

*Experimental model in amphibians: unidimensionality of the processing of appetitive and aversive stimuli in associative learning**

Rubén N. Muzio**
Martín M. Puddington***

* Grupo de Aprendizaje y Cognición Comparada, Laboratorio de Biología del Comportamiento, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). Este manuscrito se realizó gracias a la financiación del subsidio UBACYT-P0068BA de la Universidad de Buenos Aires y del subsidio PICT 4300 del FONCYT-ANPCYT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) Argentina, dirigidos por Rubén N. Muzio.

** Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Psicología, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina. Correspondencia: rmuzio@gmail.com

*** Doctor en Psicología. Facultad de Psicología, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina. Correspondencia: mmpuddington@gmail.com

Modelo experimental en anfibios: unidimensionalidad del procesamiento de estímulos apetitivos y aversivos en el aprendizaje asociativo*

Cómo citar este artículo: Muzio, R. N., & Puddington, M. M. (2018). Modelo experimental en anfibios: unidimensionalidad del procesamiento de estímulos apetitivos y aversivos en el aprendizaje asociativo. *Tesis Psicológica*, 13(2), 12-33. <https://doi.org/10.37511/tesis.v13n2a2>

Recibido: 21 abril 2018
Revisado: 21 abril 2018
Aprobado: 11 diciembre 2018

ABSTRACT

In classical conditioning, an animal is exposed to a neutral stimulus (conditioned stimulus) followed by an appetitive or aversive stimulus (unconditioned stimulus). With successive repetitions of this association, the animal will respond to the neutral stimulus as if it were the unconditioned stimulus. This phenomenon has been widely explored in different zoological classes, covering animal species ranging from mollusks to humans. In most cases, appetitive and aversive unconditioned stimuli correspond to different sensory pathways. For example, the appetitive stimulus typically used is food and the typical aversive stimulus is electric shock. Thus one type of stimulus will excite the receptors related to the sense of taste, while the other type will do so mostly on the tactile and nociceptive pathways. Studies on amphibians, particularly the terrestrial toad, reproduce to a large extent the findings in other animal species, but they have characteristics that make them unique by having electrolyte receptors in their skin that are involved in the regulation of their body's hydrosaline balance. A toad exposed to a slightly hypertonic saline solution (concentration less than 250 mM NaCl) gains weight and exhibits approximation behaviors. Whereas if it takes contact with a highly hypertonic saline solution (concentration higher than 400 mM NaCl), it loses weight and exhibits escape behaviors. Thus, the same stimulus (a saline solution of NaCl), can act as an appetitive or aversive stimulus depending on its concentration. This particularity has been called unidimensionality of motivational stimuli. In the present work we describe the procedures and review the results of associative learning studies in toads, highlighting the use of this experimental model for the study of the possible neural mechanisms involved in the processing of appetitive and aversive environmental signals.

Keywords: Appetitive stimuli, aversive stimuli, unidimensionality, amphibians, terrestrial toad *Rhinella arenarum*.

RESUMEN

En el condicionamiento clásico, un animal es expuesto a un estímulo neutro (estímulo condicionado) seguido de un estímulo apetitivo o aversivo (estímulo incondicionado). Con sucesivas repeticiones de esta asociación, el animal responderá frente al estímulo neutro como si se tratara del estímulo incondicionado. Este fenómeno ha sido ampliamente explorado en distintas clases zoológicas; desde moluscos hasta humanos. En la mayoría de los casos, los estímulos incondicionados apetitivos y aversivos corresponden a vías sensoriales diferentes: el estímulo apetitivo típicamente utilizado es la comida y excitará mayormente los receptores relacionados con el sentido del gusto; el estímulo aversivo típico es la descarga eléctrica excitando las vías táctiles y nociceptivas. Los estudios en anfibios, en particular el sapo terrestre, reproducen en buena medida los hallazgos en otras especies animales, pero tienen características que los hacen únicos al poseer receptores a electrolitos en su piel que intervienen en la regulación del balance hidrosalino de su cuerpo. Un sapo expuesto a una solución salina levemente hipertónica (concentración menor a 250 mM de NaCl), gana peso y exhibe conductas de aproximación, al contrario, si la solución salina es altamente hipertónica (concentración superior a 400 mM de NaCl), pierde peso y exhibe conductas de escape. De esta forma, un mismo estímulo (solución salina de NaCl), actúa como estímulo apetitivo o aversivo dependiendo de su concentración. Esta particularidad ha sido denominada unidimensionalidad de los estímulos motivacionales. El presente trabajo describe los procedimientos y revisa los resultados de estudios de aprendizaje asociativo en sapos, resaltando el uso de este modelo experimental para el estudio de los posibles mecanismos neurales implicados en el procesamiento de señales ambientales apetitivas y aversivas.

Palabras clave: Estímulos apetitivos, estímulos aversivos, unidimensionalidad, anfibios, sapo terrestre *Rhinella arenarum*.

Introducción

El estudio del aprendizaje asociativo en psicología comparada requiere encontrar los estímulos y las condiciones experimentales adecuadas que permitan maximizar la expresión de los fenómenos cognitivos de interés en la especie bajo análisis. Muchas veces, al trasladar los estímulos que han dado buenos resultados en una especie en forma directa a otra, no se logra el efecto buscado, esto sucede porque las especies difieren en sus capacidades sensoriales o en sus sistemas motivacionales.

En el caso particular de los anfibios, la búsqueda de estímulos ecológicamente relevantes para la motivación de la conducta, ha desembocado en una preparación única caracterizada por la unidimensionalidad de estímulos, usando soluciones acuosas con distinto grado de salinidad como reforzadores o supresores de conductas (e.g., Daneri, Papini & Muzio, 2007; Muzio, Pistone, Iurman, Rinaldi, Sirani & Papini, 2011). Esta característica unidimensional de las soluciones salinas ha permitido categorizarlas bien sea como estímulos apetitivos o estímulos aversivos. Así, esta propiedad ha sido utilizada en todos los estudios llevados adelante en nuestro laboratorio y será descripta en detalle a lo largo del presente trabajo.

Características generales de los anfibios y su contexto filogenético: los anfibios habitan la tierra desde hace unos 400 millones de años cuando aparecieron las primeras especies de vertebrados terrestres, que al igual que los actuales anfibios dependían del agua para su reproducción. Los anfibios de la actualidad conservan un cerebro cuyo telencéfalo, al igual que el de sus antepasados, se compone principalmente de estructuras homólogas a las subcorticales del sistema límbico de mamíferos. Por esta razón, el estudio de las especies de anfibios vivientes es clave para entender la evolución del sistema nervioso y las

consecuencias que pudo tener sobre la cognición la colonización de la tierra por parte de los vertebrados (Bingman & Muzio, 2017; Muzio, 2013; Striedter, 2016).

La clase Amphibia está compuesta por tres grupos de anfibios actuales. Las salamandras y tritones pertenecen al orden *Urodela o Caudata*, ya que poseen cola. Los sapos y ranas pertenecen a un orden muy variado denominado Anura (este nombre refiere a la falta de cola; es importante señalar al lector no especializado que la distinción entre sapos y ranas no tiene implicancia taxonómica). Finalmente, las cecilias pertenecen al orden Gymnophiona o Apoda, ya que no poseen patas. Todos los grupos de anfibios comparten ciertas características comunes, pero la más destacada es la ausencia de escamas y una piel altamente permeable que permite el intercambio de gases y de fluidos con el medio que los rodea (Duellman & Trueb, 1994; Pough, Janis & Heiser, 1999). La piel de anfibios adultos consta de una epidermis y una dermis subyacente con dos tipos de glándulas: glándulas mucosas (generalmente relacionadas con la respiración y el equilibrio hídrico) y glándulas granulares (también conocidas como serosas o venenosas, relacionadas con mecanismos de defensa) (Duellman & Trueb, 1994; Regueira, Dávila & Hermida, 2016). En particular, la característica de los anfibios de poseer una piel con alta permeabilidad es especialmente relevante a la hora de desarrollar diseños experimentales para el estudio de su comportamiento y las bases neurales asociadas (Puddington & Muzio, 2013).

Los anfibios en la Psicología Comparada: a pesar de la importancia de los anfibios para el área de la psicología comparada, el comportamiento en relación con la actividad del sistema nervioso ha sido escasamente estudiado en este grupo. La mayoría de los estudios de este campo fueron realizados en anuros (sapos) en trabajos desarrollados en nuestro laboratorio (para una

revisión ver Muzio, 1999, 2013; Muzio, Daneri & Sotelo, 2017).

