Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

# Aprendizaje espacial en el anfibio anuro Bufo arenarum. Estrategias, fenómenos y bases neurales

Daneri, María Florencia

2010

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

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

Cita tipo APA:
Daneri, María Florencia. (2010). Aprendizaje espacial en el anfibio anuro Bufo arenarum. Estrategias, fenómenos y bases neurales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Daneri, María Florencia. "Aprendizaje espacial en el anfibio anuro Bufo arenarum. Estrategias, fenómenos y bases neurales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

**Contacto:** digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# APRENDIZAJE ESPACIAL EN EL ANFIBIO ANURO *Bufo arenarum* ESTRATEGIAS, FENÓMENOS Y BASES NEURALES

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**María Florencia Daneri**

Director de Tesis: Dr. Rubén Néstor Muzio
Consejero de Estudios: Dr. Juan Carlos Reboreda

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología del Comportamiento
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)

Buenos Aires, 2010

# Aprendizaje Espacial en el anfibio anuro *Bufo arenarum*
# Estrategias, Fenómenos y Bases Neurales

## Índice


- Resumen 3
- Resumen en inglés 4
- Agradecimientos y dedicatoria 5
- Introducción General
  - Habilidades espaciales en vertebrados 6
  - Los anfibios anuros 12
  - Estudio del aprendizaje espacial en anfibios 16
  - Objetivos 19
- Primer Capítulo: Estrategias
  - Introducción 21
  - Experimento 1: Giro (auto-referencia) 24
  - Experimento 2: Guía (claves visuales) 36
  - Experimento 3: Giro vs Guía 42
  - Discusión 50
- Segundo Capítulo: Fenómenos
  - Introducción 52
  - Experimento 4: Proximidad espacial entre la clave y el refuerzo 53
  - Experimento 5: Bloqueo entre claves 60
  - Experimento 6: Ensombrecimiento entre claves 66
  - Experimento 7: Inhibición Latente 72
  - Discusión 77
- Tercer Capítulo: Bases Neurales
  - Introducción 78
  - Experimento 8: Efecto de la lesión del pallium medial en la estrategia de giro 85
  - Experimento 9: Efecto de la lesión del pallium medial en la estrategia de guía 90
  - Discusión 94
- Discusión General y Conclusiones 95
- Bibliografía 98


En el presente, resultados parciales de esta tesis están siendo publicados en:

Daneri, M. F., Casanave, E., & Muzio, R. N. (2010). Control of Spatial Orientation in Terrestrial Toads (*Bufo arenarum*). Aceptación preliminar en el *Journal of Comparative Psychology (USA).*

# Aprendizaje Espacial en el anfibio anuro *Bufo arenarum*
# Estrategias, Fenómenos y Bases Neurales

## Resumen

La presente tesis es un estudio de las estrategias, los fenómenos y las bases neurales del aprendizaje espacial en el sapo común *Bufo arenarum*. El análisis de las *estrategias* de aprendizaje espacial demuestra que estos animales son capaces de orientarse utilizando tanto una estrategia de guía (mediante el uso de claves visuales ambientales) como una estrategia de giro (tomando como referencia su propio cuerpo). Además, que esta última estrategia es la predominante si las claves ambientales brindan información contradictoria. También se pudo determinar la presencia de cuatro *fenómenos* del aprendizaje: el efecto de la distancia de la clave visual al refuerzo, el bloqueo y el ensombrecimiento entre claves y la inhibición latente. Estos fenómenos fueron ampliamente descriptos en otras clases de vertebrados, y por primera vez observados en anfibios en este trabajo. Al explorar las *bases neurales* de este tipo de aprendizaje, se pudo establecer el papel fundamental del pallium medial (área homóloga al hipocampo) para la orientación en el espacio, tanto mediante el uso de claves visuales como mediante el uso de la estrategia de giro. Estos resultados revelan que el hipocampo de los mamíferos y el pallium medial de los anfibios no tienen una equivalencia funcional completa.

Palabras Clave: aprendizaje espacial – *Bufo arenarum* – pallium medial – hipocampo - aprendizaje comparado

# Spatial learning in the anuran amphibian *Bufo arenarum*
# Strategies, Phenomena and Neural Basis

## Abstract

This thesis is a study of the strategies, phenomena and neural basis of the spatial learning in the common toad *Bufo arenarum*. The analysis of the *strategies* of the spatial learning shows that these animals are capable of orientation using both a guide strategy (using environmental visual cues) as a turn strategy (taking their own body as a reference). Furthermore, the latter is the preferred strategy if the environmental cues provide contradictory information. The presence of four *learning phenomena* has been also determined: the effect of the distance between the visual cue and the reinforcer, blocking and overshadowing between visual cues and latent inhibition. These phenomena have been previously described in other classes of vertebrates, and first time observed in amphibians in this work. By exploring the *neural basis* of this type of learning, the key role of the medial pallium (mammalian hippocampus homologue area) for spatial orientation has been established, both for the use of visual cues as for the use of a turn strategy. These results reveal that the mammalian hippocampus and the amphibian medial pallium do not have a complete functional equivalence.

