning about “complex” situations in which different stimuli are subjected to opposing contingencies.

The question still remains with regard to the precise mechanism responsible for this contextual specificity effect. Following the SOP model, this could be explained in terms of “retrieval-generated priming,” via an association between the context (CS) and the stimulus (US). However, to confirm the associative basis of these findings, further research is required to evaluate the associative status of the context through context extinction and preexposure tests.

## General Discussion

Overall, the results of the two experiments appear to demonstrate the context specificity of habituation in earthworms, extending the results found with other invertebrates (Rankin, 2000; Tomsic et al., 1998). Experiment 1 showed the effects of changing



**Figure 5.** Experiment 2. Habituation recovery index (HRI) for each stimulus (light [L] and vibration [V]) as a function of the training condition (same [S] vs. different [D]) in the diverset scenarios (SL DV and DL SV). In the SL DV scenario, subjects were habituated and rehabilitated to the light in the same context and to the vibration in different contexts; in the DL SV scenario subjects were habituated and rehabilitated to the light in different contexts and to the vibration in the same context. See the online article for the color version of this figure.

the context following habituation training with a light stimulus. When the subjects were rehabilitated in a different context, a recovery of the retraction response is observed in comparison with the responses shown by the subjects rehabilitated in the same context. In Experiment 2, two stimuli were used—light and vibration—in order to replicate and extend the results found in Experiment 1. Following habituation training to both the light and vibration, the subjects were rehabilitated to one of the stimuli in the same context and to the other one in the different context. In the case of the light, an effect of changing the context was found, replicating the results obtained in Experiment 1, and extending the generality of this finding to a new stimulus, that is, vibration. However, the contextual specificity effect found with the vibration stimulus seemed to be less robust than that found when using the light. When the vibration was used in rehabilitation, habituation transferred to both the same and different contexts. We have hypothesized that this difference could be attributed to a floor effect produced by the generally low level of retraction responses elicited by this stimulus. In fact, earthworms were indeed capable of learning about a complex habituation situation, distinguishing between two stimuli that were presented in a same or different context.

The results of these experiments thus provide evidence of the contextual specificity of habituation in earthworms. These findings are similar to those obtained with the nematode *C. elegans* (Rankin, 2000) and with the crab *Chasmagnatus* (Tomsic et al., 1998), showing the ubiquity of this phenomenon across phylogeny

(nematodes, crabs and earthworms belong to completely different ecological niches). Associative models (Wagner, 1976, 1981) propose that the contextual specificity effect depends on the formation of an explicit association between the context where the stimulus is presented (CS) and the stimulus itself (US). This association can be disrupted via exposure to the context alone after habituation (extinction) or via exposure to the context before habituation (latent inhibition). Both extinction and latent inhibition should lead to the recovery of the response in a subsequent habituation training phase. The associative nature of long-term habituation has been confirmed in *C. elegans* (Rankin, 2000) and in the crab *Chasmagnatus* (Tomsic et al., 1998), by showing evidence of the formation of a context-US association. Further, Rankin (2000; Lau, Timbers, Mahmoud, & Rankin, 2013) also observed context conditioning in a short-term habituation procedure. With reference to our results, in the discussion of Experiment 1, we have ruled out nonassociative explanations of this contextual specificity in terms of an arousal effect, spontaneous recovery, or dishabituation produced by the change of the context. However, further research is needed to evaluate the effects of extinction and latent inhibition on the contextual specificity of habituation that was found in these experiments.

As mentioned above, our observation of a difference between the strength of the contextual specificity of habituation to a light and a vibration might be regarded as somewhat inelegant. We have offered an explanation of this result in terms of the particular parameters used in our experiments, and this is the most parsimo-

nious explanation. However, this also prompted us to consider some further issues relating to the characteristics of stimulus. It is possible that different stimuli require rather different temporal parameters for developing contextual specificity. A number of different experimental protocols have been used to produce long lasting memories for habituation (long-term habituation) in various species (e.g., for nematodes and crabs mentioned above). It appears that in the case of earthworms, the parameters used in Experiment 2 facilitated the observation of contextual specificity of habituation when the light was the target stimulus, but not when the stimulus was a vibration. Because we wanted to avoid the effect of overhabituation (Rankin et al., 2009), the parameters used in both experiments were selected according to those used in previous experiments run in our laboratory showing an asymptotic level of habituation.

Another factor to be considered is related to the biological significance of the stimulus to which subjects are exposed. For example, Evans and Hammonds (1983) observed a differential generalization of habituation to squeals across contexts in hooded Long-Evans rats. They measured the orienting response with a lick suppression method. As stimuli, they used distress squeals recorded from a young adult male being given an intraperitoneal injection, and mimic squeals that were artificially produced. Following a phase of habituation in the experimental boxes, they were tested in either the same context, a familiar context, or a novel context. The data revealed that the orienting response to the distress squeal increased more rapidly with a contextual change than the response to the mimic squeal. They concluded that the contextual specificity of habituation depends on the nature of the stimulus used. In line with this idea, recent experiments have shown that some invertebrates are sensitive to the significance of certain stimuli. For example, Dehaut, Nguyen, Vadlamudi, and Blumstein (2019) studied the transfer of habituation between different stimuli in giant clams. They gave the clams exposure to various threat stimuli (shading events of varying size, shell tapping, and mantle touching) that caused the clams to retract their mantle and close their shell. Habituation was measured by registering the time that the clams took to return to their initial relaxed state (latency to emerge [LTE]). By comparing the LTE between the different shading events, Dehaut et al. (2019) found a gradient in the habituation of stimuli, with clams habituating more quickly to less harmful stimuli (i.e., smaller shading events). Moreover, they found that habituation did not transfer between the shading, shell tapping, and mantle touching stimuli. Given these findings, it remains possible that stimulus significance could have played a role generating the results of Experiment 2. Although both light and vibration are dangerous stimuli—with light being capable of causing death by desiccation—not all lights are dangerous. In fact, earthworms are attracted to dim illumination (Laverack, 1963). Vibrations, however, signal the presence of predators (i.e., moles and others such as herring gulls or wood turtles, which vibrate the ground in order to capture emerging earthworms; see Catania, 2008). These facts suggest that, depending on the characteristics of the target stimuli (in our case lights and vibrations), there could be variations in the extent to which learning about such stimuli is context specific. However, this suggestion is merely speculative and requires further investigation.

Undoubtedly, taken together, the results of these experiments demonstrate the contextual specificity of habituation in earth-

worms, extending the results found with other species and revealing that habituation is not just mechanistically complex (McDiarmid et al., 2019). These experiments show that earthworms are capable of learning about a complex habituation scenario. Subjects play an active role in learning and, to fully understand the plasticity of habituation and its adaptive value, these molecular studies must be complemented with investigations of a molar nature in order to characterize the behavior of habituation in multiple species and with different stimuli and contexts. Further, the study of habituation and its mechanisms also opens up questions regarding the foundations of associative learning in phylogeny (Ginsburg & Jablonka, 2010). A full behavioral characterization of the various learning phenomena is essential to achieve a complete understanding of such phenomena and their adaptive value (Gomez-Marin & Mainen, 2016; Menzel et al., 1984).

## References

- Ardiel, E. L., McDiarmid, T. A., Timbers, T. A., Lee, K. C., Safaei, J., Pelech, S. L., & Rankin, C. H. (2018). Insights into the roles of CMK-1 and OGT-1 in interstimulus interval-dependent habituation in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the Royal Society B*, *285*, 2018–2084.
- Ardiel, E. L., & Rankin, C. H. (2010). An elegant mind: Learning and memory in *Caenorhabditis elegans*. *Learning & Memory*, *17*, 191–201. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.960510>
- Baglan, H., Lazzari, C., & Guerrieri, F. (2017). Learning in mosquito larvae (*Aedes aegypti*): Habituation to a visual danger signal. *Journal of Insect Physiology*, *98*, 160–166. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinphys.2017.01.001>
- Balderrama, N., & Maldonado, H. (1971). Habituation of the deimatic response in the mantid (*Stagmatoptera biocellata*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *75*, 98–106. <http://dx.doi.org/10.1037/h0030685>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2014). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, *67*, 48. <http://dx.doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Beck, C. D., & Rankin, C. H. (1997). Long-term habituation is produced by distributed training at long ISIs and not by massed training or short ISIs in *Caenorhabditis elegans*. *Animal Learning & Behavior*, *25*, 446–457. <http://dx.doi.org/10.3758/BF03209851>
- Bolivar, V. J. (2009). Intrasession and intersession habituation in mice: From inbred strain variability to linkage analysis. *Neurobiology of Learning and Memory*, *92*, 206–214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2009.02.002>
- Bradley, M. M., Lang, P. J., & Cuthbert, B. N. (1993). Emotion, novelty, and the startle reflex: Habituation in humans. *Behavioral Neuroscience*, *107*, 970–980. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.107.6.970>
- Byrne, J. H., Antzoulatos, E. G., & Fioravante, D. (2009). Learning and memory in invertebrates: Aplysia. In L. R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of neuroscience* (Vol. 5, pp. 405–412). New York, NY: Academic Press.
- Catania, K. C. (2008). Worm grunting, fiddling, and charming—humans unknowingly mimic a predator to harvest bait. *PLoS ONE*, *3*(10), e3472. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003472>
- Chianchetti, C., & Turatto, M. (2017). Context-specific habituation of the freezing response in newborn chicks. *Behavioral Neuroscience*, *131*, 437–446. <http://dx.doi.org/10.1037/bne0000212>
- Darwin, C. (1881). *The formation of vegetable mould through the action of worms, with observations on their habits*. London, U.K.: John Murray. <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.107559>
- Dehaut, B., Nguyen, M., Vadlamudi, A., & Blumstein, D. T. (2019). Giant clams discriminate threats along a risk gradient and display