En términos generales, el uso de este modelo animal para investigar distintos aspectos de la evolución del comportamiento y sus bases neurales tiene la ventaja adicional de poder examinar cuáles son los circuitos neurales básicos que subyacen a una conducta determinada, debido que su cerebro no posee neocorteza (Muzio, 2013).

En particular, en este trabajo se describirá el modelo experimental del sapo terrestre *Rhinella arenarum* en el estudio del aprendizaje asociativo en anfibios, tanto en procedimientos apetitivos como aversivos, y sus bases neurales. Para ello se detallarán las diferentes situaciones y procedimientos empleados hasta el momento para el estudio de distintas habilidades cognitivas en esta especie (Puddington & Muzio, 2013; Puddington, Daneri, Papini & Muzio, 2016; Puddington, Papini & Muzio, 2018a, 2018b).

Selección de estímulos adecuados para el desarrollo de un modelo experimental de estudio del aprendizaje asociativo en anfibios

Haciendo una adecuada selección de estímulos y utilizando el modelo experimental del sapo terrestre *Rhinella arenarum*, hemos desarrollado una serie experimental de estudio de diferentes habilidades cognitivas en anfibios, incluyendo: (i) condiciones apetitivas, como el aprendizaje espacial en distintas arenas experimentales (para una revisión, ver Muzio, Daneri & Sotelo, 2017, en prensa) y el aprendizaje en una situación de corredor recto (e.g., Muzio, Ruetti & Papini 2006; Muzio, Segura & Papini, 1992; Puddington, Papini & Muzio, 2013, 2018a); y (ii) condiciones aversivas, como el aprendizaje de escape y evitación activa (Daneri, Papini &

Muzio, 2007) y la evitación pasiva (Puddington, Daneri, Papini & Muzio, 2016).

Motivación aplicada a la implementación de los procedimientos de entrenamiento: en mamíferos, para lograr que el animal adquiriera una respuesta consistente, se suele implementar previo al entrenamiento un protocolo de privación al alimento o líquido, que motiva al sujeto a buscar ese incentivo durante la adquisición de la respuesta (Mackintosh, 1974). Como veremos más adelante, en los mamíferos generalmente se practica un ayuno de alimento que precede a los ensayos de entrenamiento, estos protocolos habitualmente se efectúan hasta que el animal alcanza el 80-85% del peso que tenía con libre disponibilidad de comida (alimento ad libitum), proceso que se desarrolla en un período aproximado de una semana.

Dado que los anfibios son animales heterotermos, sus requerimientos metabólicos son mucho menores que en los mamíferos. Por esta razón, pueden permanecer sin alimentarse por largos períodos de tiempo y con una relativa poca variación de su peso corporal (Duellman & Trueb, 1994). Esto impide tener un control riguroso de las condiciones de motivación por alimento en estos animales (imposibilitando también tener certeza acerca de las variaciones del estado nutricional en que se encuentran los sujetos experimentales).

Los anfibios son en cambio extremadamente sensibles a la falta de agua. La piel de los anfibios es altamente permeable (mucho más que la de los mamíferos), aunque han desarrollado diferentes adaptaciones en relación con la economía hidrosalina, como la presencia de glándulas mucosas y una alta vascularización a fin de evitar la deshidratación y maximizar la absorción de agua (Christensen, 1974; Duellman & Trueb, 1994; Lascano, Segura &

Ferrari, 1971; Llinás & Precht, 1976; Whitear, 1977). Los anfibios no ingieren agua por la boca (Bentley, 1966), su principal vía de ganancia es a través de la piel, fundamentalmente en la región ventral posterior denominada *parche pélvico* (Christensen, 1974; Reboreda, Muzio, Viñas & Segura, 1991; Ruibal, 1962). Sin embargo, la piel funciona al mismo tiempo como la vía principal por la que los anfibios pierden agua (Shoemaker & Nagy, 1977), con la consiguiente caída de peso corporal por evaporación y el aumento del riesgo de supervivencia para estos animales (Duellman & Trueb, 1994). Así, al colocar a un sujeto en una jaula sin acceso a agua, se deshidrata rápidamente con el contacto de su piel con el aire, lo que se traduce en una pérdida de peso (e.g., Muzio, Segura & Papini, 1992). Debido a estas razones, el uso del agua como estímulo apetitivo (en lugar de alimento sólido) en animales parcialmente deshidratados, ha permitido avanzar enormemente en el estudio del aprendizaje en anfibios, brindándole al investigador científico un mayor control de las condiciones motivacionales de los sujetos experimentales (Muzio, 1999; 2013).

En resumen, mientras los anfibios pueden tolerar restricciones en la ingesta de comida (en tanto tengan reservas energéticas corporales), dependen diariamente del acceso al agua para lograr un balance fisiológico-hidrosalino (Muzio 1999, 2013). Por lo tanto, esta serie de características adaptativas que presentan los anfibios a nivel fisiológico hacen del agua un factor limitante mayor que la comida.

Estímulos apetitivos: el estímulo apetitivo por excelencia en mamíferos es la comida. El potente efecto de este estímulo sobre el aprendizaje se ve reflejado en el condicionamiento clásico, en el que un animal es expuesto a un estímulo neutro (EC - estímulo condicionado) seguido de un estímulo apetitivo o aversivo (EI - estímulo incondicionado). Con sucesivas repeticiones de

esta asociación, el animal responderá frente al estímulo neutro como si se tratara del estímulo incondicionado. El ejemplo tradicional de la psicología experimental es el experimento de condicionamiento clásico en perros realizado por Pavlov (1927): sometía a los animales a sucesivos apareamientos de una luz o un tono con comida, obteniendo como resultado después de sucesivas repeticiones la salivación de los sujetos sólo con la presentación de la luz o el tono. Con el objeto de analizar qué regiones cerebrales estaban comprometidas en este tipo de aprendizaje, en un estudio más reciente en ratas, Cole, Stone y Petrovich (2017) analizaron el efecto de lesiones en el striatum dorsomedial sobre el condicionamiento clásico apetitivo, para ello utilizaron como estímulo apetitivo la presentación de comida junto con claves sensoriales. Los resultados mostraron que las lesiones del striatum dorsomedial retardaron el aprendizaje clave-comida, sugiriendo que esta área cerebral está involucrada cuando se forman las asociaciones iniciales. Algo parecido ocurre con el condicionamiento operante, donde también el striatum dorsomedial ha sido implicado en la adquisición del aprendizaje instrumental (Corbit & Janak, 2010).

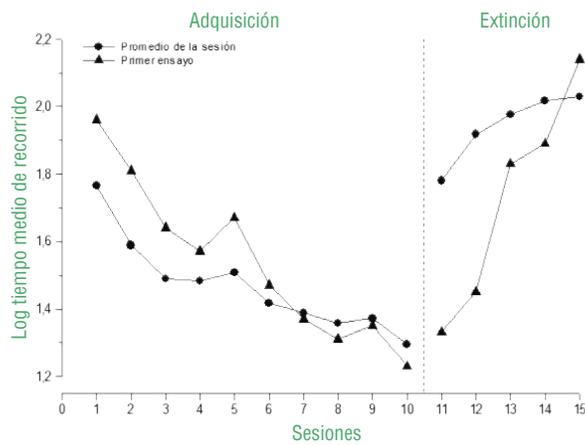
Como se mencionó anteriormente, en contraste con lo que sucede en mamíferos, en los anfibios es el agua -no la comida- el estímulo apetitivo que ha dado los mejores resultados en el estudio del aprendizaje asociativo. Existen, sin embargo, algunos ejemplos con el uso de alimento sólido como recompensa. Este es el caso de los estudios realizados en larvas de anfibios urodelos, como las salamandras (*Ambystoma paroticum*), en el que se utilizaron gusanos para entrenarlas a subir a la superficie de un tanque ante la administración de un estímulo señal (Moore & Welch, 1940). En otra especie de urodelo, como el tritón (*Triturus cristatus*), también se utilizaron gusanos para entrenar larvas y adultos a discriminar entre dos estímulos que tenían distinta forma (Hershkowitz & Samuel, 1973). En este caso,

aunque demostraron que las larvas aprendían y que dicha discriminación era retenida después de la metamorfosis, los adultos sin experiencia previa no aprendían esa discriminación.

La utilización efectiva del agua como estímulo apetitivo en anfibios fue sistemáticamente desarrollada en procedimientos de condicionamiento operante en nuestro laboratorio. Uno de los primeros estudios realizados incluyó el análisis

del aprendizaje en una situación de corredor recto, usando sapos de la especie *Rhinella arenarum* parcialmente deshidratados y agua como recompensa (Muzio, Segura & Papini, 1992). En dicho estudio, los sujetos mostraron distintas habilidades relacionadas con el aprendizaje asociativo, tales como la adquisición, la extinción, la recuperación instantánea de la respuesta de recorrido y el efecto subsiguiente al reforzador (ver Figuras 1 y 2).