Key words: spatial learning – *Bufo arenarum* – medial pallium - hippocampus – comparative learning

# Agradecimientos y dedicatoria

Quiero agradecer a todos aquellos que ayudaron a que esta tesis sea realidad:

- A Rubén Muzio, mi director y maestro
- Al Dr. Segura, por dejarme formar parte de su laboratorio y compartir conmigo su sabiduría
- A la Dra Emma Casanave, por abrirme las puertas y brindarme todo su apoyo
- A mis compañeros de laboratorio y amigos: Mariana Iurman y Martín Puddington
- A los dos grandes amores de mi vida: Fernando y Belisario
- A mi mamá y a mi hermana, este logro es de las tres

***Esta tesis está dedicada a mi papá, Daniel Daneri***

# Introducción General

## 1. Habilidades Espaciales en Vertebrados

### A) Importancia Ecológica de las habilidades espaciales

Los patrones de movimiento orientado de los individuos son componentes fundamentales de la ecología y biología poblacional de una especie. Entre los anfibios, las migraciones están asociadas mayoritariamente con agregaciones reproductivas, pero la dispersión de juveniles recientemente metamorfoseados también puede involucrar movimientos a través de grandes distancias (Duellman & Trueb, 1986). Para lograr este desplazamiento orientado se debe presentar un fenómeno de aprendizaje particular: el aprendizaje espacial. Este aprendizaje espacial confiere la habilidad de recordar la localización de uno o más objetos particulares en el ambiente.

Un proceso de aprendizaje, neural por naturaleza, está acompañado por un cambio gradual en el comportamiento; éste se asume consecuencia de la actividad nerviosa, y su estudio se usa para probar si el funcionamiento del cerebro del individuo ha cambiado a través de la experiencia (Lüddecke, 2003). Vale aclarar que un comportamiento aprendido debe ser analizado bajo condiciones que permitan determinar su función en relación con las demandas del ambiente, y que para determinar su valor adaptativo éste debe ser asociado con la historia natural de la especie en estudio (Lüddecke, 2003).

Si analizamos esta capacidad de aprendizaje espacial en vertebrados, varios estudios han demostrado que los mamíferos y las aves pueden utilizar diferentes estrategias para la orientación en el espacio basadas en múltiples sistemas de aprendizaje con el objetivo de orientarse y luego retornar al propio territorio-hogar (López et al., 1999). A pesar de la importancia de los estudios comparativos para comprender la estructura y el funcionamiento del aprendizaje espacial y los sistemas de memoria en vertebrados (Bingman, 1992; Sherry & Schacter, 1987), sólo unos pocos estudios han analizado los mecanismos del aprendizaje espacial en vertebrados filogenéticamente más antiguos

tales como peces (López et al., 1999), tortugas (Grisham & Powers, 1990; López et al., 2003) y lagartijas (Day et al., 2003), siendo muy pocos los que lo han hecho en anfibios.

En anfibios los estudios naturalistas de conducta migratoria parecerían sugerir que pueden utilizar diferentes estrategias espaciales, similares a aquellas observadas en mamíferos. Los movimientos de los anfibios están generalmente guiados por una conducta de orientación destinada a elegir la distancia más corta hacia la meta a fin de minimizar el riesgo de predación y deshidratación.

Los individuos de muchas especies desplazados de su territorio son capaces de relocalizar sitios conocidos utilizando una variedad de claves direccionales y mecanismos de orientación. En anfibios, la orientación se logra mediante la integración de claves acústicas, magnéticas mecánicas, olfatorias y visuales en un sistema multisensorial como fue inicialmente propuesto por Ferguson (1971). La información sensorial obtenida de una potencial clave está jerarquizada y es específica para cada especie e incluso para cada población de manera de optimizar la información disponible en los ambientes naturales (Sinsch, 2006). Tal clase de análisis contribuye a brindarnos información con un enfoque ambiental y ecológico.

### B) Estrategias

La capacidad de orientación en el espacio es fundamental para la supervivencia de los animales. Eso les permite recordar la localización de fuentes de alimento, refugios, potenciales parejas y sitios de apareamiento. Los animales emplean diferentes estrategias egocéntricas básicas para orientarse, aprendiendo a acercarse o alejarse de una clave en particular (guía) o mediante la ejecución de un patrón motor teniendo como referencia a su propio cuerpo (respuesta de giro). También pueden aprender la localización de un lugar en el espacio mediante la codificación simultánea de sus relaciones espaciales con múltiples claves ambientales (mapas cognitivos). Un mapa cognitivo se define como una representación tipo mapa del espacio absoluto que permite al sujeto ubicarse a sí mismo en un marco contextual estable y navegarlo de manera precisa y flexible. Es interesante notar que estas representaciones espaciales tipo mapa, que son memorias relacionales

verdaderas, pueden ser consideradas el equivalente animal más claro de la memoria declarativa o episódica humana (Salas et al., 2003).

Para una explicación extensiva de la orientación espacial en animales es necesario generar definiciones conceptualizadas sistemáticas. En este sentido, los conceptos asociados con *sistemas de taxones (o sistemas taxonómicos)* proveen un marco comprensible para el análisis del problema de describir las experiencias de aprendizaje en situaciones de laboratorio controladas. Los sistemas taxonómicos están basados en estrategias puramente egocéntricas, incluyendo las de guía y orientación. Mientras que las estrategias de guía involucran el acercamiento o alejamiento de ciertas claves, la orientación indica un giro sobre sí mismo en respuesta a una clave. Las propiedades de estos dos sistemas ya han sido descriptas con amplitud a partir del trabajo pionero de O'Keefe y Nadel (1978) y vastamente estudiadas en mamíferos (Nadel, 1991; O'Keefe & Nadel, 1978) y aves (Bingman, 1990; Bingman et al., 1989).