- varying habituation rates to different stimuli. *Ethology*, 125, 392–398. <http://dx.doi.org/10.1111/eth.12863>
- Evans, J. G. M., & Hammond, G. R. (1983). Differential generalization of habituation across contexts as a function of stimulus significance. *Animal Learning & Behavior*, 11, 431–434. <http://dx.doi.org/10.3758/BF03199798>
- Ezzeddine, Y., & Glanzman, D. L. (2003). Prolonged habituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia* depends on protein synthesis, protein phosphatase activity, and postsynaptic glutamate receptors. *The Journal of Neuroscience*, 23, 9585–9594. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-29-09585.2003>
- Gagliano, M., Renton, M., Depczynski, M., & Mancuso, S. (2014). Experience teaches plants to learn faster and forget slower in environments where it matters. *Oecologia*, 175, 63–72. <http://dx.doi.org/10.1007/s00442-013-2873-7>
- Gardner, L. E. (1968). Retention and overhabituation of a dual-component response in *Lumbricus terrestris*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 66, 315–318. <http://dx.doi.org/10.1037/h0026357>
- Gilpin, A. R., & Ratner, S. C. (1978). Intermodal stimulus generalization and retention of habituation in earthworms. *Psychological Reports*, 42, 683–690. <http://dx.doi.org/10.2466/pr0.1978.42.3.683>
- Ginsburg, S., & Jablonka, E. (2010). The evolution of associative learning: A factor in the Cambrian explosion. *Journal of Theoretical Biology*, 266, 11–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.06.017>
- Glanville, B. B., Gilpin, A. R., & Ratner, S. C. (1979). Effects of interpolated stimulation on retention of habituation in the earthworm. *Journal of General Psychology*, 100, 287–294. <http://dx.doi.org/10.1080/00221309.1979.9710960>
- Glanzman, D. L. (2009). Habituation in *Aplysia*: The Cheshire cat of neurobiology. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 147–154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2009.03.005>
- Gomez-Marin, A., & Mainen, Z. F. (2016). Expanding perspectives on cognition in humans, animals, and machines. *Current Opinion in Neurobiology*, 37, 85–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2016.01.011>
- Groves, P. M., & Thompson, R. F. (1970). Habituation: A dual-process theory. *Psychological Review*, 77, 419–450. <http://dx.doi.org/10.1037/h0029810>
- Gumedze, F. N., & Dunne, T. T. (2011). Parameter estimation and inference in the linear mixed model. *Linear Algebra and Its Applications*, 435, 1920–1944. <http://dx.doi.org/10.1016/j.laa.2011.04.015>
- Hall, G. (1991). *Perceptual and associative learning*. Oxford, U.K.: Clarendon Press. <http://dx.doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198521822.003.0002>
- Harris, J. D. (1943). Habitatory response decrement in the intact organism. *Psychological Bulletin*, 40, 385–422. <http://dx.doi.org/10.1037/h0053918>
- Jeffrey, W. E., & Cohen, L. S. (1971). Habituation in the human infant. *Advances in Child Development and Behavior*, 6(C), 63–97. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2407\(08\)60081-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2407(08)60081-6)
- Jennings, H. S. (1906). *Behaviour of the lower organisms*. New York, NY: Columbia University Press; <http://dx.doi.org/10.1037/10817-000>
- Jordan, W. P., Strasser, H. C., & McHale, L. (2000). Contextual control of long-term habituation in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 26, 323–339. <http://dx.doi.org/10.1037/0097-7403.26.3.323>
- Lau, H. L., Timbers, T. A., Mahmoud, R., & Rankin, C. H. (2013). Genetic dissection of memory for associative and non-associative learning in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Brain & Behavior*, 12, 210–223. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00863.x>
- Laverack, M. S. (1963). *The physiology of earthworms*. Oxford, U.K.: Pergamon Press.
- Lenth, R., Singmann, H., Love, J., Buerkner, P., & Herve, M. (2018). Package “emmeans” R topics documented. *The American Statistician*, 34, 216–221. <http://dx.doi.org/10.1080/00031305.1980.10483031>
- Luke, S. G. (2017). Evaluating significance in linear mixed-effects models in R. *Behavior Research Methods*, 49, 1494–1502. <http://dx.doi.org/10.3758/s13428-016-0809-y>
- Mackintosh, N. J. (1987). Neurobiology, psychology and habituation. *Behaviour Research and Therapy*, 25, 81–97. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-7967\(87\)90079-9](http://dx.doi.org/10.1016/0005-7967(87)90079-9)
- Maldonado, H., Romano, A., & Tomic, D. (1997). Long-term habituation (LTH) in the crab *Chasmagnathus*: A model for behavioral and mechanistic studies of memory. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 813–826. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1997000700001>
- McDiarmid, T. A., Yu, A. J., & Rankin, C. H. (2019). Habituation is more than learning to ignore: Multiple mechanisms serve to facilitate shifts in behavioral strategy. *BioEssays*, 41(9), e1900077. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201900077>
- Menzel, R., Bicker, G., Carew, T. J., Fischbach, K. F., Gould, J. L., Heinrich, B., . . . Wagner, A. R. (1984). Biology of invertebrate learning, group report. In P. Marler & H. S. Terrace (Eds.), *The biology of learning* (pp 249–270). Berlin, Germany: Springer-Verlag. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-70094-1>
- Morgan, R. F., Ratner, S. C., & Denny, M. R. (1965). Response of earthworms to light as measured by the GSR. *Psychonomic Science*, 3, 27–28. <http://dx.doi.org/10.3758/BF03343000>
- Paredes-Olay, C., Abad, M. J., Membrive-Galera, J. A., & Reyes-Jiménez, D. (2019, September). *Habituation learning as a tool to study the reactivity of earthworms to environmental stimuli*. Paper presented at the XXXI International Meeting of the Spanish Society for Comparative Psychology, Málaga, Spain.
- Peeke, H. V. S., Herz, M. J., & Wyers, E. J. (1965). Amount of training, intermittent reinforcement and resistance to extinction of the conditioned withdrawal response in the earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Animal Behaviour*, 13, 566–570. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-3472\(65\)90121-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-3472(65)90121-1)
- Peeke, H. V. S., Herz, M. J., & Wyers, E. J. (1967). Forward conditioning, backward conditioning, and pseudoconditioning sensitization in the earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 64, 534–536. <http://dx.doi.org/10.1037/h0025213>
- Perry, C. J., Barron, A. B., & Cheng, K. (2013). Invertebrate learning and cognition: Relating phenomena to neural substrate. *WIREs: Cognitive Science*, 4, 561–582. <http://dx.doi.org/10.1002/wcs.1248>
- Pinsker, H., Kupfermann, I., Castellucci, V., & Kandel, E. (1970). Habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, 167, 1740–1742. <http://dx.doi.org/10.1126/science.167.3926.1740>
- Pinto, J. A., Becerra, S. A., Ponce, F. P., & Vogel, E. H. (2014). Differential context-specificity in the habituation of the eyeblink and cardiac responses in humans. *Universitas Psychologica*, 13, 1245–1254.
- Prosser, C. L., & Hunter, W. S. (1936). The extinction of startle responses and spinal reflexes in the white rat. *American Journal of Physiology*, 117, 609–618. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplegacy.1936.117.4.609>
- Randlett, O., Haesemeyer, M., Forkin, G., Shoenhard, H., Schier, A. F., Engert, F., & Granato, M. (2019). Distributed plasticity drives visual habituation learning in larval zebrafish. *Current Biology*, 29, 1337–1345. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.039>
- Rankin, C. H. (2000). Context conditioning in habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Behavioral Neuroscience*, 114, 496–505. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.114.3.496>
- Rankin, C. H., Abrams, T., Barry, R. J., Bhatnagar, S., Clayton, D. F., Colombo, J., . . . Thompson, R. F. (2009). Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 135–138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>
- Rankin, C. H., & Broster, B. S. (1992). Factors affecting habituation and recovery from habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

- Behavioral Neuroscience*, 106, 239–249. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.106.2.239>
- Ratner, S. C., & Gardner, L. E. (1968). Variables affecting responses of earthworms to light. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 66, 339–343. <http://dx.doi.org/10.1037/h0025973>
- Ratner, S. C., & Gilpin, A. R. (1974). Habituation and retention of habituation of responses to air puff of normal and decerebrate earthworms. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 86, 911–918. <http://dx.doi.org/10.1037/h0036396>
- Ratner, S. C., & Miller, K. R. (1959). Classical conditioning in earthworms, *Lumbricus terrestris*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 52, 102–105. <http://dx.doi.org/10.1037/h0042412>
- Ratner, S. C., & Stein, D. G. (1965). Responses of worms to light as a function of intertrial interval and ganglion removal. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 59, 301–305. <http://dx.doi.org/10.1037/h0021814>
- R Core Team. (2019). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.R-project.org/>
- Roberts, D. (2014). Rapid habituation by mosquito larvae to predator kairomones. *Journal of Vector Ecology*, 39, 355–360. <http://dx.doi.org/10.1111/jvec.12111>
- Rose, J. K., & Rankin, C. H. (2001). Analyses of habituation in *Caenorhabditis elegans*. *Learning & Memory*, 8, 63–69. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.37801>
- Sanyal, S., Wintle, R. F., Kindt, K. S., Nuttley, W. M., Arvan, R., Fitzmaurice, P., . . . Van Tol, H. H. (2004). Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal*, 23, 473–482. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600057>
- Sokolov, E. N. (1963). Higher nervous functions; the orienting reflex. *Annual Review of Physiology*, 25, 545–580. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ph.25.030163.002553>
- Thompson, R. F. (2009). Habituation: A history. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 127–134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.011>
- Thompson, R. F., & Spencer, W. A. (1966). Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological Review*, 73, 16–43. <http://dx.doi.org/10.1037/h0022681>
- Tomsic, D., de Astrada, M. B., Sztarker, J., & Maldonado, H. (2009). Behavioral and neuronal attributes of short- and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 176–182. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2009.01.004>
- Tomsic, D., Pedreira, M. E., Romano, A., Hermitte, G., & Maldonado, H. (1998). Context–U.S. association as a determinant of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Animal Learning & Behavior*, 26, 196–209. <http://dx.doi.org/10.3758/BF03199212>
- Uribe-Bahamonde, Y. E., Becerra, S. A., Ponce, F. P., & Vogel, E. H. (2019). A quantitative account of the behavioral characteristics of habituation: The sometimes opponent processes model of stimulus processing. *Frontiers in Psychology*, 10, 504. <http://dx.doi.org/10.3389/fpsyg.2019.00504>
- Vogel, E. H., Ponce, F. P., & Wagner, A. R. (2019). The development and present status of the SOP model of associative learning. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 72, 346–374. <http://dx.doi.org/10.1177/1747021818777074>
- Wagner, A. R. (1976). Priming in STM: An information-processing mechanism for self-generated or retrieval-generated depression in performance. In Th. J. Tighe & R. N. Leaton (Eds.), *Habituation: Perspectives from child development, animal behavior, and neurophysiology* (pp. 95–128). Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates.
- Wagner, A. R. (1981). SOP: A model of automatic memory processing in animal behavior. *Information Processing in Animals: Memory Mechanisms*, 1981, 5–47.
- Wagner, A. R., & Brandon, S. E. (1989). Evolution of a structured connectionist model of Pavlovian conditioning (AESOP). In S. B. Klein & R. R. Mowrer (Eds.), *Contemporary learning theories: Pavlovian conditioning and the status of traditional learning theory* (pp. 149–189). New York, NY: Lawrence Erlbaum Associates.
- Wagner, A., & Vogel, E. (2010). Associative modulation of U.S. processing: Implications for understanding of habituation. In N. Schmajuk (Ed.), *Computational models of conditioning* (pp. 150–185). Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.
- Whitlow, J. W., Jr., & Wagner, A. R. (1984). Memory and habituation. In H. V. S. Peeke & L. Petrinovich (Eds.), *Habituation, sensitization, and behavior* (pp. 103–153). New York: Academic Press. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-549860-9.50010-9>
- Wyers, E. J., Peeke, H. V. S., & Herz, M. J. (1973). Behavioral habituation in invertebrates. In H. V. S. Peeke & M. J. Herz (Eds.), *Habituation: Vol. 1. Behavioral studies* (pp. 1–58). New York, NY: Academic Press.

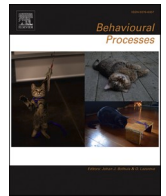
Received October 30, 2019

Revision received April 11, 2020

Accepted April 20, 2020 ■

**Experimental Study II: Effects of pre-exposure and post-exposure of the context in habituation of the retraction response in earthworms (*Lumbricidae*).**

Reyes-Jiménez, D., Iglesias-Parro, S., Abad, M.J. & Paredes-Olay, C. (2020). Effects of pre-exposure and post-exposure of the context in habituation of the retraction response in earthworms (*Lumbricidae*). *Behavioural Processes*, 193. 104527.  
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2021.104527>



# Effects of pre-exposure and post-exposure of the context in habituation of the retraction response in earthworms (*Lumbricidae*)

David Reyes-Jiménez, Sergio Iglesias-Parro, María J.F. Abad, Concepción Paredes-Olay\*

Department of Psychology, Universidad de Jaén, Paraje las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Context  
Earthworm  
Extinction  
Habituation  
Latent inhibition

## ABSTRACT

The context specificity of habituation has been demonstrated in earthworms. After the habituation of the retraction response to a light, a recovery of the response was observed when subjects are re-habituated in a different context. Some theories assume that an association between the context and the unconditioned stimulus could underlie this result. A series of experiments were conducted in order to test this issue. We assessed the potential disruptive effects of post-exposure (extinction effect) and pre-exposure of the context (latent inhibition effect) on the establishment of a context-US association. A recovery of response during subsequent rehabilitation test was expected. The results of Experiment 1 showed that the extinction was effective, the post-exposure of the context after habituation produced a recovery of the retraction response. This result was replicated in Experiment 2 where the post-exposure condition was compared with a pre-exposure one. However, the pre-exposure to the context did not result in a recovery of the response in the rehabilitation test, but also produced a general decrement on the response during the habituation training, that it has been interpreted as decrement in context's salience. In summary, these results suggest the involvement of associative and nonassociative processes in habituation learning.

## 1. Introduction

Habituation, the decrement in response observed when a stimulus is repeatedly presented, constitutes one of the most basic process of learning and it is ubiquitous throughout the Protista kingdom (Jennings, 1906), and the animal kingdom: from invertebrates (Baglan et al., 2017; Pinsky et al., 1970; Wyers et al., 1973) to all major vertebrate groups including humans (Bradley et al., 1993; Jeffrey and Cohen, 1971). In addition, plants might show habituation processes (Gagliano et al., 2014; but see also Abramson and Chicas-Mosier, 2016; Adelman, 2018). Habituation is of fundamental adaptive value because it minimizes wasted energy and conserves cognitive resources to attend to stimuli that are truly meaningful, increasing the chances of survival and reproduction.

The behavioral characteristics of habituation were described by Thompson and colleagues (Groves and Thompson, 1970; Thompson and Spencer, 1966; Thompson, 2009). These authors present a list of nine behavioral characteristics of habituation that were presented in all organisms studied. In a more recent article, Rankin et al. (2009, see also

McDiarmid et al., 2019) reviewed these characteristics, and explicitly included an additional feature, the distinction between short-term and long-term habituation. With regard to duration, we can distinguish between two forms of habituation, *short-term habituation* or *within-session habituation*, that may last from a few seconds to minutes and hours, and *long-term habituation* or *between-session habituation*, that may last for hours, days, and weeks. Both of these are dependent on the inter stimulus interval (ISIs) employed. Long-term habituation requires longer ISIs and more spaced training sessions than short-term habituation. This characteristic is particularly representative of the complexity of habituation (although it is usually defined as the "simplest form of learning"). In fact, it is well known (Kindt et al., 2007; McDiarmid et al., 2019; Sanyal et al., 2004) that the cellular and molecular mechanisms differ between short-term and long-term habituation, and these have been described in some species of invertebrates such as the sea slug *Aplysia* (Bailey and Chen, 1983, 1988; Kandel, 1976); the crab *Chasmagnathus* (Tomsic et al., 2009) or the nematode *Caenorhabditis elegans* (Lau et al., 2013). Moreover, there is evidence to suggest that habituation of different behaviors can be mediated by distinct mechanisms (Best et al.,

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [dreyes@ujaen.es](mailto:dreyes@ujaen.es) (D. Reyes-Jiménez), [siglesia@ujaen.es](mailto:siglesia@ujaen.es) (S. Iglesias-Parro), [mjabad@ujaen.es](mailto:mjabad@ujaen.es) (M.J.F. Abad), [cparedes@ujaen.es](mailto:cparedes@ujaen.es) (C. Paredes-Olay).