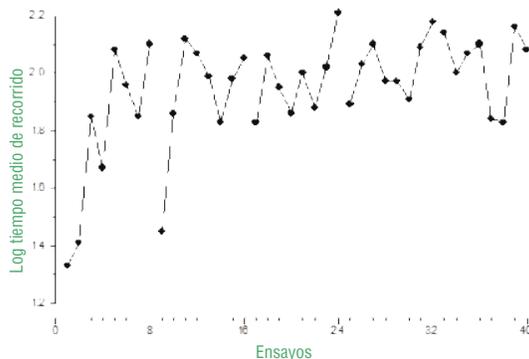
Figura 1. Vista del corredor recto



Nota: Izq: Vista del corredor recto (mostrando el espejo de observación utilizado en el entrenamiento). Der: Tiempo de recorrido (Log s) de los sapos durante la adquisición (sesiones 1 a 10) y la extinción (sesiones 11 a 15). Cada punto representa la media del grupo en una sesión diaria de ocho ensayos cada una (círculos) o sólo en el primer ensayo (triángulos).

Fuente: Adaptado de Muzio, Segura & Papini, 1992

Figura 2. Tiempo de recorrido de los sapos

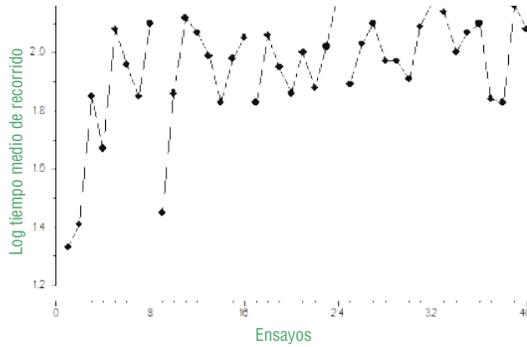


Nota: Tiempo de recorrido (Log s) de los sapos ensayo por ensayo durante las cinco sesiones de extinción.

Fuente: Adaptado de Muzio, Segura & Papini, 1992

En cuanto a las bases neurales asociadas, se estudió la participación del pallium medial de los anfibios, que es considerado homólogo al hipocampo de los mamíferos (Muzio, 2013; Northcutt & Ronan, 1992). Específicamente, el efecto de la lesión del pallium medial sobre la adquisición de la respuesta en la situación del corredor recto (Muzio, Segura & Papini, 1993). En este caso, la lesión del pallium medial no produjo efectos sobre la adquisición de la respuesta, pero sí aumentó la resistencia a la extinción cuando los animales fueron cambiados a una serie continua de ensayos no reforzados (Figura 3).

Figura 3. Tiempo de recorrido de los tres grupos de sapos entrenados



Nota: Tiempo de recorrido (Log s) de los tres grupos de sapos entrenados durante la adquisición (sesiones 1 a 12) y la extinción (sesiones 13 a 24), luego de uno de los siguientes tratamientos: PM (lesión bilateral del pallium medial), OS (operación simulada) o IN (animales intactos). Cada punto representa el desempeño del grupo en una sesión diaria.

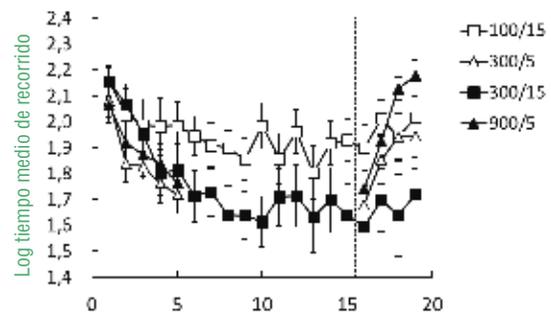
Fuente: Adaptado de Muzio, Segura & Papini, 1993

De esta forma, nuestros experimentos con lesiones del pallium medial en anfibios muestran que las respuestas dominantes no son afectadas durante la adquisición, pero que son muy resistentes a modificarse aún después de cambios abruptos en las condiciones de reforzamiento. Estos resultados son los mismos que se han obtenido en ratas hipocampectomizadas entrenadas bajo condiciones análogas (Jarrard & Isaacson, 1965; Jarrard, Isaacson & Wickelgren, 1964; Rawlins, Feldon & Gray, 1980; Winocur & Mills, 1969), lo cual sugiere que el pallium medial de los anfibios y el hipocampo de los mamíferos comparten ciertas propiedades funcionales, como su papel en la inhibición de respuestas previamente aprendidas.

En cuanto a las características del procedimiento experimental empleado, este conjunto de estudios pioneros demostraron la efectividad del agua como recompensa en el entrenamiento de anfibios en general (en nuestro caso, el sapo terrestre *Rhinella arenarum*), permitiendo analizar por primera vez una amplia variedad de fenómenos de aprendizaje en este grupo y sus bases neurales (Muzio, 1999).

Otro aspecto interesante derivado del uso del agua como estímulo apetitivo en anfibios, surge de analizar el balance entre la magnitud de la recompensa y el tiempo de reforzamiento. En un trabajo reciente, Puddington, Papini y Muzio (2018a) realizaron un experimento para discriminar los factores que afectaban la extinción de una conducta aprendida en sapos, utilizando un diseño factorial en aras de evaluar por separado el efecto de la magnitud de recompensa total en la adquisición y la duración de los ensayos de extinción. En un primer experimento, se varió la magnitud de recompensa (900, 300 o 100 segundos de acceso a agua por sesión) y la cantidad de entrenamiento de adquisición (5 o 15 sesiones). En cada grupo de animales, la duración de las sesiones de extinción fue la misma que durante las sesiones de adquisición. Los resultados obtenidos (Figura 4) muestran que con la cantidad total de acceso al agua equiparada en la adquisición, la extinción fue más rápida en animales que habían recibido recompensas más grandes (latencias mayores en el grupo 900/5 que en el grupo 300/15); pero con la cantidad total de entrenamiento igualada, la extinción fue más rápida en los animales que recibieron recompensas más pequeñas (latencias mayores en el grupo 100/15 que en el 300/15).

Figura 4. Tiempo de recorrido de cuatro grupos de sapos entrenados con variaciones de tiempo

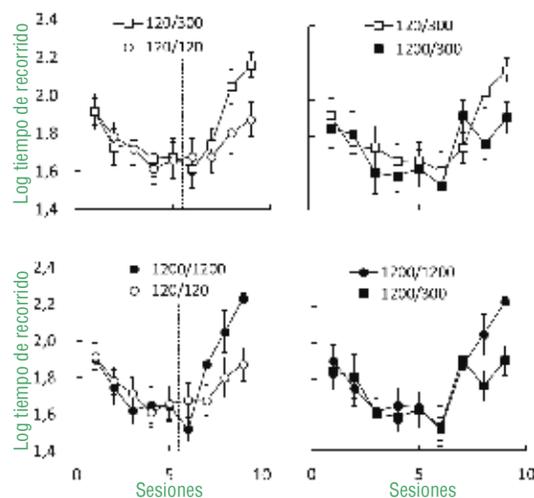


Nota: Tiempo de recorrido (Log s) de cuatro grupos de sapos entrenados con variación del tiempo total de acceso a agua (100, 300 o 900 segundos) y de la cantidad de sesiones de adquisición (5 o 15 sesiones). La línea punteada separa la adquisición (sesiones 1 a 15) de la extinción (sesiones 16 a 20). Cada punto representa el desempeño del grupo en una sesión diaria.

Fuente: Adaptado de Puddington, Papini & Muzio, 2018a.

En otras palabras, teniendo igualada en la adquisición la cantidad total de acceso al agua entre grupos, con recompensas menores por sesión, pero distribuidas a lo largo de un mayor número de sesiones, se obtiene una menor extinción con respecto a grandes recompensas por sesión, pero distribuidas a lo largo de un menor número de sesiones (en nuestro ejemplo, Grupo 300/15 vs. Grupo 900/5). En un segundo experimento, Puddington, Papini & Muzio (2018a) variaron la magnitud de la recompensa (1200 o 120 segundos de acceso a agua por sesión) mientras se mantenían constantes el número de sesiones de adquisición (5 sesiones) y la duración de las sesiones de extinción (300 segundos); en este caso, los resultados (Figura 5) muestran que el desempeño de extinción fue menor con una magnitud de recompensa pequeña que con una recompensa grande (latencias más largas en 120/300 que en 1200/300).