En la presente tesis se estudió el uso de estas estrategias en el anfibio anuro *Bufo arenarum*.

### C) Fenómenos

Al estudiar los mecanismos implicados en el aprendizaje espacial de los anfibios es importante tratar de hallar paralelismos con otras formas de aprendizaje. Para determinar estos paralelismos resulta útil seleccionar un grupo de cuatro efectos básicos del aprendizaje: (i) el **efecto de la proximidad de la clave al refuerzo**, (ii) el **bloqueo** entre claves, (iii) el **ensombrecimiento** entre claves y (iv) la **inhibición latente**. Así, debería ser posible modular la fuerza de la asociación de manera predecible manipulando las variables que son efectivas en los paradigmas de aprendizaje estándar (Loy et. al., 2006). La presencia de estos fenómenos ha sido ampliamente demostrada en mamíferos (Chamizo, 2002), sin que existan datos en anfibios hasta este trabajo.

Una breve descripción de los fenómenos a probar en aprendizaje espacial en anfibios:

(i) El efecto de la ***proximidad*** entre el estímulo condicionado (EC) y el estímulo incondicionado (EI) en un experimento de condicionamiento es bien conocida: el condicionamiento mejora a medida que el intervalo entre EC y EI decrece. La contingencia espacial ente EC y el refuerzo tiene un efecto fuerte dado que la

función del condicionamiento es asociar eventos relacionados causalmente. (Mackintosh, 1983). Se buscó establecer la presencia de este efecto variando la distancia de las claves visuales ambientales al refuerzo.

(ii) El fenómeno de ***bloqueo*** se observa cuando el establecimiento previo de un elemento de una clave compuesta como señal del reforzador reduce o "bloquea" lo que se puede aprender acerca del segundo (Kamin, 1969). Así, el entrenamiento previo con una sola de las claves bloquea la asociación del refuerzo con la otra clave cuando, en una segunda fase del experimento, ambas claves son presentadas simultáneamente señalando la posición del refuerzo. Se estableció si este fenómeno se da entre claves visuales espaciales en anfibios.

(iii) El ***ensombrecimiento*** es un fenómeno importante ya que muestra que la mera contigüidad no es suficiente para promover el condicionamiento (Loy et. al., 2006). Este fenómeno se refiere al hecho de que una segunda clave, muy conspicua y saliente, causa que los animales aprendan menos acerca de una primera clave de lo que lo habrían hecho si se los hubiese entrenado sólo con ella. Se buscó determinar si una clave visual espacial puede ensombrecer a otra en una situación de aprendizaje espacial.

(iv) Cuando un sujeto es expuesto repetidamente a un estímulo neutro, el condicionamiento subsecuente se ve retardado cuando ese estímulo se utiliza como estímulo condicionado, efecto conocido como ***inhibición latente***, y refleja una pérdida de atención a un estímulo familiar (Loy et. al., 2006). La posibilidad de que la exposición a una clave visual ambiental genere una inhibición latente en una posterior situación de aprendizaje también fue explorada en esta tesis.

### D) Bases Neurales

El estudio comparado del cerebro y la conducta ha estado históricamente sesgado por la legendaria idea de que la evolución de los vertebrados sigue una progresión lineal de de las formas "inferiores" a las "superiores" (peces, anfibios, reptiles, aves, mamíferos, primates y, en el pináculo, humanos; Hodos & Campbel, 1969, 1990; Deacon, 1990) (Salas et al., 2003). Esta "escala naturae" de vertebrados se caracteriza por una complejidad creciente y un avance en la organización cerebral, inteligencia y capacidades cognitivas.

Acorde a esta visión los grupos de vertebrados más “primitivos” o “menos evolucionados” (peces y anfibios, denominados en la actualidad vertebrados *filogenéticamente más antiguos*) se supone que han desarrollado circuitos neurales relativamente simples que subyacen las formas elementales de comportamiento. En contraste, los grupos “más recientes” (mamíferos, denominados en la actualidad vertebrados *filogenéticamente más recientes*) se cree que han desarrollado circuitos cerebrales adicionales más complejos y avanzados, que sustentan ajustes comportamentales y habilidades cognitivas más sofisticadas. Desafortunadamente, aunque parezca anacrónico, esta concepción acerca de la evolución de los vertebrados está muy arraigada en distintos campos de las neurociencias y la psicología comparada (Salas et al., 2003).