<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2021.104527>

Received 16 April 2021; Received in revised form 8 September 2021; Accepted 28 September 2021

Available online 1 October 2021

0376-6357/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

2005; Engel and Wu, 2009, McDiarmid et al., 2019; Ramaswami, 2014; Schmid et al. 2010; (Schmid et al., 2015); Yu and Rankin, 2017) and also that different mechanisms may be involved in the same response, what would serve to streamline adaptive shifts in behavioral strategy.

Several theories have been proposed to explain the precise mechanism underlying habituation (Groves and Thompson, 1970; Hall and Rodríguez, 2020; Konorski, 1967; Sokolov, 1963; Wagner, 1976, 1981). The classical Dual-Process Theory (Groves and Thompson, 1970) assumes that the response to repeated stimulation is the result of the interaction of two processes, one incremental (sensitization) and the other one, decremental (habituation) which depends on a different pathway (state system and S-R pathway, respectively). This theory leads to a number of experimental predictions about these processes, but does not specify the mechanism responsible for habituation. On the other hand, Sokolov's Stimulus-Model Comparator theory of habituation (Sokolov, 1960, 1963), based primarily in the observation of the orienting response, assumes that the repeated presentation of a stimulus leads to the formation of a stimulus model. When the stimulus matches this model, it will become ineffective. Finally, Wagner-Konorski theory (see Konorski, 1967; Wagner, 1976, 1979) also proposed that the central representation of a stimulus is less sensitive to the occurrence of that stimulus, when it has recently been activated (or primed).

The Sometimes Opponent Process (SOP) model (Vogel et al., 2019; Wagner, 1981; the extended version of the SOP model [AESOP], Wagner et al., 1989; (Whitlow and Wagner, 1984); see also, Uribe-Bahamonde et al., 2019, a quantitative analysis of the model)) specifies the mechanisms by which the stimulus can be primed. This model states that the representation of any stimulus comprises a large set of elements that can be in different states of activity. The presentation of a novel stimulus drives its elements from an inactive state (I) to a primary activity state (A1) that evokes an unconditioned response (UR). In fact, only stimuli in the A1 state are fully effective in evoking an unconditioned response. Once in the A1 state, after the offset of the stimulus, the elements decay, first to the A2 state, and then back to the inactive state. The transition from A1 to A2 state explains short-term habituation. When the ISI is short, some of the elements of the stimulus will be in the A2 state when the stimulus is presented again after a short time interval. Because they are not in the inactive state, these elements would not be eligible for reactivation in the case the stimulus was presented again during this period. Accordingly, the stimulus will become less effective in provoking an A1 state (self-generated priming). In the case of long-term habituation, the model assumes that when a stimulus is continuously presented in a given context, an association is formed between the context and the unconditioned stimulus (retrieval/associatively-generated priming). The context becomes a conditioned stimulus (CS) that will restore the stimulus to the A2 state. Consequently, the number of elements available in the A1 state will be scarce, so little, or no responding will be evoked. Wagner and his collaborators (Wagner, 1976) presented convincing evidence that this association can be disrupted through an extinction procedure. Following habituation training, additional presentations of the contextual cues alone reinstated the response to the eliciting stimulus compared to a control group in which the context retained its predictive value.

Notwithstanding, Hall and Rodríguez (2020; see also Hall and Rodríguez, 2017, 2019) offered an alternative explanation to Wagner's account of habituation that focused in changes in the effective salience of the stimulus habituated. The authors state that the experience with a stimulus will change not only associability ( $\alpha$ ) but also its salience (S). When the stimulus is presented followed by no consequences, the effective salience of the stimulus is reduced by means of a learning process akin to extinction. The stimulus presented repeatedly should come to activate an expectation of "no event" that will inhibit that expectation for "event", what results in a change in associability ( $\alpha$ ) determined by the discrepancy between the expectation for the event and the fact that it will not occur. Then, habituation would be produced because the response that is evoked by the activation of the event

representation will no longer occur, as that representation will be rendered inactive. Moreover, their proposal assumes that any stimulus, even a neutral one, would evoke the expectation of some consequence and their own characteristics URs. Repeated presentation of the stimulus will result in the elimination of this expectation, so the effective salience of the stimulus declines. Consequently, because of its loss of salience, the stimulus will be rendered less able to evoke its own UR. Therefore, habituation learning would depend not only on the stimulus being predicted (or "primed") but also what the stimulus predicts.

These theories must deal with the contextual specificity showed in habituation under specific temporal parameters (mainly long-term habituation). The contextual specificity of habituation is common to many species irrespective of the complexity of their nervous system. It has been demonstrated in humans (Turatto et al., 2019; Turatto et al., 2018) and also in rats (Evans and Hammond, 1983; Jordan et al., 2000), fowls (Shalter, 1975), and fishes (Peeke and Veno, 1973). This phenomenon has also been observed in some invertebrate species such as the nematode *Caenorhabditis elegans* (Rankin, 2000), the crab *Chasmagnathus* (Tomsic et al., 1998) and earthworms *Lumbricidae* (Reyes-Jiménez et al., 2020).

Studies with fishes and fowls (Peeke and Veno, 1973; Shalter, 1975) have demonstrated a renewal of their defensive responses (bites and calls, respectively) when the stimuli were presented in a different context to those where they received habituation training. In a recent study, Chiandetti and Turatto (2017) found rapid context-specific habituation of an unconditioned freezing response in newborn chicks. Three days after hatching, chicks showed generalized habituation of the freezing response to sudden acoustic stimuli across different contexts. On Days 3 and 4 after hatching, they exposed chicks to sudden auditory stimuli (which provoked a freezing response) under different contextual conditions (changing the spatial layout of the cues). The habituated response recovered completely when the chicks were tested in a context different to that used for training. In the similar vein, Reyes-Jiménez et al. (2020) reported contextual specificity of the retraction response habituated to a light stimulus in earthworms, even in a complex within-subjects scenario where two stimuli (light and vibration) trained in same/different contexts were employed ((Reyes-Jiménez et al., 2020), Experiment 2). Earthworms habituated in a context showed a recovery of the response to the stimulus re-habituated in a different context in comparison with that re-habituated in the same context. Studies conducted with rats have shown that this contextual specificity depends on both the biological significance of the stimulus (Evans and Hammond, 1983) and the response system that is being evaluated. For example, Jordan et al., (2000) found that habituation transferred between contexts when the startle response was habituated, whereas context specificity was observed when measuring the lick suppression or orienting response. Moreover, these authors demonstrated that exposure to the context alone resulted in extinction of the habituated response, suggesting that long-term habituation leads to the establishment of an association between the context and the stimulus as Wagner's theory predicts (but see concerns by (Hall and Rodríguez, 2017).

Studies conducted with the nematode *Caenorhabditis elegans* (Rankin, 2000) and the crab *Chasmagnathus* (Tomsic et al., 1998) have not only demonstrated that habituation is context specific but have also revealed the associative nature of the mechanism responsible for this phenomenon. For example, Tomsic et al. (1998) showed that the escape response to a sudden presentation of a visual danger stimulus in the crab *Chasmagnathus* (in nature, crabs are chased by gulls) can be attenuated by the repeated presentation of stimulus (that is, habituation training). In this study, Tomsic et al. (1998, see also Tomsic et al., 2009) showed that exposure to the context before (latent inhibition) or after (extinction) habituation training impaired long-term habituation. Rankin (2000) also reported context conditioning in habituation in the nematode *C. elegans*. By employing a chemosensory cue (NaCH<sub>3</sub>COO) as the context, it was found that retention of habituation was significantly greater if training and testing were conducted in the presence of the

same chemosensory cue. Additionally, these experiments demonstrated extinction and latent inhibition of the context, indicating that *C. elegans* are capable of associative context conditioning. It is interesting to note that in the study by Rankin (2000) this effect has been found using parameters corresponding not only to long-term habituation (60-s ISI) but also short-term habituation (10-s ISI).

As we have explained above, this contextual specificity has also been demonstrated in earthworms (Reyes-Jiménez et al., 2020). Although the authors found robust context specificity of the retraction to a light in a complex training setting, the potential associative nature of this effect was not evaluated.

In order to explore this issue, in the experiments reported here, we examined whether a context-stimulus association is established following habituation of the retraction response to a light. For this purpose, we exposed earthworms to the context alone, after habituation (post-exposition) and before habituation (pre-exposition). It is expected that both, post-exposition and pre-exposition, would produce, respectively, extinction and latent inhibition, disrupting the context-stimulus association and resulting in a recovery of the response during subsequent rehabituation training. The habituation training procedure was similar to that employed in previous work (Reyes-Jiménez et al., 2020).

## 2. Experiment 1

In this experiment we evaluated the effect of giving exposure to the context alone following habituation training to the light (US). This post-habituation exposure to the context in the absence of the US should be equivalent to the traditional paradigm of presenting the CS alone after Pavlovian training (extinction). We expect that if the extinction of the context is successful then we should observe a recovery of the habituated response.

### 2.1. Method

#### 2.1.1. Subjects

Thirty-six earthworms (*Lumbricidae*) were employed. All of these were collected from the garden individually and were then housed together in standard flowerpots (70 × 33 × 35 cm) filled with garden soil mixed with food (a mixture of triturated lettuce, beet and carrot). The earthworms weighed between 0.8 and 2.0 g. They had a mean length of 10 cm. and a mean weight of 1.18 g. The earthworms employed were adults, as evidenced by the fact that they possessed a clear clitellum. The clitellum is a thickened non-segmented section of the body wall near the head of the earthworms (around the 14th-17th segments), the main function of which is to store the eggs of the worms.

#### 2.1.2. Apparatus

The experiment was conducted by arranging the subjects in rows of two, observed by two researchers. Each researcher observed and registered the responses of one earthworm. Before the start of the experiment, researchers observed a registered the response of the same earthworms to assess the degree of inter-judge agreement. We calculated the Total Agreement Percentage<sup>1</sup> (House et al., 1981) that was equal to 0.83, which would be qualified as high.

The experimental sessions were conducted in a dark room illuminated with red light, which is imperceptible to earthworms. The earthworms were placed in two petri dishes (9 cm in diameter) that were located over a methacrylate platform (16 × 27 cm). The Petri dishes were kept wet with 10 ml of tap water. The light stimulus (1550 lx, 3-

seconds in duration) was provided by a desk lamp placed in a central location above the platform at a height of 24 cm. The desk lamp was connected to a CPU (Raspberry Pi 2 model B with SO Rapsbian) and the timings for applying the stimuli were controlled by Python software designed for this purpose. The odor employed as a context was administered by means of a piece of filter paper secured in the middle of the top cover of the petri dish. This was prepared by placing a drop of attar of roses (Rhade Shyam) onto a piece of 1 cm<sup>2</sup> filter paper secured to the cover with a small piece of tape. The top covers were treated with the odors at the beginning of the sessions in order to maintain the same intensity of the odors throughout the experiment.

They were conserved upside down to maintain the odour and prevent its diffusion along the 75 min. The top covers were not prepared again to avoid the exposition to a new and fresh odour which would differ from the habituated one and could be considered a new stimulus.

#### 2.1.3. Procedure

The design of the experiment is shown in Table 1. The earthworms were randomly divided into two groups: Extinction group and Control group. Two subjects of the same group were run at the same time. Initially, the earthworms were taken from the flowerpots, cleaned with distilled water and finally placed onto the wet petri dishes where they remained for a 2-min. adaptation period prior to training (familiarization). During this time, they were exposed to rose to become equally familiar with this context. Following this phase, the habituation phase began.

Second, during habituation training, both the Extinction and Control groups received 120 exposures to the light (1550 lx, 3-seconds in duration) in the rose odour context, with an inter-stimulus interval (ISI) of 30 s. The researchers recorded the number of head retraction responses (withdrawal responses, minimum 0.5 cm.) elicited in the presence of the light. In the case of the Control group, once the habituation had finished, the lids were replaced by others without an odour. The subjects were then placed into a drawer, where they remained for 75 min in a dark and odourless context. In the case of the Extinction group, the lids were taken and placed again to imitate the manipulation of the lids in the control group whilst maintaining the odour context. The subjects were then placed in the same drawer for 75 min

In the rehabituation phase, the subjects were taken from the drawer and placed onto the platform again. For the Control group the covers were replaced with the one employed for habituation while for the Extinction group only experienced an up and down of the same lids. Once the covers had been replaced, the light was again provided for 80 trials of habituation with an ISI of 30 s. The researchers again recorded the number of head retraction responses. We estimated the number of stimulus presentations needed to reach an asymptotic level of habituation on the basis of a previous experiment conducted in our laboratory (Reyes-Jiménez et al., 2019), in order to avoid an over-habituation effect (Rankin et al., 2009).