Figura 5. Relación entre la magnitud de la recompensa y la duración de los ensayos de extinción en tiempos de recorrido



Nota: tiempo de recorrido (Log s) de cuatro grupos de sapos entrenados con el objetivo de analizar la relación entre la magnitud de la recompensa y la duración de los ensayos de extinción. Dos grupos fueron emparejados en términos de la magnitud de recompensa (ya sea 1200 o 120 segundos de acceso a agua por sesión) y luego expuestos a sesiones de extinción de diferente duración (1200, 300 o 120 segundos). Todos los animales recibieron 5 sesiones de adquisición y 4 sesiones de extinción. Aunque los cuatro grupos se entrenaron al mismo tiempo, los resultados se grafican por pares para facilitar las comparaciones. La línea punteada separa la adquisición (sesiones 1 a 5) de la extinción (sesiones 6 a 9). Cada punto representa el desempeño del grupo en una sesión diaria (media \pm ES).
Fuente: Adaptado de Puddington, Papini & Muzio, 2018a

Estos resultados también sugieren que, al menos en anfibios, la extinción instrumental depende de la cantidad de tiempo que los animales están expuestos al contexto durante las sesiones de extinción. Hasta donde sabemos, el papel de la duración de las sesiones de extinción aún no se ha estudiado en mamíferos en un diseño similar. En una reciente revisión Reichelt y Lee (2013) indican que no hay estudios que manipulen la exposición a las señales de no refuerzo en el aprendizaje instrumental apetitivo, por lo tanto, esta es un área que necesitan más estudios de comportamiento. En psicología comparada, una comprensión evolutiva completa de las diferencias comportamentales observadas a través de los vertebrados en los efectos de los programas de recompensa sobre la extinción instrumental requiere de un análisis sistemático de los determinantes de la extinción en especies de distintas clases zoológicas (especialmente en no mamíferos). Por lo tanto, la evidencia acumulada en las últimas décadas en nuestro laboratorio sobre los procesos de extinción en este anfibio contribuye a una base de conocimiento comparativo del aprendizaje y la cognición en los vertebrados.

Globalmente, en términos apetitivos, nuestros resultados destacan la importancia de la manipulación de las condiciones de ingesta de agua como factor de control de la adquisición de la respuesta, así como del tiempo de exposición al no refuerzo para la tasa de extinción.

Estímulos aversivos: la mayoría de los experimentos sobre condicionamiento aversivo en vertebrados han usado el dolor periférico inducido por descargas eléctricas como estímulo aversivo (Brush, 1971). La descarga eléctrica tiene la enorme ventaja de permitir controlar con mucha precisión el momento, la duración y la intensidad del estímulo.

Por eso ha sido tradicionalmente el estímulo aversivo de primera elección en estudios de condicionamiento aversivo en las más variadas especies (Mackintosh, 1974).

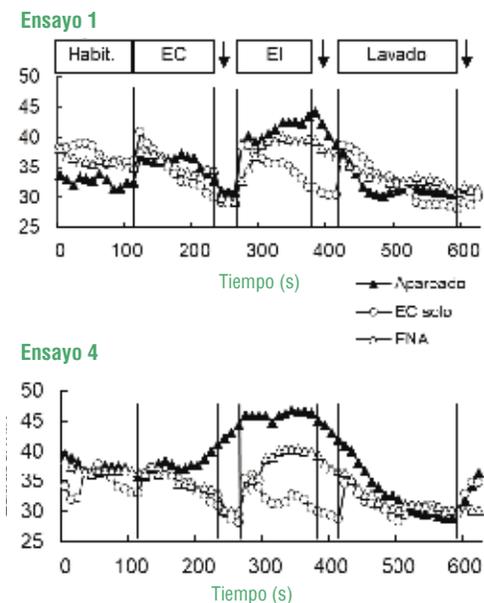
Aunque en mamíferos se observa una relación directa entre parámetros de descargas eléctricas y respuestas adquiridas (e.g., en ratas, Campbell & Masterton, 1969), las descargas eléctricas han demostrado ser relativamente ineficaces para estudiar el aprendizaje en anfibios, dando resultados inciertos o inconsistentes (ver Macphail, 1982; Muzio, 1999; Suboski, 1992). Esto se debe -presumiblemente- a las características de la piel de los anfibios, que mantiene varias capas de células muertas con alta mucosidad reteniendo humedad, lo cual amortiguaría la percepción sensorial de las descargas eléctricas (ver Puddington & Muzio, 2013).

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo experimental de estudio del aprendizaje aversivo en anfibios utilizando soluciones salinas de alta concentración como alternativa a las descargas eléctricas (Daneri, Papini & Muzio, 2007; Loza, 1998). Este modelo explota la sensibilidad del sapo terrestre (*Rhinella arenarum*) para detectar la composición de los fluidos a través de su piel ventral, que como vimos también es utilizada para la absorción durante el proceso de rehidratación (Christensen, 1974; Reboreda, Muzio, Viñas & Segura, 1991; Schmajuk & Segura, 1982). La concentración de cloruro de sodio (NaCl) en el medio interno de los sapos es aproximadamente de 115 mM (Reboreda et al., 1991). En la práctica, la exposición de animales al contacto de soluciones de NaCl que varían entre 0-250 mM (soluciones hipotónicas a ligeramente hipertónicas) lleva a un aumento de peso a través de la rehidratación y la emisión de comportamientos apetitivos: acercamiento a estas soluciones. En contraste, las soluciones de NaCl que varían entre 350-1000 mM (soluciones

altamente hipertónicas) conducen a una pérdida de peso y la ejecución de comportamientos aversivos: respuestas de escape. Entre estos dos extremos, una solución de 300 mM de NaCl (solución moderadamente hipertónica) no produce ganancia ni pérdida de peso, ni tampoco genera una conducta neta de acercamiento o escape. Por lo tanto, se la considera una “solución neutral” para la variación de peso (Loza, 1998). De esta forma, se ha caracterizado un nuevo modelo de estímulo: soluciones salinas de NaCl, que pueden funcionar como reforzadores o supresores de conductas en distintos procedimientos de aprendizaje en anfibios. Las propiedades de estas soluciones salinas brindan la enorme ventaja de variar entre apetitivas o aversivas modificando sólo la concentración de las mismas. En forma unidimensional la concentración de estas soluciones pueden definir un conjunto de estímulos altamente apetitivos (soluciones 0-250 mM de NaCl) pasando a otro grupo de estímulos altamente aversivos (soluciones 350-1000 mM de NaCl). Así, un simple continuo de salinidad puede producir reforzadores apetitivos (por debajo de 250 mM), neutro (300 mM) o aversivos (por encima de 350 mM). Utilizando las propiedades de estas soluciones salinas de alta concentración, hemos desarrollado en sapos dos preparaciones de condicionamiento aversivo, tanto activo como pasivo.

En un primer estudio, Daneri, Papini & Muzio (2007) caracterizaron una respuesta de escape y evitación activa. Para ello se explotó la capacidad de los sapos para detectar la concentración de varias soluciones salinas, utilizando una solución neutra (300 mM de NaCl) como señal anticipatoria de una solución aversiva (800 mM de NaCl, altamente hipertónica). En primer lugar, utilizando esta capacidad se desarrolló un procedimiento en una situación inescapable donde se observó un condicionamiento aversivo del ritmo cardíaco (Figura 6).

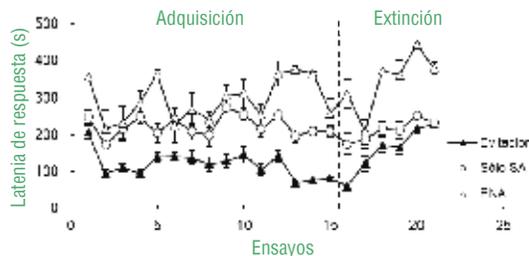
Figura 6. Aceleración de la tasa cardíaca



Nota: respuesta cardíaca promedio (latidos por minuto) de sapos durante el primer y último ensayo (ensayos 1 y 4) de un condicionamiento aversivo en una situación inescapable. Los dos primeros minutos del ensayo permitían que los animales alcancen el nivel de la tasa cardíaca basal antes de la exposición a las soluciones estímulo. Habit: habituación; EC: estímulo condicionado (solución neutra 300 mM de NaCl); EI: estímulo incondicionado (solución aversiva 800 mM de NaCl); ENA: Grupo Explícitamente No Apareado; Lavado: drenaje de la solución salina y su reemplazo con agua deionizada; Flechas: período de 30 segundos durante los cuales la solución salina era descargada del dispositivo experimental; El asterisco indica la interpolación de 180 segundos entre EC y EI para el Grupo ENA.
Fuente: Adaptado de Daneri, Papini & Muzio, 2007

Además, empleando estas dos soluciones salinas en una caja de salto de una vía (*one-way shuttle box*), también fue posible observar un aprendizaje de evitación activa (Figura 7).