La biología evolutiva moderna provee una visión muy diferente acerca de la evolución de los vertebrados. Más que una representación lineal de complejidad creciente, los vertebrados comprenden un grupo muy diverso en términos de especializaciones morfológicas y funcionales, lo que incluye varias radiaciones paralelas derivadas de un grupo ancestral de peces que han evolucionado separadamente por al menos 400 millones de años (Carroll, 1988). El cerebro de los vertebrados muestra una gran diversidad y variedad de adaptaciones especializadas. El grado de variación, evidente en las especializaciones comportamentales, se ha ido desarrollando a lo largo de una larga historia de ramificaciones filéticas y diversificación. Sin embargo, no todos los rasgos comportamentales y neurales tienen que haber cambiado necesariamente durante el curso de la evolución. Debido a que estas radiaciones comparten un ancestro evolutivo en común, del cual todos estos grupos han heredado algunos rasgos de la organización cerebral y comportamental, los cerebros de los vertebrados existentes son como un mosaico de características primitivas y derivadas (Northcutt, 1981, 1995; Nieuwenhuys et al., 1998). Mucha evidencia genética, neuroanatómica, neuroquímica, embrionaria, neurofisiológica y comportamental indica que existe un grado considerable de invarianza filética de estructura y función en el cerebro de los vertebrados (Northcutt, 1995; Butler & Hodos, 1996; Nieuwenhuys et al., 1998) (Salas et al., 2003).

Dado que la cognición espacial ha probado ser un campo fértil para la investigación de la neurobiología comparada, la hemos tomado como paradigma experimental. En la presente tesis plantearemos resultados que sugieren que las habilidades de cognición

espacial y sus bases neurales podrían ser más conservativas que lo pensado hasta la actualidad.

### E) Laberintos

Para el estudio de las habilidades espaciales los dispositivos experimentales que se utilizan son los laberintos. Estos laberintos vienen en todos las formas y tamaños, desde los campos abiertos donde la exploración no está restringida hasta los caminos predeterminados del laberinto radial o laberinto en T. La mayoría de los laberintos están diseñados para esclarecer aspectos particulares del aprendizaje espacial y la memoria. Generalmente, los animales deben aprender qué lugar provee seguridad, alimento o algún otro objetivo deseable utilizando claves visuales distribuidas en el espacio. Sin embargo, intencionalmente o inadvertidamente, los laberintos son capaces de detectar una variedad de otros procesos cognitivos, incluyendo aprendizaje asociativo, memoria no espacial, orden temporal, discriminación condicional o ansiedad (Hodges, 1996).

Dentro de la variedad de laberintos disponibles, el laberinto en cruz es el más indicado para explorar el uso de distintos mecanismos para el aprendizaje de lugar, que no sean del uso de claves visuo-espaciales alocéntricas (Hodges, 1996). Por otro lado, en los laberintos “abiertos” las estrategias de búsqueda son más fáciles de detectar y cuantificar. Los animales normales inicialmente comienzan haciendo círculos alrededor, pegados a las paredes, y luego comienzan a pasar progresivamente una mayor proporción del tiempo en el cuadrante central reforzado, tomando hacia el final de la adquisición un camino directo hacia el refuerzo (Hodges, 1996).

Para los distintos experimentos que se llevaron a cabo en esta tesis, se seleccionaron, entonces, un laberinto en cruz (variedad de laberinto radial) y un campo abierto u “*open field*”.

Cabe aclarar que analizando el desempeño de los anfibios en este tipo de laberintos se ha observado que, a diferencia de las ratas, los anfibios no han presentado respuesta de tigmotaxis, o tendencia a aferrarse a las paredes del laberinto (Muzio y Daneri,

observación personal). En ratas esta respuesta está relacionada con una respuesta de pánico, que disminuye a medida que los animales aprenden la tarea (Hodges, 1996).

Es importante señalar que el laberinto radial y el campo abierto difieren profundamente en las tasas de adquisición. Un aprendizaje de lugar significativo se puede lograr en sólo 10 ensayos en un laberinto de agua (o laberinto de Morris), mientras que se requieren cerca de 50 ensayos de adquisición en los procedimientos en laberinto radial en ratas (Jarrad, 1986). Es de esperar que este fenómeno también aparezca en anfibios. Esta particularidad en la dinámica temporal hace que cada laberinto sea ideal para probar distintos fenómenos. Por ejemplo, para cambios en el funcionamiento cerebral tales como lesiones, efecto del consumo crónico de alcohol, envejecimiento o crecimiento de transplantes cerebrales el aprendizaje en un laberinto radial se puede utilizar para determinar el curso temporal de los cambios en una manera que es imposible en un laberinto abierto (Hodges, 1996). Por esto se planteó, en esta tesis, el uso de dos tipos distintos de laberintos: un **laberinto en cruz** (con un arreglo espacial en T) y un **campo abierto**, a fin de determinar los procesos cognitivos involucrados en tareas espaciales aparentemente simples.

## 2. Los Anfibios Anuros

### A) Los anfibios y el uso del espacio

"Anfibio" representa el estado de transición entre el modo de vida acuático y terrestre entre los vertebrados. Algunas especies conservan el hábitat acuático ancestral durante todos los estadios de sus vidas. Pero la mayoría evolucionó hacia un ciclo de vida complejo con (a) huevos y larvas acuáticas y (b) juveniles y adultos terrestres. Mientras que otras se independizaron completamente de los estadios acuáticos en su desarrollo (Duellman & Trueb, 1986).