#### 2.1.4. Statistical analysis

In order to study the habituation and rehabituation curves, we fitted a linear model to model the proportion of responses as a function of the Blocks. Next, to study whether there were significant group differences in the slopes of the habituation and rehabituation curves (Experimental vs. Control) we used a linear model to conduct covariance analysis, with the proportion of responses as the criterion variable, blocks as the

**Table 1**

Design of Experiment 1 (Extinction) where the contexts employed were “Rose” (A) and “Odorless” (-). The stimulus employed was a bright light (Light) and the inter stimulus interval was 30 s.

Group	Familiarization	Habituation	Extinction	Rehabituation
Extinction	(A)	Light (A)	(A)	Light (A)
Control	(A)	Light (A)	(-)	Light (A)

<sup>1</sup> The Total Agreement Percentage (House, House and Campbell, 1981) can be defined as the number of participants for which there is agreement among the judges divided by the total number of trials performed. The coefficient is bounded between zero and 1, with 1 being the highest possible degree of agreement.

predictor variable, and group as covariate.

To analyze whether the difference observed during the rehabilitation phase is the result of a greater response recovery in relation to the initial habituation response, we calculated the habituation recovery index (HRI) for each condition (Control vs Extinction in Exp. 1; and Control vs Extinction and Latent inhibition in Exp. 2). To determine the HRI, we divided the proportion of responses in the first block of the rehabilitation by the sum of the proportion of responses in the first block of the habituation phase and the proportion of responses in the first block of the habituation phase ( $HRI = \text{Block1}_{\text{Rehab}} / (\text{Block1}_{\text{Hab}} + \text{Block1}_{\text{Rehab}})$ ). We conducted a *t*-test in order to compare the HRI across conditions.

## 2.2. Results and discussion

The results displayed in Fig. 1 show the pattern of a decline in responding during both the habituation and rehabilitation phases. The repeated presentation of the light led to a progressive decrease in the proportion of retraction responses. The most relevant result observed is the recovery of the response shown by the Extinction group at the beginning of the rehabilitation phase, which can be attributed to the disruption of context-US association brought about by post-exposure to the context. Statistical analysis of the habituation and rehabilitation data confirmed this impression of the results.

For the Habituation phase, we calculated the mean proportion of responses in each of the 12 blocks for each of the Groups in each of the conditions (Extinction vs. Control). For the Rehabilitation phase, we calculated the mean proportion of responses in each of the 8 blocks for each of the Groups in each of the conditions (Extinction vs. Control).

### 2.2.1. Habituation

For each of the two groups given the habituation training we fitted a linear model to the proportion of responses as a function of the Blocks. Our results indicated a significant slope for the Control group ( $t(16) = -9.50, p < 0.01$ ), and a significant effect for the Extinction group ( $t(16) = -7.29, p < 0.01$ ). These results indicate the effectiveness of the habituation training in the habituation phase of the experiment. Next, we studied whether there were significant differences in the habituation phase between the slopes of the groups (Extinction vs. Control). Using a linear model, we conducted a covariance analysis (*R*-squared: 0.27,  $F(3, 428) = 54.08, \text{MSE} = 0.03, p < 0.01$ ). The ANCOVA revealed a significant effect of Block ( $F(1, 428) = 141.89, \text{MSE} = 0.03, p < 0.01; \eta_p^2 = 0.25$ ), a significant effect of Group ( $F(1, 428) = 16.83, \text{MSE} = 0.03,$

$p < 0.01; \eta_p^2 = 0.04$ ), but no significant effect of the Block x Group interaction ( $F(1, 428) = 3.51, \text{MSE} = 0.03, p = 0.06$ ), indicating no significant differences between the slopes depending on Group. The Extinction group showed fewer responses throughout habituation in comparison with the Control group, in blocks 3, 6 and 7 ( $t(34) > = 2.04, p_s < 0.05$ ). However, they reached the same level of habituation at the end of training ( $t(34) = 0.60, p = 0.53$ ).

### 2.2.2. Rehabilitation

For each of the two groups that received the Rehabilitation training, we fitted a linear model to model the proportion of responses as a function of the Blocks. Our results revealed a significant effect for the Extinction group ( $t(16) = -5.19, p < 0.01$ ) but a non-significant slope for the Control group ( $t(16) = -1.13, p = 0.25$ ).

Again, for the rehabilitation phase, we obtained a significant model fit (*R*-squared: 0.08,  $F(3, 284) = 8.34, \text{MSE} = 0.04, p < 0.01$ ), a significant effect of Block ( $F(1, 284) = 18.09, \text{MSE} = 0.04, p < 0.01; \eta_p^2 = 0.06$ ), but no significant effect of Group ( $F(1, 284) < 1$ ). However, a significant Block x Group interaction was found ( $F(1, 284) = 6.40, \text{MSE} = 0.04, p < 0.05; \eta_p^2 = 0.01$ ) indicating significant differences between the slopes depending on Group. In the case of the Extinction group, we observed an habituation effect, as indicated by the decremental slope, whereas the Control group appeared to show a floor effect, presumably due to the fact that this group had reached an asymptotic level of responding.

To analyze whether the observed difference in the rehabilitation phase is the result of a greater response recovery in relation to the initial habituation response, we calculated the HRI for each group (Extinction vs. Control, see Fig. 2). We ran a *t*-test in order to determine whether the mean HRI in the Extinction group was significantly higher than that of the Control group. The results (see Fig. 2) revealed a significantly ( $t(34) = 2.60, p < 0.01; d = 0.86$ ) higher HRI in the Extinction group ( $M = 0.38$ ) than in the Control Group ( $M = 0.26$ ). Although a significant effect of group was showed in habituation, there was not significant differences in the first block of training,  $t(34) = 1.22, p = 0.23$ . It points out the reliability of our results and the HRI index employed. Also it points out the possibility for this difference to be an statistical artifact produced by the variability in the subjects' response.

In conclusion, habituation of the retraction response appears to be sensitive to the extinction of the context that was presented after habituation training. Therefore, it can be concluded that the recovery of the response following exposure to the context supports the prediction

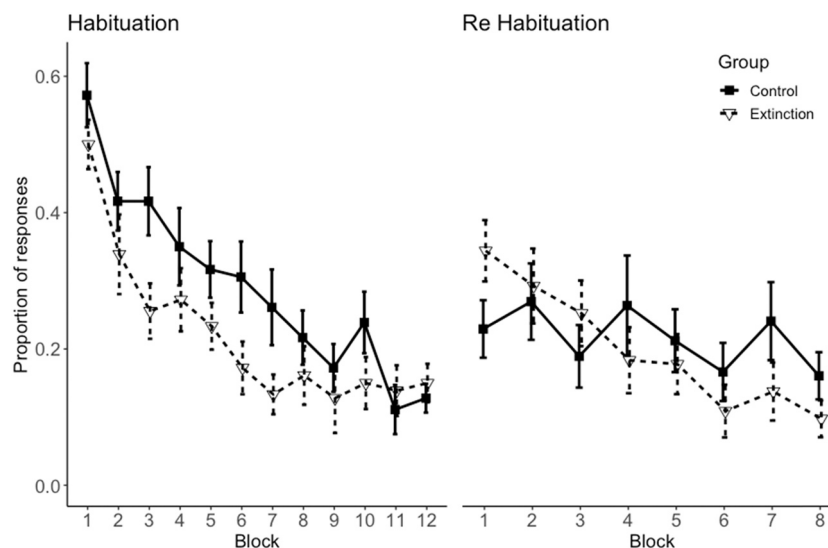


Fig. 1. Experiment 1. Habituation curves for each Group (Extinction vs Control) depending on Block of trials (1–12) and Phase (habituation vs Rehabilitation). The error bars represent the standard errors.

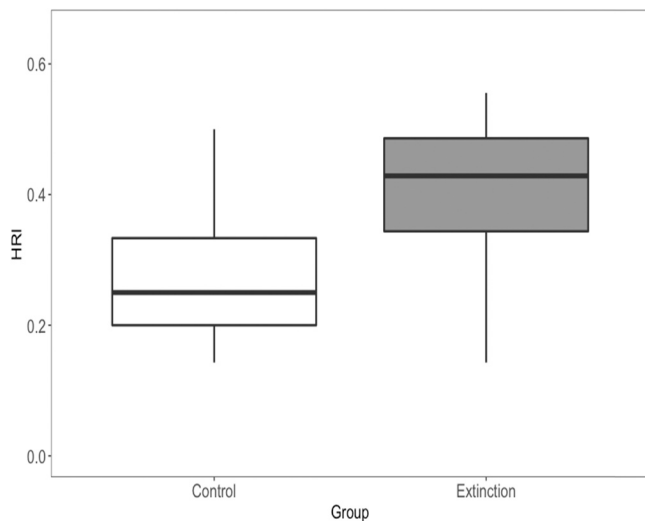


Fig. 2. Experiment 1. Box plot showing Median levels of the HRI ( $HRI = \text{Block1}_{\text{Rehab}} / (\text{Block1}_{\text{Hab}} + \text{Block1}_{\text{Rehab}})$ ) for each Group (Control vs Extinction). In each box plot, the box represents the distance from the first quartile to the third quartile. A vertical line goes through the box at the median. The whiskers go from each quartile to the minimum or maximum value.

made by Wagner’s SOP model (1976, 1981), in the same way that other studies suggest (Rankin, 2000; Tomsic et al., 1998). No alternative models (Groves and Thompson, 1970; Hall and Rodríguez, 2020; Konorski, 1967; Sokolov, 1963) make this prediction.

### 3. Experiment 2

Extinction is not the only way to disrupt the association between a context CS and a US. In this experiment, we evaluated the effect of exposure to the context alone *before* habituation training to the light (US). Pre-exposure to the context in the absence of the US before habituation training should be functionally equivalent to the traditional paradigm of presenting the CS alone before Pavlovian training (latent inhibition). Latent inhibition would disrupt the capacity of the context to become associated with the light- US. According to Wagner’s theory, we expected the same effect from both, pre-exposure and post-exposure of the context, that is, the recovery of response during the re-habituation test, because this conditions would disrupt the establishment of an association context-light. This was confirmed in Experiment 1 that revealed a successful extinction effect. In this experiment, we repeat the post-exposure treatment of Experiment 1 and also a pre-exposure treatment was added in order to compare their effects under the same conditions.

#### 3.1. Method

##### 3.1.1. Subjects

Sixty-four earthworms were employed in this experiment. All of these were individually collected from the garden and were then housed in flowerpots under the same conditions as described for Experiment 1. They were fed and watered once a week. The earthworms weighed between 0.7 and 2.067 g., with a mean length of 10 cm. and a mean weight of 1.05 g. All of the earthworms were adults, with the clitellum clearly visible.

##### 3.1.2. Apparatus

The Petri dishes, platform, and light were identical to those employed in the previous experiments. The inter-trial interval employed was 30 s, and the contextual odour (rose) was prepared in the same way as described in the previous experiments.

##### 3.1.3. Procedure

The design of the experiment is shown in Table 2. This experiment consisted of adding together both conditions (post-exposure and pre-exposure) using similar timings and control groups. They were labelled as Extinction and Latent Inhibition conditions, respectively. Two groups were employed in each condition, Extinction and Extinction control groups, and LI and LI control groups, respectively.

First, as in the previous experiment, the earthworms were taken from the flowerpots, cleaned with distilled water, and finally placed into the Petri dishes.

The LI and the Control LI groups first received a pre-exposure phase. In the case of the LI group, the subjects were placed into the petri dish with the rose odour and they were left in the drawer for 60 min. The Control LI group was placed in the drawer without the odour. The Extinction and Control Extinction groups did not receive this phase.

All groups then received habituation training in a Petri dish with the odorous context. The lids of the LI group were moved up and down to simulate the manipulation of the lids whilst for the Control LI group these were replaced with new odorous lids. This phase consisted of presenting the light for 120 exposure trials with an ISI of 30 s

Following this phase, in the Extinction and Control Extinction groups, the subjects were placed into the drawer with an odorous context (or not) depending on the group. The Extinction group experienced the upward and downward movement of the odorous lids while the Control Extinction group remained inside the drawer with an odorless context. Both of the groups remained there for 60 min. The LI and Control LI groups did not receive this phase.

Finally, a rest interval of 15 min was included in order to equate the total time spent in the Petri dishes. Furthermore, this delay was imposed to separate the habituation and re-habituation phases in the Latent Inhibition paradigm. During this period, all the groups remained on the platform with the odorless context. Following this phase, the odorous lids were replaced, and the final phase of the experiment began.

The re-habituation phase consisted of presenting the light in the odorous context. All the subjects received 80 exposures to the light with an ISI of 30 s. The number of head retraction responses was again recorded by the researchers.