Figura 7. Latencia de respuesta

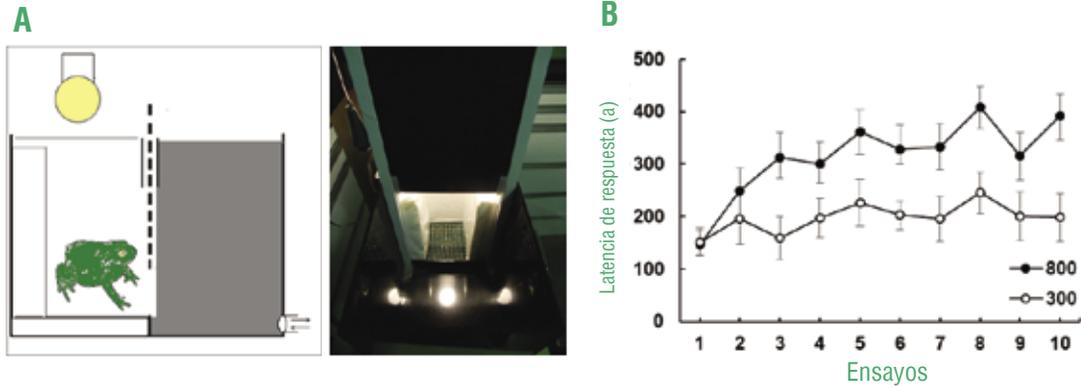


Nota: Latencia de respuesta (media \pm ES) durante adquisición (ensayos 1 a 15) y extinción (ensayos 16 a 21) para moverse al compartimento seguro de una caja de salto en tres grupos de sapos: Evitación (estímulo de advertencia y reforzador apareados), Sólo SA (señal de advertencia solamente) y ENA (explícitamente no apareado). La señal de advertencia era una solución neutra 300 mM de NaCl, mientras que el reforzador era una solución aversiva 800 mM de NaCl. Los sapos podían evitar (moviéndose al compartimento seguro durante los primeros 150 segundos del ensayo, marcados con una línea punteada horizontal) o escapar (moviéndose después de la presentación de la solución altamente hipertónica).
Fuente: Adaptado de Daneri, Papini & Muzio, 2007

Los resultados obtenidos en estos dos experimentos indican que el condicionamiento cardíaco y el aprendizaje de evitación constituyen elementos de un sistema adaptativo para enfrentar situaciones aversivas que implican la pérdida del balance hídrico corporal.

Posteriormente, Puddington, Daneri, Papini y Muzio (2016), empleando las propiedades de estas mismas soluciones salinas en anfibios, extendieron el protocolo de entrenamiento anterior a una situación de evitación pasiva, procedimiento que requiere que los animales aprendan a suprimir una respuesta dominante después de aparearla con un estímulo aversivo. En este caso, se utilizó una caja de salto con dos compartimientos (Figura 8A): uno de partida (iluminado, seco y más pequeño) y otro que contenía la solución salina correspondiente (oscuro). En cada ensayo, los sapos eran colocados en el compartimento iluminado y se contabilizaba el tiempo que los animales tardaban en cruzar al compartimento oscuro.

Figura 8. Diagrama lateral de la caja de salto



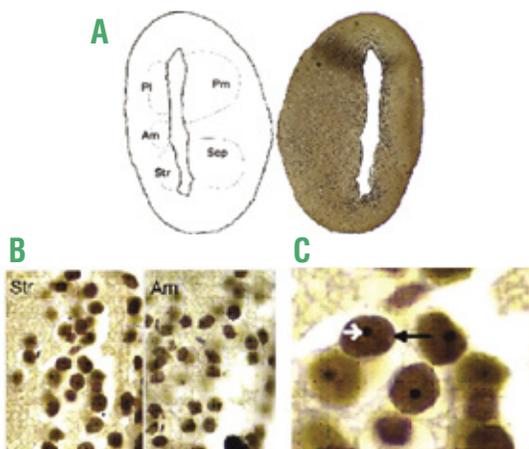
Nota: A. Izq: Diagrama lateral de la caja de salto utilizada para entrenar a los sapos en la situación de evitación pasiva. La caja posee dos compartimentos: uno iluminado, seco y más pequeño (desde donde los animales inician cada ensayo) y otro oscuro que contiene la solución salina correspondiente (800 mM o 300 mM de NaCl). Der: Vista superior de la caja de salto desde el compartimento oscuro. B. Latencia de respuesta (media \pm ES) durante los 10 ensayos de adquisición para moverse al compartimento oscuro de la caja de salto (contenía distintas soluciones salinas) en los dos grupos de sapos entrenados: 800 (experimental, expuesto a una solución aversiva 800 mM de NaCl) y 300 (control, expuesto a una solución neutra 300 mM de NaCl).

Fuente: Adaptado de Puddington, Daneri, Papini & Muzio, 2016

En esta situación se entrenaron dos grupos de sapos (experimental y control) que aprendieron a moverse del compartimento iluminado al compartimento oscuro. Una vez que los animales respondían, los que pertenecían al grupo experimental eran expuestos a una solución de NaCl altamente hipertónica de 800 mM (lo cual lleva a una pérdida de peso). En cambio, los animales del grupo control recibieron exposición a una solución de NaCl levemente hipertónica de 300 mM (que no genera ganancia ni pérdida de peso). Después de 10 ensayos de adquisición, los animales en el grupo experimental mostraron una latencia significativamente mayor para ingresar al compartimento oscuro respecto de los animales del grupo control (Figura 8B). De esta forma, los animales experimentales mostraron una adquisición gradual de la respuesta de evitación pasiva, mientras que los animales del grupo control mantenían su latencia de respuesta estable a lo largo de los ensayos.

Finalmente, en este mismo trabajo (Puddington et al., 2016) también se exploraron las bases neurales del aprendizaje de evitación pasiva a través del registro indirecto de la actividad celular en varias regiones del cerebro. Una vez finalizado el último ensayo, los animales fueron sacrificados para evaluar la activación neuronal en cinco regiones cerebrales usando la técnica de tinción de AgNOR para nucléolos, un índice de actividad cerebral (Puddington & Muzio, 2016). Esta técnica es un método indirecto de medición del nivel de actividad neural que tenía en el período previo un área cerebral particular. Su procedimiento requiere que los animales sean sacrificados inmediatamente al final del último ensayo de entrenamiento (en este caso, después del ensayo 10) a fin de preparar sus cerebros para la tinción. La Figura 9 muestra un corte coronal a nivel medio del cerebro de un sapo indicando las regiones donde se realizó la medición y varios ejemplos de tinción de AgNOR en distintas neuronas.

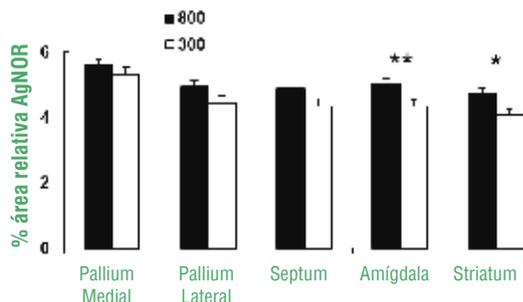
Figura 9. Diagrama y vista de la sección coronal teñida con AgNOR



Nota: A. Diagrama (izquierda) y vista de la sección coronal teñida con AgNOR (x40, derecha) a nivel medio del eje antero-posterior del telencéfalo en el sapo *Rhinella arenarum* que muestra las cinco regiones donde se realizó el registro de la actividad neural (Am: amígdala; Pl: pallium lateral; Pm: pallium medial; Sep: septum; Str: striatum). B. Ejemplos de tinción de AgNOR en neuronas del striatum y la amígdala (x1000). C. Aumento de la imagen del striatum que muestra un núcleo (flecha negra) y un nucléolo (flecha blanca).

Fuente: Adaptado de Puddingotn, Daneri, Papini & Muzio, 2016.