Este cambio de hábitat genera movimientos a través de largas distancias tales como la dispersión post-metamórfica desde los sitos de nacimiento y las migraciones entre distintas áreas, que forman parte de la historia de vida de la mayoría de las especies de

anfibios. Las larvas acuáticas se desplazan regularmente entre los sitios proveedores de alimento, refugio y otros recursos. Ya durante la metamorfosis, las larvas de las especies terrestres se orientan hacia la orilla y una vez juveniles se dispersan en las áreas adyacentes, frecuentemente alcanzando lugares a varios kilómetros de distancia de su sitio natal (Duellman & Trueb, 1986).

Una vez adultos los anfibios se desplazan mucho en el hábitat que los rodea, básicamente motivados por la búsqueda de pareja y agua. El sapo común Europeo *Bufo bufo* migra una distancia de hasta 3 km para reproducirse. Los sujetos de una determinada población vuelven a los mismos sitios de cría en la primavera de cada año y desovan de manera sincrónica en un período de unos pocos días. A pesar de que se han llevado a cabo varios estudios acerca de la migración de *B. bufo* durante la época de cría, muy poco se conoce acerca de las claves que utilizan estos animales durante el proceso (Sinsch, 1987).

La máxima distancia de dispersión registrada en anfibios es de 35 km (*Bufo marinus*, Freeland & Martin, 1985), pero el rango migratorio promedio de los adultos va desde unos pocos metros en las salamandras sedentarias hasta los 15 km en la rana *R. lessonae* (Tunner, 1992).

Los movimientos de los anfibios están guiados generalmente por una conducta de orientación para elegir la distancia más corta hacia la meta con el objetivo de minimizar el riesgo de predación y desecación. Los individuos de muchas especies desplazados pasivamente son capaces de relocalizar sitios conocidos utilizando una variedad de claves direccionales y de mecanismos de orientación (Sinsch, 2006). Esto, sumado al escaso estudio realizado en este grupo, hace que los anfibios sean ideales para el estudio de las habilidades espaciales.

### B) Biología de los anfibios anuros

Los anfibios fueron el primer grupo de vertebrados que colonizaron el medio terrestre durante la mayor parte de su ciclo de vida. Sin embargo, aun conservan una gran dependencia con el medio acuático, ya sea durante la vida larval, momento en que la dependencia con dicho medio es total, o durante la vida post-metamórfica, donde el

contacto con un medio acuático, al menos en determinados períodos, se torna indispensable para la supervivencia y la reproducción (Duellman & Trueb, 1986).

Entre el 70 y el 80% de la masa corporal de los anfibios está conformada por agua (Duellman & Trueb, 1986). En general, estos animales no ingieren agua por la boca (Bentley, 1966), sino que el ingreso de la misma es a través de la piel. Asimismo, es también la piel de los animales la que funciona como la vía principal de pérdida de agua (Shoemaker & Nagy, 1977). Se ha descripto la zona ventral de estos animales, llamada *parche pélvico*, como la principal vía de ingreso de agua a su organismo (Baldwin, 1974). Dicha zona es altamente permeable y presenta glándulas mucosas dérmicas, que mantienen la piel en constante humedad y una vascularización mayor que la del resto del cuerpo. Esta hipervascularización del parche pélvico ha demostrado ser potencialmente regulable por el propio organismo dentro de un cierto rango (a mayor vascularización, mayor captación de agua). Así, el animal tendría la capacidad de incrementar la permeabilidad de la piel en tiempos favorables, aumentando la absorción del agua cuando se encuentra en contacto con una solución adecuada para rehidratarse (Duellman & Trueb, 1986).

Los anfibios que son capaces de explotar exitosamente el medio terrestre captan agua a través de la piel para reemplazar la pérdida por evaporación. Los anuros terrestres han evolucionado una variedad de adaptaciones comportamentales y fisiológicas para mantener este balance acuoso bajo control. Las adaptaciones comportamentales para minimizar la pérdida de agua incluyen el forrajeo nocturno y el permanecer bajo tierra en refugios húmedos durante el día (Dall´Antonia & Sinsch, 2001).

Suele ocurrir que si una sequía es prolongada la pérdida de agua supere a la captación de agua, ya que los refugios gradualmente van desecándose. Observaciones a campo en *Bufo calamita* han revelado que una pérdida del 5 al 10% del peso inicial por desecación disparaba una conducta compensatoria: luego de períodos de inactividad de 2 semanas los sapos abandonaban sus refugios y se movían directamente 4 a 27 metros hacia las orillas húmedas de las charcas a rehidratarse (Sinsch, 2006). Esta búsqueda de agua está orientada a una meta y es fácilmente inducible en condiciones de laboratorio.

### C) El sapo común *Bufo arenarum*

Analizando la distribución de las poblaciones del sapo terrestre *Bufo arenarum* en la provincia de Buenos Aires, la mayoría se encuentran separadas entre sí de 1 a 2.5 km. Durante los períodos de lluvia se encuentran disponibles muchas charcas de agua dulce en el área como potenciales sitios para la reproducción. Como resultado de un estudio con animales marcados se ha visto que se pueden llegar a trasladarse hasta 1.5 km para llegar a las charcas y encontrar una pareja. En una temporada reproductiva exitosa llegan a recorrer grandes distancias con el fin de reunirse en estas charcas (Gallardo, 1974). Luego de estos eventos de apareamiento los animales son capaces de volver a su propio territorio.