#### 3.2. Results and discussion

The results of this experiment are displayed in Fig. 3. This figure shows the habituation and re-habituation performance of the Extinction and Latent Inhibition groups in comparison with their corresponding control groups. Three earthworms were excluded of the analyses due to their low response rate, two from the Latent Inhibition condition (1 Ctrl and 1 Experimental) and one from the Extinction condition (Ctrl). The criteria for declaring low response rate was established a priori. It

Table 2

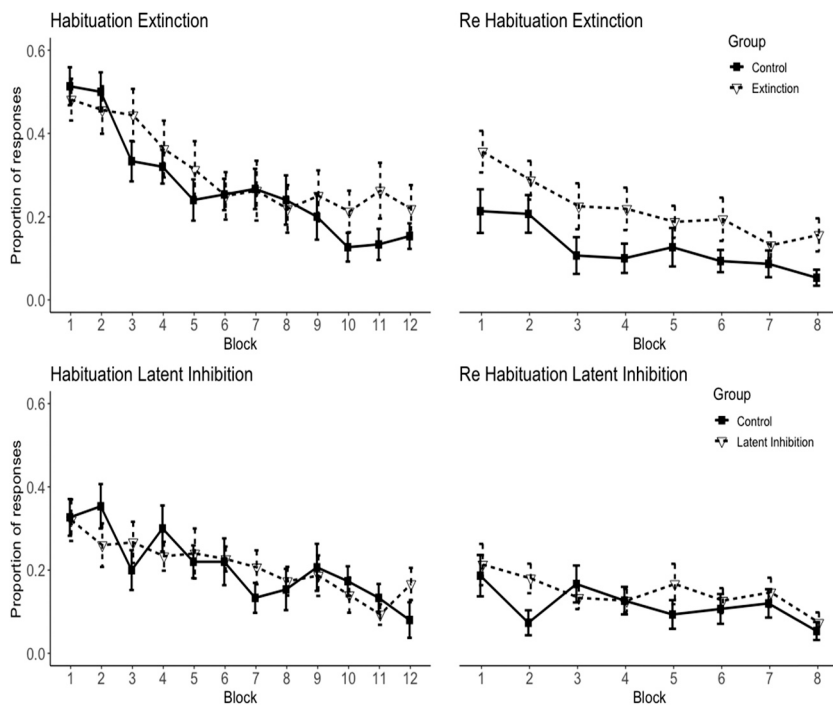
Design of Experiment 2 (Extinction and Latent Inhibition). The LI group and LI control group did not receive the extinction phase; they passed immediately from habituation to the 15’ phase. The Extinction group and Extinction Control group did not receive a pre-exposure phase, and instead began from the habituation phase. The contexts employed were “Rose” (A) and “Odorless” (-). The stimulus employed was a bright light (Light) and the inter stimulus interval was 30 s.

Group	Pre-exposure	Habituation	Extinction	15’	Rehabilitation
LI	(A)	Light (A)		(-)	Light (A)
LI Control	(-)	Light (A)		(-)	Light (A)
Extinction		Light (A)	(A)	(-)	Light (A)
Extinction Control		Light (A)	(-)	(-)	Light (A)

Contexts: (A) = Rose; (-) = Odorless

Stimuli: Light = Bright Light

ISI = 30 s



**Fig. 3.** Experiment 2. Habituation and Re-habituation curves for each Group (Experimental vs Control) depending on Block of trials (1–12) and Condition (Extinction vs Latent Inhibition). The upper panel shows habituation and re-habituation curves corresponding to Extinction group (Ext) vs Control group (Control Ext) whereas the lower panel shows habituation and re-habituation curves corresponding to Latent Inhibition group (LI) vs Control group (Control Inh). The error bars represent the standard errors.

consisted in excluding the subjects that showed a different number of responses of those comprised between two standard deviations above and below the mean in half of the total training blocks plus one. First, we should note the differences in performance during Habituation training between the Extinction and Latent Inhibition groups (left hand-panel of Fig. 3). The Latent inhibition condition groups showed fewer responses than the Extinction condition groups. This impression was confirmed by statistical analysis. We conducted a *t*-test for independent samples in order to compare the proportion of responses during the habituation phase in each of the conditions (either Extinction condition or Latent Inhibition condition). The results revealed significant differences between groups ( $t(29) = 5.40, p < 0.01$ ). The mean number of responses for groups that received the Extinction condition ( $M=0.29, SD=0.23$ ) were significantly higher than those who received the Latent Inhibition condition ( $M=0.20, SD=0.18$ ). For this reason, we presented and analyzed the results separately for the Extinction and Latent Inhibition condition groups.

### 3.2.1. Extinction condition

For the Habituation phase, we calculated the mean proportion of responses in each of the 12 blocks for each of the Groups in each of the conditions (Extinction vs. Control). For the Re-habituation phase, we calculated the mean proportion of responses in each of the 8 blocks for each of the Groups in each of the conditions (Extinction vs. Control). The results are presented in the upper panel of Fig. 3.

For each of the two groups that received the Habituation training, we fitted a linear model to model the proportion of responses as a function of Block. Our results revealed a significant slope for the Control group ( $t(13) = -8.51, p < 0.01$ ), and a significant effect for the Extinction group ( $t(14) = -4.89, p < 0.01$ ). These results indicate the effectiveness of the habituation training used in this experiment. Next, in order to determine whether there were significant differences during the habituation phase between the slopes of the groups (Extinction vs. Control), we used a linear model and conducted a covariance analysis with Proportion of Responses as the criterion variable, Blocks as the predictor variable, and Group as covariate ( $R$ -squared: 0.17,  $F(3, 368) = 27.95, p < 0.01$ ). The ANCOVA revealed a significant effect of Block ( $F(1, 368) = 79.49, MSE=0.05, p < 0.01; \eta_p^2 = 0.18$ ), but no significant

effect of Group ( $F(1, 368) = 2.89, MSE=0.05, p = 0.08$ ) or a Block x Group interaction ( $F(1, 368) = 1.46; MSE=0.05, p = 0.22$ ), indicating no significant differences between the slopes depending on Group. Both the Extinction and Control groups showed a similar level of responding throughout the habituation training phase.

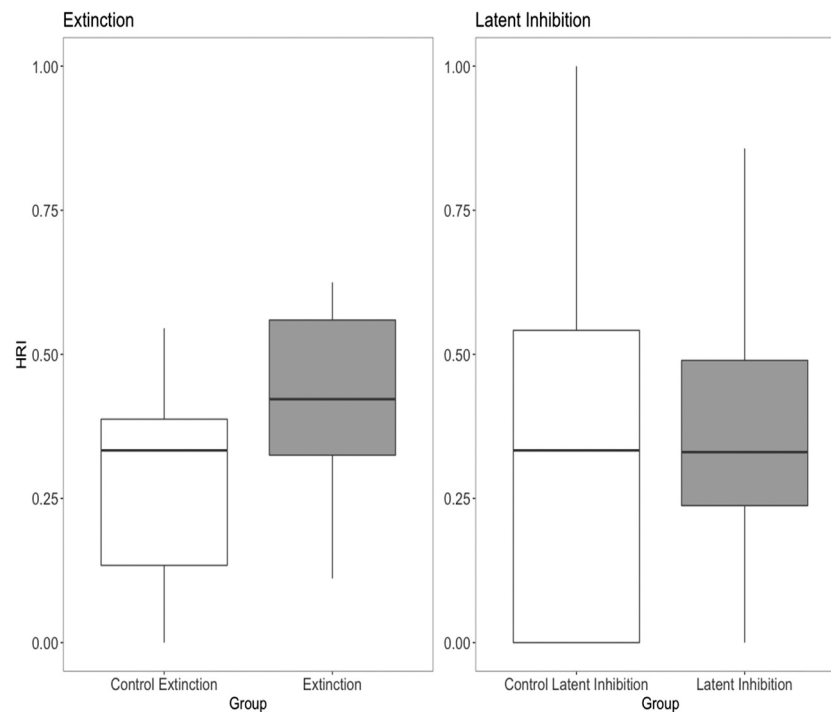
For the responses of each of the two groups during the Re-habituation phase, we fitted a linear model to model the proportion of responses as a function of Blocks. Our results indicated a significant effect for the Extinction group ( $t(29) = -3.91, p < 0.01$ ) as well as for the Control group ( $t(29) = -3.45, p < 0.01$ ).

Again, for the re-habituation phase, we obtained a significant model fit ( $R$ -squared: 0.15,  $F(3, 244) = 16.07, p < 0.01$ ), a significant effect of Block ( $F(1, 244) = 27.17, MSE = 0.02, p < 0.01; \eta_p^2 = 0.10$ ), a significant effect of Group ( $F(1, 244) = 20.50, p < 0.01; \eta_p^2 = 0.08$ ), but no significant Block x Group interaction ( $F(1, 244) < 1$ ) indicating no significant differences between the slopes depending on Group. The Extinction group showed a higher level of responding than the Control group during re-habituation training. The extinction training seemed to be effective, provoking a recovery of responding during re-habituation training. This impression was also confirmed by analysis of the HRI, the results of which are displayed in the left-hand panel of Fig. 4. The results obtained during Extinction showed significantly higher HRI ( $t(29) = 1.90, p < 0.05; d=0.69$ ) in the Extinction group ( $M = 0.41$ ) than the Control Group ( $M = 0.28$ ).

### 3.2.2. Latent Inhibition condition

As in Experiment 1, for the Habituation phase, we calculated the mean proportion of responses in each of the 12 blocks for each of the Groups in each of the conditions (Latent Inhibition vs. Control). For the Re-habituation phase, we calculated the mean proportion of responses in each of the 8 blocks for each of the Groups in each of the conditions (Latent Inhibition vs. Control). The results are presented in Fig. 3 (lower panel).

For the responses observed in each of the two groups during the Habituation phase, we fitted a linear model to model the proportion of responses as a function of Blocks. Our results revealed a significant slope for the Control group ( $t(13) = -5.06, p < 0.01$ ), and a significant effect for the Latent Inhibition group ( $t(13) = -4.45, p < 0.01$ ). These results



**Fig. 4.** Experiment 2. Box plot of HRI mean ( $HRI = \text{Block1Rehab} / (\text{Block1Hab} + \text{Block1Rehab})$ ) for each group (Control vs. Experimental) in each condition (Extinction vs. LI). In each box plot, the box represents the distance from the first quartile to the third quartile. A vertical line goes through the box at the median. The whiskers go from each quartile to the minimum or maximum value.

indicate the effectiveness of the habituation procedure used in this experiment.

Next, and to determine whether there were significant differences between the slopes of the groups (Latent Inhibition vs. Control) during the habituation phase, we used a linear model and conducted a covariance analysis with Proportion of Responses as the criterion variable, Blocks as the predictor variable, and Group as covariate ( $R$ -squared: 0.10,  $F(3, 356) = 15.36$ ,  $MSE = 0.03$ ,  $p < 0.01$ ). The ANCOVA revealed a significant effect of Block ( $F(1, 356) = 45.53$ ,  $MSE = 0.03$ ,  $p < 0.01$ ;  $\eta_p^2 = 0.11$ ), but no significant effect of Group ( $F(1, 356) < 1$ ) or a Block  $\times$  Group interaction ( $F(1, 356) < 1$ ), indicating no significant differences between the slopes depending on Group.

For the responses observed in each of the two groups during the Rehabilitation phase, we fitted a linear model to model the proportion of responses as a function of Blocks. Our results indicated a trend in the slope for the Control group ( $t(13) = -1.93$ ,  $p = 0.05$ ), and a significant effect for the Latent Inhibition group ( $t(13) = -2.44$ ,  $p < 0.05$ ). As in the habituation phase, in order to determine whether there were significant differences between the slopes of the groups (Latent Inhibition vs. Control) during the rehabilitation phase, we used a linear model and conducted a covariance analysis with Proportion of Responses as the criterion variable, Blocks as the predictor variable, and Group as covariate. We obtained a significant model fit ( $R$ -squared: 0.04,  $F(3, 236) = 4.14$ ,  $MSE = 0.02$ ,  $p < 0.01$ ), a significant effect of Block ( $F(1, 236) = 9.55$ ,  $MSE = 0.02$ ,  $p < 0.01$ ;  $\eta_p^2 = 0.04$ ), but no significant effect of Group ( $F(1, 236) = 2.77$ ,  $MSE = 0.02$ ,  $p = 0.10$ ). Moreover, we found no significant Block  $\times$  Group interaction ( $F(1, 236) < 1$ ) indicating no significant differences between the slopes depending on Group. The pre-exposure experience therefore had a similar effect on the LI and Control LI groups.

The HRI analysis for Latent Inhibition (see right-hand panel of Fig. 4) found no significant differences ( $t < 1$ ), and we can thus conclude that the mean HRI for the Latent Inhibition group ( $M = 0.34$ ) did not differ from that of the Control Group ( $M = 0.39$ ).

In summary, these results replicated those found in Experiment 1.

The extinction treatment seems to have a disruptive effect on the context-US association, bringing about a recovery of response during rehabilitation. Moreover, opposite to Experiment 1, no differences between Extinction Group and its Control were found, which supports the possibility that the differences found in Experiment 1 were due to the variability in subject response. However, this disruptive effect was not showed in the latent inhibition treatment, where the recovery of the response during rehabilitation was not observed.