Figura 10. Niveles de activación de las cinco regiones del cerebro estudiadas



Nota: Porcentaje del tamaño relativo de los AgNOR (área nucléolo/área del núcleo; media \pm ES) medido en las cinco regiones telencefálicas de los dos grupos de sapos entrenados (800: experimental; 300: control). Los asteriscos indican el nivel de significación (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

Fuente: Adaptado de Puddingotn, Daneri, Papini & Muzio, 2016

Los resultados obtenidos mostraron sólo una activación significativamente mayor de la amígdala y el striatum en los animales experimentales en relación con los controles (estas regiones son homólogas al sistema amigdalino-estriatal

de los mamíferos). Las diferencias entre grupos en las demás regiones analizadas (el pallium lateral, el pallium medial y el septum) no alcanzaron niveles significativos. Haciendo un análisis comparativo, la amígdala ha sido identificada durante mucho tiempo como una de las principales estructuras implicadas en el aprendizaje aversivo en mamíferos (Duvarci & Pare, 2014; Phelps & LeDoux, 2005), incluida la evitación pasiva (Huang, Shyu, Hsiao, Chen & He, 2013; Jellestad & Bakke, 1984). En peces, las regiones homólogas a la amígdala también han sido implicadas en el aprendizaje de evitación activa (Portavella, Salas, Vargas & Papini, 2003; Portavella, Torres, Salas & Papini, 2004), un hallazgo que sugiere una fuerte conservación evolutiva de la función cerebral en el aprendizaje aversivo a través de los vertebrados. En anfibios, aunque existían varios estudios morfológicos y neuroinmunohistoquímicos que indican que la parte ventral del pallium lateral del telencéfalo es homóloga al complejo amigdalino de los mamíferos (Laberge, Mühlenbrock-Lenter, Grunwald & Roth, 2006; Moreno & González, 2006, 2007; Mühlenbrock-Lenter, Endepols, Roth & Walkowiak, 2005), no existían hasta el trabajo de Puddington, Daneri, Papini & Muzio (2016) estudios de comportamiento que analizaran las funciones de estas regiones (Hall, Ballagh & Kelley, 2013; Hoffman & Lico, 1972; Laberge, Feldhoff, Feldhoff & Houck, 2008). Los datos aportados en dicho trabajo sugieren que el aprendizaje de evitación pasiva induce un aumento diferencial de la actividad neuronal en la amígdala y el striatum. Por lo tanto, ese incremento reflejaría los cambios previos en la actividad cerebral ocurridos en la amígdala y en el striatum durante el período de entrenamiento inmediatamente anterior. En términos globales, estos resultados sugieren que la activación amigdalino-estriatal podría ser un componente clave del circuito cerebral que controla el aprendizaje de evitación pasiva en anfibios.

Receptores cutáneos y nocicepción

En mamíferos, la percepción del dolor (por ejemplo, en el caso de una quemadura), no depende de una estimulación intensa de receptores periféricos de calor, sino que el mismo tiene sus receptores específicos e independientes del resto de los receptores correspondientes al tacto (Millan, 1999).

De una forma similar, el parche pélvico de los anfibios cuenta con receptores cutáneos que le permiten a un animal detectar cambios en la concentración salina del medio en el que está sumergido y, además, con otros receptores independientes que perciben el dolor. En los anfibios, el sistema nociceptivo está organizado con receptores periféricos que fundamentalmente están conectados con el tronco cerebral por medio de vías rápidas mielinizadas y también vías lentas sin mielina. Estas señales de dolor son procesadas principalmente por el tálamo y luego se proyectan hacia las regiones no olfatorias del telencéfalo (Guénette, Giroux & Vachon, 2013). Lamentablemente, la forma en que los receptores nociceptivos actúan frente a soluciones salinas en anuros, aún no ha sido estudiada.

Sin embargo, sí existen estudios que muestran la función quimiosensorial de la piel ventral de los anfibios para discriminar concentraciones salinas (Nagai, Koyama, Hoff & Hillyard, 1999). En particular, se ha comprobado que la exposición de sapos del desierto (*Bufo alvarius*) a una solución salina externa de NaCl dispara señales dirigidas desde el parche pélvico hasta el tálamo, las cuales son cada vez más frecuentes en la medida en que se aumenta la concentración de NaCl. Dichas señales pueden ser afectadas si en la solución salina se agrega amiloride, una droga bloqueante de los canales de K⁺ que también actúa sobre los canales de Na⁺ (Nagai et al., 1999). En el caso del sapo terrestre *Rhinella*

arenarum, la administración de amiloride también aumenta el tiempo que pasan los sujetos en una solución salina de NaCl intentando captar agua (Iurman & Muzio, 2010).

Ahora bien, si consideramos que el caso de la variación en la concentración salina de las soluciones a la que son expuestos los anfibios constituye un modelo unidimensional de reforzamiento, deberíamos asumir que los receptores nociceptivos no juegan un papel en el aprendizaje aversivo mediado por soluciones salinas de alta concentración. O al menos, que la nocicepción no es esencial para que se establezca un aprendizaje aversivo mediado por soluciones salinas. En este sentido, para despejar esta incógnita, deberíamos a futuro contestar al menos las siguientes preguntas. En primer lugar: ¿la exposición a soluciones salinas de distintas concentraciones producen en anfibios estimulación nociceptiva? Probablemente la forma más sólida de contestar esta pregunta es en preparados in vitro aislando los receptores y estudiando su respuesta frente a la concentración de sal en el medio. En el caso de observarse que las soluciones hipertónicas activan los receptores nociceptivos, esto podría estar indicando que las soluciones de concentración pequeña (apetitivas) y de concentración grande (aversivas) de NaCl, activan vías diferenciales, debilitando la idea de unidimensionalidad. Sin embargo, es posible que la condición de estímulo aversivo de las soluciones salinas, no dependa exclusivamente de la estimulación nociceptiva. En segundo lugar: ¿es posible el condicionamiento aversivo en anfibios que se encuentran bajo los efectos de un analgésico de efecto local o central? Para responder a esta pregunta sería clave disponer de mecanismos de bloqueo periférico o central de la nocicepción. En este sentido, existe un extenso trabajo de revisión que analiza los efectos de fármacos opioides sobre la respuesta de dolor en anfibios (Stevens, 2004), razón por la cual este tipo de drogas podrían ser utilizadas en estudios futuros. Otra alternativa

sería el uso de fármacos canabinoideos (Salio, Cottone, Conrath & Franzoni, 2002). Aunque en el caso de utilizar un anestésico local debería seleccionarse uno que actúe únicamente sobre los receptores nociceptivos, y sea neutro para el resto de los receptores.

Dentro de los procedimientos ya utilizados en anfibios, hay dos que podrían ser los más adecuados para responder a esta última pregunta. Primero, el protocolo de condicionamiento clásico autónomo (Daneri, Papini & Muzio, 2007), en el que se monitorea la actividad cardíaca de sapos expuestos inicialmente a una solución neutra (300 mM) y luego a una solución aversiva (800 mM). En este protocolo se observa en el grupo experimental un incremento en la actividad cardíaca frente a la estimulación con la solución neutra a partir del segundo ensayo, en comparación con el grupo control que recibe dos veces estimulación con la solución neutra. Una segunda posibilidad es el protocolo de evitación pasiva descrito anteriormente (Puddington, Daneri, Papini & Muzio, 2016).

En cualquiera de las dos situaciones, si se observara en los animales una respuesta de aprendizaje aun habiendo recibido un fármaco antinociceptivo, podría sugerir que este modelo anfibio utiliza una única vía sensorial tanto para el procesamiento apetitivo como el aversivo.

Conclusiones y comentarios finales

El modelo de los anfibios constituye una situación especial para el análisis de la potencial unidimensionalidad de los estímulos reforzantes. En particular, el conjunto de estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que una misma clase de estímulo, una solución salina de cloruro de sodio, puede resultar apetitiva, aversiva o neutra dependiendo de la concentración de NaCl utilizada. De esta forma, aunque aún

falta indagar el papel de la nocicepción en estudios futuros, parecería que existen vías sensoriales comunes implicadas en el procesamiento de esta variedad de estímulos.

En este aspecto, sería muy interesante que se pudieran desarrollar estudios comparativos en otros grupos de anfibios, utilizando el modelo de estímulos empleado en nuestro laboratorio. Esperamos alentar con este artículo a otros investigadores para que inicien ese camino.

La utilización del agua como estímulo apetitivo en anfibios ha sido sistemáticamente desarrollada en procedimientos de condicionamiento instrumental llevados adelante en nuestro laboratorio (Muzio, Segura & Papini, 1992; Puddington, Papini & Muzio, 2018a; entre otros). Por otro lado, el procedimiento de entrenamiento desarrollado a partir del uso de soluciones aversivas de NaCl ha permitido obtener evidencia consistente de aprendizaje de evitación en anfibios, un fenómeno difícil de registrar en estos animales. Es más, se observó tanto evitación activa como pasiva (Daneri, Papini & Muzio, 2007; Puddington, Papini & Muzio, 2013). Como se mencionó anteriormente, la efectividad de las soluciones salinas para inducir el entrenamiento de evitación probablemente esté relacionada con su mayor relevancia ecológica en comparación con la de otros estímulos aversivos (e.g., descargas eléctricas) comúnmente utilizados en experimentos anteriores con anfibios anuros (Macphail, 1982; Muzio, 1999; Suboski, 1992).