*Bufo arenarum* se halla distribuido en la totalidad de la provincia de Buenos Aires (*B. a. platenses*, en zona de influencia del río Paraná y Río de la Plata). Su canto (indicador de actividad) se oye desde agosto hasta abril en lagunas, charcas y lagos. En invierno son sedentarios y se esconden (se ocultan en cuevas o se los encuentra entre maderas, bajo chapas, etc.) (Gallardo, 1987). En los meses de actividad salen de sus refugios en el crepúsculo, teniendo su actividad más intensa durante la noche.

Macho adulto de *Bufo arenarum*
Foto de Richard Sage para AmphibiaWeb

El sapo común *Bufo arenarum* es un sujeto experimental muy útil. Su distribución geográfica es muy amplia, es de fácil mantenimiento en cautiverio y presenta una alta tolerancia a las condiciones experimentales, una condición más que deseable para llevar a cabo análisis neuro-comportamentales.

Además, está clasificada como especie de Preocupación Menor (LC) - taxones abundantes y de amplia distribución- en la lista roja de estatus de la IUCN (International Union for Conservation of Nature).

## 3. Estudio del Aprendizaje Espacial en Anfibios

Además de estos trabajos de campo, el aprendizaje espacial y las capacidades de memoria de los anfibios pueden ser analizados de manera más detallada con experimentos de laboratorio.

Poco es lo que se encuentra en la bibliografía referente a estudios de aprendizaje en anfibios, a pesar de ser un grupo particularmente interesante dada su condición de mediadores entre vertebrados acuáticos y terrestres (Macphail, 1982; Muzio, 1999). La razón principal de esta falencia se centra en la dificultad que significó, durante mucho tiempo, encontrar para las especies de este grupo condiciones de entrenamiento que logren un nivel de motivación y de respuesta conductual adecuados (Boice et al., 1974; Mackintosh, 1974; Muzio, 1999; Thompson & Boice, 1975).

Sin embargo, se han publicado algunos trabajos donde se refleja la capacidad de aprendizaje de los anfibios. Por ejemplo, un estudio (Adler, 1980) reveló que la rana verde (*Rana calamitans*) es capaz de utilizar claves visuales estáticas y memorizar patrones motores como claves de orientación cuando son entrenadas y evaluadas de manera repetida en una arena. También, en otro trabajo (Lüddecke, 2003), se reportó aprendizaje espacial en la rana andina (*Colostethus palmatus*), utilizando una prueba de localización de una serie de 24 cuevas de distinta calidad en un ranario comunal. Trabajando con el sapo común (*Bufo bufo*) en una prueba de desplazamiento se pudo establecer que la visión (o sea, claves visuales del ambiente) era necesaria para mantener el rumbo de regreso hacia el punto de partida (Sinsch, 1987).

Un estudio con el sapo corredor (*Bufo calamita*) ha mostrado la capacidad de orientación de esta especie en una arena octogonal utilizando claves multisensoriales (visuales, magnéticas, olfatorias) (Dall'Antonia & Sinsch, 2001). En otro trabajo (Greding, 1971) se realizó una comparación del desempeño de tres especies de ranas (*Rana clamitans, R. boylei* y *R. pipiens*) y tres especies de sapos (*Bufo marinus, B. valliceps* y *B.*

*woodhousei fowleri*) en un laberinto en T, donde tenían que escapar un estímulo aversivo eléctrico (el brazo derecho era el único seguro, sin descarga eléctrica). Allí se observó que los sapos tuvieron un mejor desempeño que las ranas, aunque las seis especies pudieron aprender la tarea de orientación espacial. La capacidad de aprendizaje en un laberinto en T también fue probada utilizando agua como reforzador en el sapo de vientre de fuego *Bombina orientalis* (Brattstrom, 1990), observándose una orientación en el espacio del 100% de los individuos tras 40 ensayos de entrenamiento. Toda esta bibliografía muestra que los anfibios son capaces de orientarse en el espacio, pero al mismo tiempo también revela lo poco que se conoce acerca de los mecanismos que subyacen a este tipo de aprendizaje.

Para trabajar con anfibios es necesario plantear un paradigma experimental adecuado que se ajuste a la biología particular de la especie, hasta hace poco tiempo no existían paradigmas experimentales adecuados de estimulación en anfibios en general, ni tampoco en el sapo común *Bufo arenarum* en particular (Muzio, 1999). Por lo tanto, trabajar con esta especie implicó la selección de un estímulo adecuado a las características biológicas de la misma. Estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio indican que la piel del sapo *Bufo arenarum* posee sensibilidad a los electrolitos en solución y que existe un control nervioso de la permeabilidad al agua durante la rehidratación (Reboreda & Segura, 1984). En dichos estudios se observó que los animales manifestaban variaciones en determinadas conductas (como la actividad corporal, la disponibilidad para captar agua o el tiempo de permanencia en la misma) según la solución a la que eran expuestos, definiendo una solución apetitiva a una solución de 0 a 0.25M NaCl donde los animales ganan peso y manifiestan comportamientos típicos de apetitividad.

Basados en estos antecedentes, se planteó entonces la utilización de agua como reforzador (hecho que cobra gran importancia al estar relacionado en forma directa con la historia evolutiva y la biología de la especie).