Notwithstanding, a more detailed analysis of the results of Experiment 2 indicated that the pre-exposure treatment was not completely unsuccessful. First, comparison of the groups in the post-exposed and pre-exposed conditions revealed that there was a difference between them. In particular, the proportion of responses observed in the latent inhibition condition was significantly lower than that of the extinction condition during habituation training and also during rehabilitation training. That is, pre-exposure produced a general decrement in responding that affected both the LI (odorous context in pre-exposition) and Control LI (without odor context in pre-exposition) groups. It appears then, that earthworms are influenced by familiarity with the context (as produced by pre-exposure). This effect was also similar for both the LI and Control LI groups although pre-exposure was given to the Control LI group in a different context to that used for the LI group and for habituation training. The effects of pre-exposure on performance have also been reported in experiments with other invertebrates. For example, Tomsic et al. (1998, Experiment 4) observed that the crabs in the latent inhibition untrained group (who received pre-exposure to the context but did not receive habituation training until the test) showed a significantly lower level of the escape response than crabs in the standard untrained group (who were not pre-exposed to the context and did not receive habituation training until the test). Further, Prados et al. (2020) showed that planarians are sensitive to contextual manipulations. They found that long-term habituation of locomotor activity is dependent upon the relative novelty of the context. The level of activity of planarians during the test phase was lower when subjects were pre-exposed to a novel context in comparison with those preexposed to a

familiar context (similar to the housing containers).

This fact led us to further explore this possibility conducting a Repeated Measures ANOVA to analyze possible differences in the number of responses across blocks, condition (pre-exposure vs post-exposure) and treatment (experimental vs control) for each phase of the experiment. The analysis of habituation phase revealed a significant effect of Block,  $F(11, 627) = 25.99$ ,  $MSE = 1.79$ ;  $p < 0.01$ ; Condition  $F(1, 57) = 4.85$ ,  $MSE = 26.15$ ;  $p < 0.05$  and also a Block x Condition interaction,  $F(11, 627) = 2.67$ ,  $MSE = 1.79$ ;  $p < 0.01$ . No significant effect of Treatment was observed,  $p > 0.05$ . In the rehabilitation phase, the analysis revealed a significant effect of Block,  $F(7, 399) = 8.77$ ,  $MSE = 1.55$ ;  $p < 0.01$  and treatment  $F(1, 57) = 5.69$ ,  $MSE = 8.52$ ;  $p < 0.05$ . Neither Condition, nor interactions were significant,  $p > 0.05$ .

The differences between pre-exposure and post-exposure condition and its interaction with block factor suggest that the previous experience with the context affected to habituation phase. It seems that pre-exposure brought about a facilitation of habituation to the light. It is possible that the pre-exposure rendered the context lower in salience/associability, promoting the habituation to the light through the self-generated priming process. However, it may be acknowledged that to accept this proposal it must be assumed that a generalization between experimental and control contexts was produced. Both contexts are quite similar and only differed in terms of the odour (odour vs. odourless), which might explain why the pre-exposure effect was similar in both groups.

#### 4. General discussion

The present experiments evaluated the associative nature of the contextual specificity of habituation in earthworms. The introduction of a context shifts between habituation and rehabilitation favors the recovery of the retraction response to a light in earthworms (Reyes-Jiménez et al., 2020). This finding that could be explained by the establishment of an association between the context and the light (US). Following Wagner's SOP theory, the context would restore the light US to an A2 state, so the stimulus will be less effective in provoking the response. Moreover — and in line with associative theories of learning — exposure to the context after habituation training will extinguish the context-US association.

Experiment 1 seems to confirm this prediction; exposure to the context after habituation degraded this association, which produced a recovery in responding during the subsequent rehabilitation phase. The same result was found in the extinction condition of Experiment 2, and so this can be regarded as support to the SOP theory. This theory assumes that the context works as a concrete stimulus. However, we might consider other alternative explanations. For example, (Hall and Rodríguez, 2010, 2020) point out that latent inhibition (that, similar to habituation, consists in the presentation of a stimulus alone) involves the formation of a stimulus - no-event association in presence of a context. Then, the context would act as an occasion-setter, signalling that the light would be followed by a "not event". This would be an alternative explanation for the contextual specificity effect observed with earthworms. When light is presented in a new context that has not acquired these signalling properties, the recovery of response is observed. However, this explanation does not fit with our results because the effectiveness of the occasion-setters is not eliminated by simple exposure (Holland, 1992; Rescorla, 1986). Then, it seems that it fits better to accept that the specificity observed in (Reyes-Jiménez et al., 2020) depends on a direct context-US association, in line with what other studies suggest (Rankin, 2000; Tomsic et al., 1998; Turatto et al., 2018).

In Experiment 2 we replicate the Experiment 1 and also evaluated the effect of latent inhibition on the context-US association. The latent inhibition effect is produced by prior exposure to a stimulus before conditioning. This pre-exposure reduces the effectiveness of the stimulus to serve as a CS. Consequently, pre-exposure to the context before

habituation will hinder the formation of the context-US association during habituation training and a recovery of responding during rehabilitation test will be observed in the latent inhibition group in a similar way as observed in the extinction condition. This result has previously been reported in experiments conducted with the nematode *C. elegans* (Rankin, 2000). However, contrary to our expectations, the results of Experiment 2 replicated the extinction effect but failed in showing a latent inhibition effect.

On the basis of associative theories, we expected that the pre-exposure of the context will prevent the establishment of an association between the context and the light, producing a recovery of response during the rehabilitation phase, which was not the case. In the latent inhibition condition, the experimental and control group showed similar levels of responding during the rehabilitation phase. Nonetheless, it must be highlighted that effect of pre-exposure was found, given the general decrease in performance observed in the pre-exposed groups (latent inhibition condition in Experiment 2) in comparison with the non-preexposed groups (extinction condition in Experiment 2).

Different interpretations of these results may be considered. First, attending to Sokolov's Stimulus-Model Comparator theory of habituation (Sokolov, 1960, 1963), the pre-exposure of the context would consolidate a mental model of the physical context and all its elements (odor, texture, humidity,...) in such a way that when the same context is presented again with the light in the second phase, the level of responses would decrease because of the inhibition of arousal system. In spite of the odour changes (in LI-control groups), the rest of the elements of the context remain habituated and thus, the presentation of the light would not completely mismatch the context's mental model. Consequently, the levels of responses in both IL and control groups are low. Additionally, it would make it difficult for context to enter in association with the light during the habituation training and, accordingly, a recovery of response would not be observed during rehabilitation test. Certainly it is difficult to prove the existence of a mental model without succumbing to a circular reasoning since the evidence for the existence of the model is the habituation of the response and vice versa, if there is not habituation in the response, it means the mental model has not been formed. A parsimonious explanation is what (Hall and Rodríguez, 2020) proposed, as we stated in the discussion of Experiment 2. The pre-exposure of the context would mainly provoke a loss in the salience of the context, since nothing is expected. It also makes it difficult to enter in association with the light when it is presented, facilitating the process of self-generated priming that would result in the habituation process of the light. However, his explanation might not be regarded as completely satisfactory. As it was stated, a generalization between contexts in groups in latent inhibition condition must be assumed because there are not differences between them. Additional research (employing more distinguishable contexts, for instance) must be done in order to completely explain this effect.

In conclusion, part of the findings of the present experiments provide support for the SOP theory. Under certain circumstances, habituation could rely upon a context-US association. In the study of mammals, it is well known that contexts can play a variety of roles in learning (Hall and Honey, 1989; Urcelay and Miller, 2014) and this idea can be extended to invertebrate species. Our findings also reveal the sensitivity of earthworms to contextual cues, a fact that has been showed in various studies (Rankin, 2000; Reyes-Jiménez et al., 2020; Tomsic et al., 1998; see also Loy et al. 2020 for internal contexts) which challenges the proposal that invertebrates are not capable of representing contextual information due to their limited neural structure (Lubow, 2010). Additionally, they support the idea that habituation is not a simple, nor a passive form of learning. More remarkably, the results of these experiments underline the existence of associative and nonassociative processes in habituation that would extend to the processing of the context. Finally they highlight that habituation is not as simple as it seems to be, and mirror the multiple mechanisms that mediate habituation suggested by the studies of the cellular basis of habituation (McDiarmid et al.,

2019).

### CRedit authorship contribution statement

The authors declare that their contribution to the final manuscript in the different roles (Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing) has been equivalent.

### Acknowledgments

This research was financially supported by the research group HUM-642: Comparative Psychology: Learning, Attention and Memory from University of Jaén Spain. We thank Ricardo F. Paredes Álvarez, who collected and supplied the earthworms. Also we are very grateful to anonymous reviewers for their useful and challenging suggestions. Finally, we thank Nacho Loy for his suggestion to design Experiment 2 and Noelia Oya Monzó for the linguistic review of this manuscript.