Resumiendo, podemos decir que en términos generales la utilización de este modelo anfibio brinda una herramienta única para estudiar los mecanismos relacionados con el procesamiento de estímulos apetitivos y aversivos, dada su característica excepcional del procesamiento de estos estímulos bajo un mismo sistema de percepción sensorial (sistema unidimensional). Sin

embargo, cabe indicar que hasta el momento las vías sensoriales periféricas del procesamiento de la información necesaria para que se produzca el aprendizaje instrumental utilizando estas soluciones son mayormente desconocidas.

Respecto de los circuitos neurales involucrados, empleando el modelo del sapo terrestre *Rhinella arenarum*, hemos obtenido evidencia relacionada con el procesamiento de la información aprendida, tanto en procedimientos apetitivos como aversivos.

En situaciones de aprendizaje apetitivo, estudiamos en particular la participación del pallium medial (Muzio, Segura & Papini, 1993). Esta área ocupa la parte interna dorsal del telencéfalo y, como se mencionó anteriormente, es homóloga al hipocampo de los mamíferos. Los resultados que obtuvimos en anfibios coinciden con los obtenidos en ratas en una situación análoga, donde el área hipocampal interviene en la inhibición de respuestas previamente aprendidas (e.g., Jarrard & Isaacson, 1965). Sin embargo, resta aún estudiar en anfibios los circuitos específicos de la recompensa para hacer un análisis comparativo de este sistema.

En cuanto a situaciones de aprendizaje aversivo, nuestros estudios en anfibios han abarcado las regiones que se consideran homólogas al sistema amígdalo-estriatal de los mamíferos (Puddington, Daneri, Papini & Muzio, 2016). Así, en el sapo terrestre nos hemos focalizado en el análisis de la amígdala; en particular, la región de la amígdala evaluada corresponde a la amígdala lateral y anterior de los mamíferos (Moreno & González, 2004). Se ha postulado también que la amígdala basolateral de los mamíferos interviene en el almacenamiento de información relacionada con el condicionamiento de miedo pavloviano (Phelps & LeDoux, 2005), proceso en el cual se produce una importante síntesis

proteica (Johansen, Cain, Ostroff & LeDoux, 2011). Complementariamente, se ha propuesto al striatum como mediador de las respuestas motoras condicionadas en mamíferos, siendo esta región parte del sistema dopaminérgico (Kravitz & Kreitzer, 2012). De esta forma, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio resaltan la importancia de las conexiones amigdalino-estriatales, ya que constituirían una vía evolutivamente conservada de regulación del condicionamiento del miedo en todos los vertebrados (Puddington, Daneri, Papini & Muzio, 2016).

Finalmente, en este contexto es interesante plantear el papel funcional que podría estar desempeñando el tálamo, una estructura crucial para el procesamiento temprano de las señales sensoriales. En mamíferos, la mayoría de los estímulos sensoriales (a excepción del olfato) son transmitidos desde los distintos sentidos hacia el tálamo, que posteriormente los proyecta hacia las regiones corticales y subcorticales especializadas (Karten, 2015). Pero mientras que en mamíferos, las señales correspondientes a estímulos apetitivos y aversivos implican distintos tipos de receptores (por lo tanto, llegando al tálamo por vías independientes), los estudios que hemos descrito en los apartados anteriores sugieren que nuestro modelo del sapo terrestre podría ser diferente, siendo tal vez un modelo único entre los anteriormente conocidos. Así, los estudios propuestos en el apartado anterior apuntan a dilucidar (i) si las altas concentraciones de NaCl, que resultan aversivas para los sapos, activan receptores nociceptivos, o (ii) si es la estimulación masiva de receptores de Na⁺ lo que constituye la señal de aversión. Estas dos posibilidades implicarían dos modelos distintos: a) en un modelo de unidimensionalidad, el tálamo recibiría información de una única vía sensorial correspondiente a la detección de cambios en la concentración de Na⁺ por parte del parche

pélvico, luego, esa información sería enviada a estructuras superiores como la amígdala o el núcleo accumbens que serían los responsables de etiquetar el estímulo como aversivo o apetitivo; b) en un modelo bidimensional, en cambio, el tálamo recibiría información tanto de la vía sensorial correspondiente a la detección de cambios en la concentración salina, como de

las vías nociceptivas. En este caso, una solución salina particular tendría carácter aversivo en la medida en que produzca activación de dichas vías nociceptivas. A fin de contrastar estas dos hipótesis, serán necesarios más estudios futuros en los que se pueda analizar la respuesta funcional de estas vías sensoriales potencialmente implicadas.

Referencias

- Bentley, P. J. (1966). Adaptations of Amphibia to arid environments. *Science*, 152, 619-623.
- Bingman, V. P. & Muzio, R. N. (2017). Reflections on the Structural-Functional Evolution of the Hippocampus: What is the Big Deal about a Dentate Gyrus? *Brain, Behavior and Evolution*, 90, 53-61.
- Brush, F. R. (1971). *Aversive conditioning and learning*. New York: Academic Press.
- Campbell, B. A. & Masterton, F. A. (1969). Psychophysics of punishment. En B. A. Campbell & R. M. Church (eds.), *Punishment and aversive behavior* (pp. 3-42). New York: Appleton-Century-Crofts.
- Christensen, C. U. (1974). Adaptations in the water economy of some anuran Amphibia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 47A, 1035-1049.
- Cole, S., Stone, A. D. & Petrovich, G. D. (2017). The dorsomedial striatum mediates Pavlovian appetitive conditioning and food consumption. *Behavioral Neuroscience*, 131(6), 447-453. doi: 10.1037/bne0000216
- Corbit, L. H. & Janak, P. H. (2010). Posterior dorsomedial striatum is critical for both selective instrumental and Pavlovian reward learning. *European Journal of Neuroscience*, 31(7), 1312-1321.
- Daneri, M. F., Papini, M. R. & Muzio, R. N. (2007). Common toads (*Bufo arenarum*) learn to anticipate and avoid hypertonic saline solutions. *Journal of Comparative Psychology*, 121, 419-427.
- Duellman, W. E. & Trueb, L. (1994). *Biology of amphibians*. Baltimore and London: Johns Hopkins University Press.
- Duvarci, S. & Pare, D. (2014). Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron*, 82, 966-980.
- Guénette, S. A., Giroux, M. C. & Vachon, P. (2013). Pain perception and anaesthesia in research frogs. *Experimental Animals*, 62(2), 87-92.
- Hall, I. C., Ballagh, I. H. & Kelley, D. B. (2013). The *Xenopus* amygdala mediates socially appropriate vocal communication signals. *Journal of Neuroscience*, 33, 14534-14548.
- Hershkowitz, M. & Samuel, D. (1973). The retention of learning during metamorphosis of the crested newt (*Triturus cristatus*). *Animal Behaviour*, 21(1), 83-85.

- Hoffman, A. & Lico, M. C. (1972). Autonomic and motor responses to electrical stimulation of the toad's brain. *Physiology and Behavior*, 8, 1039-1043.
- Huang, A. C. W., Shyu, B.-C., Hsiao, S., Chen, T.-C. & He, A. B.-H. (2013). Neural substrates of fear conditioning, extinction, and spontaneous recovery in passive avoidance learning: A c-Fos study in rats. *Behavioural Brain Research*, 237, 23-31.
- Iurman, M. G. & Muzio, R. N. (2010). *Efectos del Amiloride sobre la recaptación de agua a diferentes niveles de deshidratación en el sapo común*. XI Congreso Argentino de Herpetología. Buenos Aires.
- Jarrard, L. E. & Isaacson, R. L. (1965). Hippocampal ablation in rats: Effects of intertrial interval. *Nature*, 207, 109-110.
- Jarrard, L. E., Isaacson, R. L. & Wickelgren, W. O. (1964). Effects of hippocampal ablation and intertrial interval on acquisition and extinction of a runway response. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 57, 442-445.
- Jellestad, F. K. & Bakke, H. K. (1984). Passive avoidance after ibotenic acid and radio frequency lesions in the rat amygdala. *Physiology and Behavior*, 34, 299-305.
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. & LeDoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, 147, 509-524.
- Karten, H. J. (2015). Vertebrate brains and evolutionary connectomics: On the origins of the mammalian 'neocortex'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370, 1-12. doi: 10.1098/rstb.2015.0060
- Kravitz, A.V. & Kreitzer, A. C. (2012). Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment. *Physiology*, 27, 167-177.
- Laberge, F., Feldhoff, R. C., Feldhoff, P. W. & Houck, L. D. (2008). Courtship pheromone-induced c-Fos-like immunolabeling in the female salamander brain. *Neuroscience*, 151, 329-339.
- Laberge, F., Mühlenbrock-Lenter, S., Grunwald, W. & Roth, G. (2006). Evolution of the Amygdala: New insights from studies in amphibians. *Brain, Behavior and Evolution*, 67, 177-187.
- Lascano, E., Segura, E. T. & Ferrario, J. A. (1971). Organización anatómica del encéfalo del Bufo arenarum Hensel. *Revista de la Sociedad Argentina de Biología*, 47, 70-88.
- Llinás, R. & Precht, W. (1976). *Frog Neurobiology. A Handbook*. Berlin: Springer-Verlag.