Así, utilizamos un modelo experimental con agua como reforzador y donde se utiliza una deshidratación moderada (aproximadamente 20% del *peso estándar* -peso del animal totalmente hidratado con sus vejigas vacías; Ruibal, 1962) como estímulo para motivar a los sapos en la búsqueda de agua. Para brindar acceso a la misma, se utilizó una pileta con

agua en el entorno artificial en que se plantearon los experimentos (laberintos). Cabe aclarar que se seleccionó ese valor de deshidratación, ya que los sapos desecados pueden minimizar la pérdida de agua a través de la piel permaneciendo quietos y esperando condiciones más favorables, o iniciar la búsqueda de agua afrontando el precio de aumentar la evaporación, el riesgo de predación y una posible búsqueda fallida. Ambas decisiones ofrecen beneficios y riesgos para la supervivencia, dependiendo del grado de pérdida de agua y la tolerancia a la deshidratación individual. Las reglas de decisión de los sapos suelen estar bien definidas: si la pérdida de agua es leve (3 a 10 ⁄ del peso inicial) prefieren quedarse quietos y esperar; sin embargo, si la pérdida de agua excede ese porcentaje y alcanza el límite individual de tolerancia salen en la búsqueda de agua (Dall´Antonia & Sinsch, 2001).

El uso de la combinación de la deshidratación y el refuerzo de agua llevan a un aprendizaje exitoso en los animales: en respuesta al entrenamiento la tasa de respuestas erróneas disminuye, esto ya se ha observado en otros trabajos con anfibios (ver Dall´Antonia & Sinsch, 2001).

Utilizando este mismo modelo experimental, se han desarrollado exitosamente en nuestro laboratorio una serie de estudios de aprendizaje asociativo y sus bases neurales en el sapo *Bufo arenarum* utilizando varios procedimientos de entrenamiento no espaciales (Muzio et al., 1992; 1993; 1994; 2006; Papini et al., 1995; Daneri et al., 2007).

A la hora de terminar de definir el modelo experimental también hay que tener en cuenta la base sensorial de la orientación en anfibios: en los anfibios la orientación espacial se logra mediante la integración de claves acústicas, magnéticas, mecánicas, olfatorias y visuales en un sistema multisensorial redundante. La visión es una vía de entrada de información muy importante para este grupo de vertebrados para la percepción de claves direccionales en todos los estadios del desarrollo (Sinsch, 2006). Existen dos tipos de claves visuales: las <u>claves fijas</u> como siluetas de bosques o líneas costeras y las <u>claves celestes de movimientos periódicos</u> tales como el sol, la luna, las estrellas y los patrones de polarización de la luz solar. El rol específico de cada una de ellas en la orientación en el terreno difiere entre las especies y también depende del tipo de clave (las claves celestes requieren de una compensación por su movimiento aparente antes de ser utilizadas como referencia direccional) (Sinsch, 2006). Aparentemente, las

claves fijas serían de mayor relevancia a la hora de orientarse. En un experimento de desplazamiento en *Bufo bufo* se observó que a la hora de orientarse los sujetos pueden mantener una dirección de migración muy clara utilizando únicamente la visión de claves fijas cuando las celestes no están disponibles (Sinsch, 1987). Por esta razón se utilizaron claves visuales fijas en los experimentos planteados en esta tesis.

## 4. Objetivos

Hasta ahora, los mecanismos y sistemas de orientación espacial en anfibios no son conocidos en la mayoría de los casos. En la presente tesis se llevaron a cabo una serie de experimentos con el fin de hacer un estudio profundo acerca del fenómeno de aprendizaje espacial en el sapo *Bufo arenarum*.

- En el *primer capítulo* se diseñaron tres experimentos para establecer las *Estrategias* utilizadas. En los primeros dos experimentos, se probaron dos tipos de estrategias: la habilidad para utilizar patrones motores memorizados (estrategia de orientación mediante **giro**) y la habilidad para utilizar claves ambientales visuales fijas (estrategia de **guía**). El tercer experimento fue desarrollado con el fin de probar cuál de estas dos estrategias es la dominante en una situación de aprendizaje en laberinto.
- En el *segundo capítulo* se plantearon cuatro experimentos con el fin de determinar qué *Fenómenos* básicos del aprendizaje, previamente observados en mamíferos, están presentes en el aprendizaje espacial de anfibios cuando se utilizan claves visuales. Los fenómenos estudiados fueron: efecto de la **proximidad espacial entre la clave y el refuerzo**, **bloqueo**, **ensombrecimiento** e **inhibición latente** entre claves.
- Para terminar, en el *tercer capítulo* se estudió las *Bases Neurales* del aprendizaje espacial en anfibios. Para ello se plantearon dos experimentos para determinar el efecto de la lesión de **pallium medial** (estructura homóloga al hipocampo de los mamíferos) en las estrategia de guía y de orientación.

Podemos decir, entonces, que el *objetivo general* del presente trabajo fue examinar la capacidad de aprendizaje espacial que posee esta especie, poniendo énfasis en la comparación con lo observado en mamíferos. Los *objetivos particulares* que se plantearon fueron los siguientes:

- Determinar qué estrategias (**giro** - **guía**) utiliza el sapo común *Bufo arenarum* para orientarse en el espacio y establecer si existe un predominio de alguna de las estrategias utilizadas.
- Detectar la presencia de los fenómenos básicos del aprendizaje espacial observados en otros vertebrados (efecto de **proximidad espacial clave-refuerzo**, **bloqueo**, **ensombrecimiento** e **inhibición latente**).
- Explorar las bases neurales del aprendizaje espacial en *Bufo arenarum* mediante lesiones en áreas homólogas implicadas en el aprendizaje espacial en mamíferos.