### References

- Abramson, C.I., Chicas-Mosier, A.M., 2016. Learning in plants: lessons from *Mimosa pudica*. *Front. Psychol.* 7, A417 <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.00417>.
- Adelman, B.E., 2018. On the conditioning of plants: a review of experimental evidence. *Perspect. Behav. Sci.* 41 (2), 431–446. <https://doi.org/10.1007/s40614-018-0173-6>.
- Baglan, H., Lazzari, C., Guerrieri, F., 2017. Learning in mosquito larvae (*Aedes aegypti*): habituation to a visual danger signal. *J. Insect Physiol.* 98, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.01.001>.
- Bailey, C.H., Chen, M., 1983. Morphological basis of long-term habituation and sensitization in *Aplysia*. *Science* 220 (4592), 91–93. <https://doi.org/10.1126/science.6828885>.
- Bailey, C.H., Chen, M., 1988. Morphological basis of short-term habituation in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 8 (7), 2452–2459. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-07-02452.1988>.
- Best, A.R., Thompson, J.V., Fletcher, M.L., Wilson, D.A., 2005. Cortical metabotropic glutamate receptors contribute to habituation of a simple odor-evoked behavior. *J. Neurosci.* 25 (10), 2513–2517. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5298-04.2005>.
- Bradley, M.M., Lang, P.J., Cuthbert, B.N., 1993. Emotion, novelty, and the startle reflex: habituation in humans. *Behav. Neurosci.* 107 (6), 970–980. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.107.6.970>.
- Chiandetti, C., Turatto, M., 2017. Context-specific habituation of the freezing response in newborn chicks (doi.org/). *Behav. Neurosci.* 131 (5), 437–446. <https://doi.org/10.1037/bne0000212>.
- Engel, J.E., Wu, C.F., 2009. Neurogenetic approaches to habituation and dishabituation in *Drosophila*. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92 (2), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.08.003>.
- Evans, J.G.M., Hammond, G.R., 1983. Differential generalization of habituation across contexts as a function of stimulus significance. *Anim. Learn. Behav.* 11 (4), 431–434. <https://doi.org/10.3758/BF03199798>.
- Gagliano, M., Renton, M., Depczynski, M., Mancuso, S., 2014. Experience teaches plants to learn faster and forget slower in environments where it matters. *Oecologia* 175 (1), 63–72. <https://doi.org/10.1007/s00442-013-2873-7>.
- Groves, P.M., Thompson, R.F., 1970. Habituation: a dual-process theory. *Psychol. Rev.* 77 (5), 419–450. <https://doi.org/10.1037/h0029810>.
- Hall, G., Honey, R.C., 1989. Contextual effects in conditioning, latent inhibition, and habituation: associative and retrieval functions of contextual cues. *J. Exp. Psychol.: Anim. Behav. Processes* 15 (3), 232–241. <https://doi.org/10.1037/0097-7403.15.3.232>.
- Hall, G., Rodríguez, G., 2010. Associative and nonassociative processes in latent inhibition: An elaboration of the Pearce-Hall model. In: Lubow, R.E., Weiner, I. (Eds.), *Latent inhibition: Cognition, neuroscience and applications to schizophrenia*. Cambridge University Press, pp. 114–136.
- Hall, G., Rodríguez, G., 2017. Habituation and conditioning: salience change in associative learning. *J. Exp. Psychol.: Anim. Learn. Cognit.* 43, 48–61. <https://doi.org/10.1037/xan0000129>.
- Hall, G., Rodríguez, G., 2019. Attention to perceive, to learn and to respond (https://doi.org/). *Q. J. Exp. Psychol.* 72, 335–345. <https://doi.org/10.1080/17470218.2017.1339719>.
- Hall, G., Rodríguez, G., 2020. When the stimulus is predicted and what the stimulus predicts: alternative accounts of habituation. *J. Exp. Psychol. Anim. Learn. Cognit.* 46 (3), 327–340. <https://doi.org/10.1037/xan0000237>.
- Holland, P.C., 1992. Occasion setting in Pavlovian conditioning. *Psychol. Learn. Motiv.* 28, 69–125. [https://doi.org/10.1016/S0079-7421\(08\)60488-0](https://doi.org/10.1016/S0079-7421(08)60488-0).
- House, A.E., House, B.J., Campbell, M.B., 1981. Measures of interobserver agreement: Calculation formulas and distribution effects. *J. Behav. Assess.* 3, 37–57. <https://doi.org/10.1007/BF01321350>.
- Jeffrey, W.E., Cohen, L.B., 1971. Habituation in the human infant. *Adv. Child Dev. Behav.* 6 (C), 63–97. [https://doi.org/10.1016/S0065-2407\(08\)60081-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2407(08)60081-6).
- Jennings, H.S., 1906. *Behavior of the Lower Organisms*. Columbia University Press, New York. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.4123>.
- Jordan, W.P., Strasser, H.C., McHale, L., 2000. Contextual control of long-term habituation in rats. *J. Exp. Psychol.: Anim. Behav. Processes* 26 (3), 323–339. <https://doi.org/10.1037/0097-7403.26.3.323>.
- Kandel, 1976. *Cellular Basis of Behavior: An Introduction to Behavioral Neurobiology*. W.H. Freeman, San Francisco.
- Kindt, K.S., Quast, K.B., Giles, A.C., De, S., Hendrey, D., Nicastro, I., Rankin, C.H., Schafer, W.R., 2007. Dopamine mediates context-dependent modulation of sensory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* 55, 662–676. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.023>.
- Konorski, J., 1967. *Integrative activity of the brain*. University of Chicago Press, Chicago.
- Lau, H.L., Timbers, T.A., Mahmoud, R., Rankin, C.H., 2013. Genetic dissection of memory for associative and non-associative learning in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Brain Behav.* 12 (2), 210–223. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00863.x>.
- Loy, I., Fernández-Victorero, S., Muñiz-Moreno, J., 2020. Renewal of conditioned tentacle lowering by circadian contextual cues in snails *Cornu aspersum*. *Behav. Processes* 178, 104144. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2020.104144>.
- Lubow, R.E., 2010. 'A short history of latent inhibition research', in *Latent Inhibition Cognition*. In: Robert Lubow, Weiner, Ina (Eds.), *Neurosci. Appl. Schizophrenia*. Cambridge University Press.
- McDiarmid, T.A., Yu, A.J., Rankin, C.H., 2019. Habituation is more than learning to ignore: multiple mechanisms serve to facilitate shifts in behavioral strategy. *BioEssays* 41 (9), 1900077. <https://doi.org/10.1002/bies.201900077>.
- Peeke, H.V., Veno, A., 1973. Stimulus specificity of habituated aggression in the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Behav. Biol.* 8 (3), 427–432. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(73\)80083-5](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(73)80083-5).
- Pinsker, H., Kupfermann, I., Castellucci, V., Kandel, E., 1970. Habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 167 (3926), 1740–1742. <https://doi.org/10.1126/science.167.3926.1740>.
- Prados, J., Fisher, C.T., Moreno-Fernández, M.M., Tazumi, T., Urcelay, G.P., 2020. Short- and long-term habituation of photonegative and exploratory responses in the flatworm planaria (*Dugesia*). *J. Exp. Psychol. Anim. Learn. Cognit.* 46 (3), 354–365. <https://doi.org/10.1037/xan0000256>.
- Ramaswami, M., 2014. Network plasticity in adaptive filtering and behavioral habituation. *Neuron* 82 (6), 1216–1229. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.035>.
- Rankin, C.H., 2000. Context conditioning in habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Behav. Neurosci.* 114 (3), 496–505. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.114.3.496>.
- Rankin, C.H., Abrams, T., Barry, R.J., Bhatnagar, S., Clayton, D.F., Colombo, J., Thompson, R.F., 2009. Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92 (2), 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>.
- Rescorla, R.A., 1986. Extinction of facilitation. *J. Exp. Psychol.: Anim. Behav. Processes* 12, 16–24. <https://doi.org/10.1037/0097-7403.12.1.16>.
- Reyes-Jiménez, D., Abad, M.J.F., Paredes-Olay, C., 2019. Classical conditioning in earthworms employing an odorous conditioned stimulus. *Behav. Processes* 164, 214–216. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2019.05.014>.
- Reyes-Jiménez, D., Iglesias-Parro, S., Paredes-Olay, C., 2020. Contextual specificity of habituation in earthworms. *J. Exp. Psychol. Anim. Learn. Cognit.* 46 (3), 341–353. <https://doi.org/10.1037/xan0000255>.
- Sanyal, S., Wintle, R.F., Kindt, K.S., Nuttley, W.M., Arvan, R., Fitzmaurice, P., Schafer, W.R., 2004. Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 23 (2), 473–482.
- Schmid, S., Brown, T., Simons-Weidenmaier, N., Weber, M., Fendt, M., 2010. Group III metabotropic glutamate receptors inhibit startle-mediated giant neurons in the caudal pontine reticular nucleus but do not mediate synaptic depression/short-term habituation of startle. *J. Neurosci.* 30 (31), 10422–10430. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0024-10.2010>.
- Schmid, S., Wilson, D.A., Rankin, C.H., 2015. Habituation mechanisms and their importance for cognitive function. *Front. Integr. Neurosci.* 8 (97) <https://doi.org/10.3389/fnint.2014.00097>. PMID: 25620920; PMCID: PMC4288050.
- Shalter, M.D., 1975. Lack of spatial generalization in habituation tests of fowl. *J. Compar. Physiol. Psychol.* 89 (3), 258–262. <https://doi.org/10.1037/h0076817>.
- Sokolov, E.N., 1960. Neuronal models and the orienting influence. In: Brazier, M.A. (Ed.), *The Central Nervous System and Behavior III*. Macy foundation, New York.
- Sokolov, E.N., 1963. Higher nervous functions: the orienting reflex. *Annu. Rev. Physiol.* 25 (1), 545–580. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.25.030163.002553>.
- Thompson, R.F., 2009. Habituation: a history. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92 (2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.011>.
- Thompson, R.F., Spencer, W.A., 1966. Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol. Rev.* 73 (1), 16–43. <https://doi.org/10.1037/h0022681>.
- Tomsic, D., de Astrada, M.B., Sztarker, J., Maldonado, H., 2009. Behavioral and neuronal attributes of short- and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92 (2), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.01.004>.
- Tomsic, D., Pedreira, M.E., Romano, A., Hermitte, G., Maldonado, H., 1998. Context-US association as a determinant of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Anim. Learn. Behav.* 26 (2), 196–209. <https://doi.org/10.3758/BF03199212>.
- Turatto, M., Bonetti, F., Chiandetti, C., Pascucci, D., 2019. Context-specific distractors rejection: contextual cues control long-term habituation of attentional capture by

- abrupt onsets. In: *Visual Cognit.*, 27, pp. 291–304. <https://doi.org/10.1080/13506285.2019.1580233>.
- Turatto, M., Bonetti, F., Pascucci, D., 2018. Filtering visual onsets via habituation: a context-specific long-term memory of irrelevant stimuli. *Psychonomic Bulletin & Review* 25 (3), 1028–1034. <https://doi.org/10.3758/s13423-017-1320-x>.
- Urcelay, G.P., Miller, R.R., 2014. The functions of contexts in associative learning. *Behav. Processes* 104, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.02.008>.
- Uribe-Bahamonde, Y.E., Becerra, S.A., Ponce, F.P., Vogel, E.H., 2019. A quantitative account of the behavioral characteristics of habituation: the sometimes opponent processes model of stimulus processing. *Front. Psychol.* 10, 504. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.00504>.
- Vogel, E.H., Ponce, F.P., Wagner, A.R., 2019. The development and present status of the SOP model of associative learning. *Q. J. Exp. Psychol.* 72 (2), 346–374. <https://doi.org/10.1177/1747021818777074>.
- Wagner, A.R., 1976. Priming in STM: an information-processing mechanism for self-generated or retrieval-generated depression in performance. *Habituation: Perspect. Child Dev. Anim. Behav. Neurophysiol.* 95–128.
- Wagner, A.R., Brandon, S.E., Klein, S.B., Mowrer, R.R., 1989. Evolution of a structured connectionist model of Pavlovian conditioning (AESOP). *Contemporary Learning Theories: Pavlovian Conditioning and the Status of Traditional Learning Theory*, pp. 149–189.
- Wagner, A.R., 1979. Habituation and memory. In: Dickinson, A., Boakes, R.A. (Eds.), *Mechanisms of Learning and Motivation: A Memorial Volume for Jerzy Konorski*. Erlbaum, Hillsdale, NJ, pp. 53–82.
- Wagner, A.R., 1981. SOP: a model of automatic memory processing in animal behavior. *Inform. Process. Anim.: Mem. Mech.* 5–47 (January 1981).
- Whitlow, J.W.Jr., Wagner, A.R., 1984. Memory and habituation. In: Peeke, H.V.S., Petrinovich, L. (Eds.), *Habituation, sensitization, and behavior*. Academic Press, New York, pp. 103–153.
- Wyers, E.J., Peeke, H.V.S., Herz, M.J., 1973. Habituation and related phenomena in invertebrates. *Habituation. Vol. 1. Behavioral Studies*. Academic Press, New York, pp. 1–58.
- Yu, A.J., Rankin, C.H., 2017. In: Byrne, J.H. (Ed.), *The Oxford Handbook Invertebrate Neurobiology*. Oxford University Press, Oxford.

## **Capítulo VI: Discusión general y conclusiones**

This chapter presents the discussion of the results obtained in the studies described in this thesis. Taking into account the objectives shown in the first chapter, we will analyse their degree of achievement, as well as the new future directions suggested by the results of these studies.

The first of these objectives was to review the studies carried out on the phenomenon of habituation with earthworms. This review showed a selection of stimuli historically used in literature in addition to the procedures that have been effective in the study of the cognition of this animal. On this basis, the paradigms that we would use for our study were designed and, as it has been proved, they can function as a common paradigm in the study of habituation in the earthworm.

The second objective of this thesis was to explore the behavioural characteristics of habituation in the earthworm using a single paradigm especially designed for this task. In the present subject, three stimuli were habituated: a light emitted by a lamp at a height of 24 cm, a vibration produced by motors coupled to a methacrylate platform, and a puff of odour administered by means of a syringe with a filter paper to which a drop of rose or vanilla essence was poured. The animals have shown a decrease in the level of the retraction response with the mere presentation of the stimuli attending the intervals between trials of thirty and sixty seconds (Chapter 2), a spontaneous recovery of the habitual response after different periods of time (Chapter 3), a generalization of the habituation of light to vibration and this, in turn, to smell (Chapter 4) and, finally, a contextual specificity of habituation (Chapter 5).

The second chapter deals with the parametric studies necessary to lay the foundations for the study of the different characteristics of habituation. The studies carried out for this chapter confirmed the first of the characteristics of the phenomenon, the decrease in the response throughout the training due to the mere presentation of the

stimulus. Showing this reduction in response to the three stimuli evidenced their effectiveness as elements perceived by worms and even that they could be part of more complex designs such as classical conditioning or blocking. This same chapter also presents the result of training the subjects before the same stimulus, but with a different inter trial intervals (ITIs). According to the literature, we should have found that a training with a short ITI would imply a faster habituation of the response and a greater spontaneous recovery than if it were compared with a longer ITI. However, the data found in the laboratory and reported in this thesis show that this characteristic is not observed with the parameters used, although perhaps it could be fulfilled with more differentiated intervals.

Regarding the results obtained in the third chapter, there is evidence of another of the characteristics of habituation: spontaneous recovery. In these experiments, a vibration and a light were habituated. After this, different periods of time were waited to present the stimuli again and analyse if the habituated response was recovered and to what extent. The results suggest that the worms developed a retention of habituation that disappeared the longer the period studied, showing a greater recovery of the response rate in the long periods compared to the short ones. With regard to the light, the recovery was complete even when the test was carried out 15 minutes after the end of habituation, a fact that could explain the high biological relevance of the light stimulus for the survival of the worm.

The third chapter of this thesis corresponds to the study of the generalization of the habituation of one stimulus to another. According to this theory, the habituation of a stimulus is generalized to a new one, showing a lower response rate to the later compared to the response rate if a previous habituation had not been presented. Rankin et al. (2009) include in this characteristic that, to carry out the generalization of this habituation to

another, this should be of a similar stimulating modality. In the chapter, reference is made to this differentiation since we would be talking about an inter-stimulus generalization in the case of being two stimuli of different sensory modality, and an intra-stimulus generalization if they were stimuli of the same modality. The experiments carried out suggested a generalization of the habituation of a light stimulus to a vibratory one, which, in turn, generalizes to an odorous stimulus. These results are in agreement with the hypothesis that habituation can be generalized from one stimulus to another of different sensory modalities, although this statement must be taken carefully since the intensity and relevance of the stimuli used could be playing a key role in the veracity of this conclusion.

Finally, the fifth chapter shows a clear effect of specificity of the habituation of a stimulus. According to the literature, the context would not be playing a key role in a short-term habituation. This would change if we talked about a long-term habituation design where it would be used as a conditioned stimulus or predictor of the stimulus that is intended to be habituated. The data presented in this chapter show that this importance of context is already in force even in a short-term habituation design, disappearing when the subjects are transferred to a different context. The difficulty underlying the explanation of this fact lies in the fact that Wagner's theory suggests the formation of associative ties between the context and the stimulus to be habituated. To study this explanation, we carried out another experiment where we applied two designs that would inhibit the formation of this association: latent inhibition and extinction. The results obtained show the existence of the establishment of an association in the case of extinction. When this presumed relationship is extinguished through exposure to the context, a recovery of the habituated response occurs. However, in the latent inhibition design, which consisted of a pre-exposure of the context only before the habituation

phase, this recovery of the response was not observed. In the chapter, possible explanations for this fact are discussed. We propose that both mechanisms of habituation (self-generated priming and generated priming) were available during the training. The use of them would depend on the pre-exposure to the context. Hall and Rodriguez (2017) propose that when the context is pre-exposed, its salience decays, pairing the possible association with the stimuli. However, when there is no pre-exposure, habituation would be produced by the establishment of the association between the context and the stimulus. This association would be degraded by exposure to the context after habituation (extinction).