- Loza, M. A. (1998). *Comportamiento del anfibio anuro Bufo arenarum (sapo común) frente a soluciones externas de diferente osmolaridad*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Mackintosh, N. J. (1974). *The Psychology of Animal Learning*. New York: Academic Press.
- Macphail, E. M. (1982). *Brain and Intelligence in Vertebrates*. Oxford: Clarendon Press.
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1), 1-164.
- Moore, A. R. & Welch, J. C. (1940). Associative hysteresis in larval Amblystoma. *Journal of Comparative Psychology*, 29(2), 283-292.
- Moreno, N. & González, A. (2004). Localization and connectivity of the lateral amygdala in anuran amphibians. *Journal of Comparative Neurology*, 479, 130-148.
- Moreno, N. & González, A. (2006). The common organization of the amygdaloid complex in tetrapods: new concepts based on developmental, hodological and neurochemical data in anuran amphibians. *Progress in Neurobiology*, 78, 61-90.
- Moreno, N. & González, A. (2007). Evolution of the amygdaloid complex in vertebrates, with special reference to the anamnio-amniotic transition. *Journal of Anatomy*, 211, 151-163.
- Mühlenbrock-Lenter, J., Endepols, H., Roth, G. & Walkowiak, W. (2005). Immunohistological characterization of striatal and amygdalar structures in the telencephalon of the fire-bellied toad Bombina orientalis. *Neuroscience*, 134, 705-719.
- Muzio, R. N. (1999). Aprendizaje instrumental en anfibios. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 31(1), 35-47.
- Muzio, R. N. (2013). Aprendizaje en anfibios, el eslabón perdido: Un modelo simple cerebral en el estudio de conductas complejas. *Cuadernos de Herpetología*, 27(2), 87-100.
- Muzio, R. N., Daneri, M. F., & Sotelo, M. I. (2017). Aprendizaje y memoria espacial en anfibios: consideraciones generales y aspectos evolutivos. En J. Nieto., & R. Bernal-Gamboa (Eds.), *Estudios Contemporáneos en Cognición Comparada* (pp. 111-178). México: Universidad Nacional Autónoma de México.

- Muzio, R. N., Daneri, M. F., & Sotelo, M. I. (en prensa). Los anfibios como modelo experimental para el estudio de la evolución de la cognición espacial y sus bases neurales. *Revista Tesis Psicológica*.
- Muzio, R. N., Ruetti, E. & Papini, M. R. (2006). Determinants of instrumental extinction in terrestrial toads (*Bufo arenarum*). *Learning and Motivation*, 37(4), 346-356. doi: 10.1016/j.lmot.2005.12.003
- Muzio, R. N., Segura, E. T. & Papini, M. R. (1992). Effect of schedule and magnitude of reinforcement on instrumental acquisition and extinction in the toad, *Bufo arenarum*. *Learning and Motivation*, 23, 406-429.
- Muzio, R. N., Segura, E. T. & Papini, M. R. (1993). Effects of lesions in the medial pallium on instrumental learning in the toad *Bufo arenarum*. *Physiology and Behavior*, 54, 185-188.
- Nagai, T. H., Koyama, H., Hoff, K. S. & Hillyard, S. D. (1999). Desert toads discriminate salt taste with chemosensory function of the ventral skin. *Journal of Comparative Neurology*, 408, 125-136.
- Northcutt, R. G. & Ronan, M. (1992). Afferent and efferent connections of the bullfrog medial pallium. *Brain, Behavior and Evolution*, 40, 1-16.
- Pavlov, I. (1927). *Conditioned Reflexes*. United Kingdom: Oxford University Press.
- Phelps, E. A. & LeDoux, J. E. (2005). Contributions of the amygdala to emotion processing: From animal models to human behavior. *Neuron*, 48, 175-187.
- Portavella, M., Salas, C., Vargas, J. P. & Papini, M. R. (2003). Involvement of the telencephalon in spaced-trial avoidance learning in the goldfish (*Carassius auratus*). *Physiology and Behavior*, 80, 49-56.
- Portavella, M., Torres, B., Salas, C. & Papini, M. R. (2004). Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). *Neuroscience Letters*, 362, 75-78.
- Pough, H., Janis, C. M. & Heiser, J. B. (1999). *Vertebrate Life*. 5th Edition. New Jersey: Prentice Hall International.
- Puddington, M. M. & Muzio, R. N. (2013). Análisis comparado del aprendizaje aversivo en anfibios. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 5(3), 50-63.

- Puddington, M. M. & Muzio, R. N. (2016). Relación entre conducta y activación de áreas cerebrales. Empleo de la técnica de AgNOR en psicología comparada. *Interdisciplinaria*, 33(1), 1-13.
- Puddington, M. M., Daneri, M. F., Papini, M. R. & Muzio, R. N. (2016). Telencephalic neural activation after passive avoidance learning in the terrestrial toad *Rhinella arenarum*. *Behavioural Brain Research*, 315, 75-82. doi: 10.1016/j.bbr.2016.08.003
- Puddington, M. M., Papini, M. R. & Muzio, R. N. (2013). Vulnerability of long- term memory to temporal delays in amphibians. *Behavioural Processes*, 99, 7-11.
- Puddington, M. M., Papini, M. R. & Muzio, R. N. (2018a). Duration of extinction trials as a determinant of instrumental extinction in terrestrial toads (*Rhinella arenarum*). *Animal Cognition*, 21, 165-174. doi: 10.1007/s10071-017-1149-8
- Puddington, M. M., Papini, M. R. & Muzio, R. N. (2018b). Retention and delayed extinction of an instrumental response in the toad *Rhinella arenarum*: Effects of overtraining. *Avances en Psicología Latinoamericana*, 36(1), 129-138. doi: 10.12804/revistas.urosario.edu.co/apl/a.5119
- Rawlins, J. N. P., Feldon, J. & Gray, J. A. (1980). The effects of hippocampectomy and of fimbria section upon the partial reinforcement extinction effect in rats. *Experimental Brain Research*, 38, 273-283.
- Reboreda, J. C., Muzio, R. N., Viñas, M. C. & Segura, E. T. (1991). -adrenergic control of the water permeability of the skin during rehydration in the toad *Bufo arenarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C, 433-437.
- Regueira, E., Dávila, C. & Hermida, G. N. (2016). Morphological changes in skin glands during development in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *The Anatomical Record*, 299, 141-156.
- Reichelt, A. C. & Lee, J. L. (2013). Memory reconsolidation in aversive and appetitive settings. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7, 118. doi:10.3389/fnbeh.2013.00118

- Ruibal, R. (1962). The adaptative value of bladder water in the toad, *Bufo cognatus*. *Physiological Zoology*, 35, 218-223.
- Salio, C., Cottone, E., Conrath, M. & Franzoni, M. F. (2002). CB1 cannabinoid receptors in amphibian spinal cord: relationships with some nociception markers. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 24(3), 153-162.
- Schmajuk, N. A. & Segura, E. T. (1982). Behavioral regulation of wáter balance in the toad. *Herpetologica*, 38, 296-301.
- Shoemaker, V. H. & Nagy, K. A. (1977). Osmoregulation in amphibians and reptiles. *Annual Review of Physiology*, 39, 449-471.
- Stevens, C. W. (2004). Opioid research in amphibians: an alternative pain model yielding insights on the evolution of opioid receptors. *Brain Research Reviews*, 46(2), 204-215.
- Striedter, G. F. (2016). Evolution of the hippocampus in reptiles and birds. *Journal of Comparative Neurology*, 524, 496-517.
- Suboski, M. D. (1992). Releaser-induced recognition learning by amphibians and reptiles. *Animal Learning and Behavior*, 20, 63-82.
- Whitear, M. (1977). A functional comparison between the epidermis of fish and amphibians. *Symposium of the Zoological Society of London*, 39, 291-313.
- Winocur, G. & Mills, J. A. (1969). Hippocampus and septum in response inhibition. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 67, 352-357.