## **Conclusions**

1. The earthworm is a valid subject for the behavioural study of habituation and all its characteristics.
2. The paradigm developed in the present thesis allows the study of the different characteristics of habituation in the earthworm, being even possible its use for various more complex learning phenomena such as associative learning, competition among stimuli, etc.
3. The characteristics of habituation: spontaneous recovery, decreased response and generalization of habituation in earthworms have been evidenced in this work, not being possible to find an effect of the interval between trials.
4. There is a contextual specificity of short-term habituation that appears to have both associative and non-associative components according to the results obtained in the extinction and latent inhibition experiments.

## Capítulo VII. Resumen Extendido

The ability of an organism to adapt to the natural environment in which it lives has allowed the survival of species throughout the years. This adaptation was already mentioned in the 19th century with the publication of Darwin's *Origin of Species* (1859). In order to get adapted, the organism must first come into contact with the stimuli present in its environment through the sensory receptors it possesses. Based on this, it will be able to build knowledge about the environment surrounding it, allowing it to detect stimuli that may be beneficial, harmless or dangerous and either causing a response or not to them. This first learning is the object of study of this thesis, habituation, which is defined as the decrease in the subject's response to a stimulus that is presented repeatedly and that cannot be explained in terms of fatigue or sensorial adaptation (Rankin et al., 2009; Thompson, 2009; Thompson & Spencer, 1966). This learning is considered one of the most basic along with sensitization, which is translated as an increase in response to the repeated presentation of a stimulus. Although habituation is present in all animal species (Perry, Baron & Cheng, 2013) not all of them would habituate in the same extent to one stimulus. For example, in the case of a light, it can attract a mosquito while, on the contrary, it causes an earthworm to flee.

Despite being considered the simplest learning together with sensitization, habituation has provoked a great deal of research both at the behavioural level and the neural bases that underlie it. In addition, the relevance of the study of learning in invertebrates to understand the origin and phylogenetic bases of cognition has also been highlighted recently (Álvares, Loy & Prados, 2017; Loy et al., 2021). An example of this is the work by Menzel and Benjamin (2013), where the main advances in the study of the neural bases of learning and memory in different models of invertebrate animals (nematodes, molluscs, crustaceans and insects) are presented. However, the studies that show the complexity of the multiple mechanisms involved in it must be complemented with the description of its characteristics at the behavioural level in order to understand its adaptive value (McDiarmind, Yu & Rankin, 2019). These

characteristics have been defined and studied (Rankin et al. 2009, Thompson & Spencer, 1966):

- i) *Habituation* is defined as the decrease in the level of response or intensity of the response to the repeated presentation of the stimulus. This decrease shows a negative exponential course in relation to the number of presentations of the stimulus.
- ii) *Spontaneous recovery*: if the presentation of the stimulus stops, the response will appear after a while.
- iii) *Potentiation of the habituation*: if several alternating cycles of habituation and spontaneous recovery are carried out, the speed of habituation will be greater.
- iv) *Inter trial interval effect*: a greater speed in the presentation of the stimulation leads to a faster and/or more pronounced habituation.
- v) *Effect of intensity*: habituation will be faster and/or more pronounced with low intensity stimuli than against strong stimuli.
- vi) *Overhabituation*: recovery of the response will be less if training is continued even after an asymptotic level of the response has been achieved.
- vii) *Generalization*: the habituation of a certain stimulus can be generalized to another different stimulus.
- viii) *Dishabituation*: the presentation of a new stimulus (generally stronger) results in the recovery of the habituated response to the original stimulus.
- ix) *Habituation of dishabituation*: the repeated presentation of the dishabituating stimulus to interrupt habituation produces a decrease in the effect of the aforementioned dishabituating agent.

- x) *Long-term habituation*: some experimental paradigms of habituation whose sessions are spaced out in time make the drop in response last for hours, days or weeks. This persistence of aspects of habituation is called long-term habituation.

All these characteristics have been studied in the literature, giving rise to theories that try to explain habituation. Among the most accepted ones it is possible to find the Wagner's "Sometimes Opponent Processes" (SOP) theory (1981), the Dual Processing theory (Groves & Thompson, 1970) and the Sokolov's theory (1963).

The first one establishes that the representation of any stimulus comprises a large set of elements that can be located in one of the three states of activity described in the theory: Inactivity (I), primary activity (A1) and secondary activity (A2). The state of primary activity (A1) is the one that represents the total use of the subject's attentional resources. The secondary activation state (A2) is where elements of a stimulus that is no longer present decay, but are preserved in recent memory or a peripheral point of attention. Finally, the state of inactivity (I) is where the elements of the stimulus located in A2 decay, being stored in a long-term memory with unlimited capacity.

According to Wagner (1981), habituation occurs when the elements of a stimulus are represented in A1, producing an observable response on the subject. Once the stimulus ceases, these elements decay to A2 and remain dormant for a short time before decaying back to the quiescent state I. If the stimulus elements have decayed to I, when the stimulus is presented again, they will be brought to A1 and would elicit the subject's response. However, short-term habituation would take place when the stimulus elements have not yet decayed to state I, but remain instead in short-term memory in A2. If the stimulus is presented while its elements are still being processed at A2, the subject will not show an observable response. If we faced a

case of long-term habituation, Wagner affirms that the context would come to play an important role. According to his theory, when the subject is in the context where habituation learning took place, it would function as an associated stimulus, recovering the elements of the habituated stimulus from I to A2, meaning that when the stimulus is presented again, response does not occur.

The second theory (Groves and Thompson, 1970) divides the nervous system into two subsystems: "stimulus-response system" and the "state system". The first of these subsystems represents the nervous connection from the part in charge of perceiving the stimulus to the projection of the response. This pathway is called the reflex arc or stimulus-response (S-R) pathway and, as it is repeatedly activated by the same stimulus, it simplifies the processing of this pathway until it does not show a response (habituation). Said stimulus must always be the same, showing a specificity in its habituation. If a new one were presented, said reflex arc would initiate the response from an initial point. The second subsystem refers to the level of activation of the subject, increasing its response as stimuli are presented, although they are not always the same, which gives rise to sensitization. The behaviour observed will be the result of the combination of both processes of habituation and sensitization.

Finally, Sokolov's theory (1963) assumes that the repeated presentation of a stimulus leads to the formation of a mental model of it. Furthermore, it also describes an amplifying system that regulates the observable response. When the stimulus is presented, it is compared with the contents of the model of that stimulus in memory. If there is a match, the activation system ("amplifying system") will be inhibited and the response will not be evoked, showing what we know as habituation. In the event that the stimulus presented does not coincide with the model formed, a response produced by the activation system will be generated.

In this thesis we have proceeded to study these characteristics of habituation with a new subject such as the earthworm. Although it is true that it is possible to find examples of studies

on some of these animals' characteristics, the novelty of this work is the design of a single experimental paradigm that is used to study all of them. To this end, it was necessary to begin by describing the stimuli and parameters that had been used in the literature and to evaluate their efficacy. The results found in this thesis are the following:

## *Chapter 2*

In chapter two, the study of these stimuli is reflected, stating that the worms react both to a cold white light produced by a 24 centimetres high lamp ( $\pm 1600$  lx), a vibration produced by two motors coupled to a methacrylate base and an odour administered by means of a syringe where a filter paper with rose essence was glued to the plunger.

The hypothesis from which we start is that there will be a gradual decrease in the retraction response of the worm's head as training progresses. This training consists of the presentation of light, vibration or smell. In addition, we expect to find that using a shorter inter trial interval will result in faster habituation.

The results indicate that the animals showed a decrease in the level of retraction response with the mere presentation of the stimuli attending the intervals between trials of thirty and sixty seconds without finding differences in habituation between both intervals.

## *Chapter 3*

The objective of these studies was to evaluate the recovery of the retraction response at 60 minutes, 12 hours, 24 hours and 48 hours after finishing vibration habituation training with an inter-trial interval of thirty seconds.

A spontaneous recovery of the habituated response was shown at 24 hours and 48 hours after finishing the training, indicating that it was recovering as the expected period was longer after finishing the habituation.

The objective of the second study was to explore the progressive recovery of the response to light as the time elapsed between the end of habituation and the recovery test was extended.

The results indicate that after 15 minutes from the end of the habituation, the total recovery of the response was already present.

#### *Chapter 4*

The hypothesis of this chapter was to explore the generalization characteristic of habituation between stimuli, using both a paradigm with stimuli of the same sensory modality and with different modalities.

A generalization of the habituation of light to vibration was found, but not of vibration to light. This fact could be explained by the difference in the response rate to both stimuli, so a second experiment was carried out with two stimuli with a similar response rate: vibration and smell.

The objective of the second experiment was to analyze whether a generalization of habituation from one stimulus to another would occur.

The results indicated that there was no generalization between both stimuli, which suggests that between two stimuli that produce a similar response level, habituation is specific to each stimulus.

#### *Chapter 5*

The goal of this chapter was to explore the contextual specificity feature of habituation. In order to do this, a paradigm was used where the subject was used to an odorous context and tested in a different context.

The results showed that the response to a stimulus (light) remained habituated when the

context of habituation and the test were the same, but recovered when the context of both phases was different. This study was replicated with a within-subject design whose data matched the between-group design.

The data presented in this chapter show that this importance of the context is already in force even in a short-term habituation design, disappearing when the subjects are transferred to a different context. The difficulty underlying this explanation lies in the fact that Wagner's theory suggests the formation of associative links between the context and the stimulus to habituate. For this hypothesis, we performed another experiment where we applied two designs that would inhibit the formation of this association: latent inhibition and extinction. The results obtained show the existence of the establishment of said association in the case of extinction, since when that presumed relationship is extinguished through exposure to the context, a recovery of the habituated response occurs. However, in the latent inhibition design, which consisted of context pre-exposure only before the habituation phase, this response recovery was not observed. In the chapter, possible explanations for this fact are discussed, concluding that, in the case of pre-exposure of the context, its salience would be decaying, making it more difficult to associate with the habituated stimulus. On the contrary, when there is no pre-exposure, habituation would be produced by the establishment of the association between the context and the stimulus. This association would be degraded by exposure to the context after habituation (extinction).

## Referencias

- Álvarez, B., Loy, I. y Prados, J. (2017). Evolución y distribución del aprendizaje en el árbol filogenético. *Estudios Contemporáneos en Cognición Comparada*, 251-315. México: Cromo Editores.
- Campos, J. J. (2004). La evolución de la inteligencia. En *Miscelánea en homenaje a Emiliano Aguirre*. Vol. III Paleontología. Eds. E: Banquedano, S. Rubio Jara pp. 102-119.
- Darwin, C. (1859). *El Origen de las Especies por Medio de la Selección Natural o la Preservación de las Razas Favorecidas en la Lucha por la Vida*. Londres, Inglaterra.
- Groves, P. M., y Thompson, R. F. (1970). Habituation: a dual-process theory. *Psychological review*, 77(5), 419–450. <https://doi.org/10.1037/h0029810>.
- Loy, I., Carnero-Sierra, S., Acebes, F., Muñoz-Moreno, J., Muñoz-Diez, C. y Sánchez-González, J.-C. (2021). Where association ends. A review of associative learning in invertebrates, plants and protista, and a reflection on its limits. *Journal of Experimental Psychology: Animal Learning and Cognition*, 47(3), 234–251. <https://doi.org/10.1037/xan0000306>
- McDiarmid, T. A., Yu, A. J., y Rankin, C. H. (2019). Habituation Is More Than Learning to Ignore: Multiple Mechanisms Serve to Facilitate Shifts in Behavioral Strategy. *BioEssays*, 41(9), 1–10. <https://doi.org/10.1002/bies.201900077>
- Menzel, R., y Benjamin, P. (Eds.). (2013). *Invertebrate learning and memory*. Academic Press.
- Perry, C. J., Barron, A. B., y Cheng, K. (2013). Invertebrate learning and cognition: relating phenomena to neural substrate. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 4(5), 561-582. <https://doi.org/10.1002/wcs.1248>

- Rankin, C.H, Abrams, T., Barry, R.J., Bhatnagar, S., Clayton, D.F., Colombo, J., Coppola, G., Geyes, M.A., Glanzman, D.L., Marsland, S., McSweeney, F.K., Wilson, d.A., Wu, C.F., y Thompson, R.F. (2009). Habituation revised: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92 (2), 135-138. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>
- Sokolov, E. N. (1963). Higher nervous functions; the orienting reflex. *Annual Review of Physiology*, 25, 545–580. <http://doi.org/10.1146/annurev.ph.25.030163.002553>
- Thompson, R. F. (2009). Habituation: A history. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.011>
- Thompson, R. F., y Spencer, W. A. (1966). Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological review*, 73(1), 16. <https://doi.org/10.1037/h0022681>
- Wagner, A. R. (1981). SOP: A model of automatic memory processing in animal behavior. *Information Processing in Animals: Memory Mechanisms*, 1981, 5–47.