# Estrategias

## Introducción

Los patrones de movimiento de los individuos son componentes fundamentales de la ecología y biología poblacional de una especie (Duellman & Trueb, 1986). Para la especie *Bufo arenarum* la mayoría de las poblaciones en la provincia de Buenos Aires se encuentran separadas de 1 a 2.5 Km entre sí. Durante los períodos de lluvias muchos cuerpos de agua dulce están disponibles en el área para la reproducción. Un experimento de marcación de sujetos reveló que estos animales pueden desplazarse hasta 1.5 Km para acceder a los cuerpos de agua dulce o charcas y hallar una pareja. Para que la temporada reproductiva sea exitosa los sujetos se deben congregar en estas charcas, para lo que deben recorrer largas distancias (Gallardo, 1974). Luego de estos eventos de apareamiento los sujetos deben ser capaces de retornar a sus propios territorios. Esta habilidad es conocida como "homing behavior" o conducta de regreso al hogar, e implica la habilidad de retornar a un área conocida luego de las actividades reproductivas o de algún otro tipo de búsqueda (Duellman & Trueb, 1986).

Varios estudios han demostrado que los mamíferos y las aves pueden utilizar diferentes estrategias de orientación en el espacio basadas en múltiples sistemas de aprendizaje con el fin de orientarse en el espacio y desarrollar estas conductas de regreso (López et al., 1999).

Una explicación extensiva de la orientación espacial en animales fue dada por el concepto de sistema de taxones, proveyendo un marco de análisis de este problema para describir experiencias de aprendizaje en situaciones controladas de laboratorio. Los sistemas taxonómicos, basados puramente en estrategias denominadas egocéntricas, incluyen la guía y la orientación. Mientras que las **estrategias de guía** involucran el acercamiento o alejamiento de una clave en particular, la **orientación** implica un giro tomando como referencia el propio cuerpo (i.e., hacia la derecha, hacia la izquierda) en respuesta a una clave. Las propiedades de estos dos sistemas ya han sido ampliamente estudiadas en mamíferos (Nadel, 1991; O'Keefe & Nadel, 1978) y aves (Bingman, 1990; Bingman et al., 1989). Sin embargo, hasta el momento, la relevancia de tales sistemas no es conocida para la mayoría de los anfibios.

A pesar de la importancia que poseen los estudios comparativos para comprender la estructura y función del aprendizaje espacial y los sistemas de memoria en vertebrados (Bingman, 1992, Sherry & Schacter, 1987), sólo unos pocos estudios han investigado los

mecanismos del aprendizaje espacial en otros grupos de vertebrados tales como peces (Lopez et al., 1999), tortugas (Grisham & Powers, 1990; Lopez et al., 2003) y lagartijas (Day et al., 2003). En el caso de los anfibios, algunos estudios naturalísticos de la conducta migratoria sugieren que son capaces de utilizar distintas estrategias espaciales, similares a aquellas observadas en mamíferos. Los movimientos de los anfibios son guiados, usualmente, por conductas de orientación a elegir la distancia más corta hacia el objetivo, con el fin de minimizar el riesgo de predación y disecación (Sinsch, 2006). Los individuos de muchas especies desplazados pasivamente de su territorio son capaces de relocalizar estos sitos conocidos utilizando una variedad de claves direccionales y mecanismos de orientación. En los anfibios, la orientación se logra integrando claves acústicas, magnéticas, mecánicas, olfativas y visuales en un sistema multisensorial redundante, como fue inicialmente propuesto por Ferguson (1971). El orden de importancia de las entradas sensoriales obtenidas de las potenciales claves ambientales es especie-específico y, a veces, población-específico y su función es optimizar la información disponible en los distintos hábitats (Sinsch, 2006). Esta clase de análisis provee información desde una aproximación ecológico-ambiental.

En forma complementaria a estos estudios de campo, el aprendizaje espacial y las capacidades de memoria de los anfibios pueden ser examinados más en detalle en experimentos de laboratorio. Por ejemplo, Adler (1980) reveló que las ranas verdes (*Rana calamitans)* son capaces de utilizar claves ambientales fijas (una caja-meta y/o una luz) y patrones motores fijos como claves para orientarse cuando eran entrenadas y probadas repetidas veces en una arena circular. También han sido reportadas habilidades de aprendizaje espacial en la rana *Colostethus palmatus* (Lüddecke, 2003). Utilizando la asociación con distintas calidades de cueva ofrecidas en un paludarium (dispositivo con 24 cuevas comunales), se observó que el tiempo de búsqueda de una cueva disponible decrecía con el aumento del número de ensayos, lo que sugiere que las ranas estarían aprendiendo a localizar una meta memorizando un patrón motor exitoso utilizado en un ensayo anterior en combinación con alguna o varias claves ambientales de referencia.

En este trabajo, se presentan a continuación tres experimentos diseñados para determinar las estrategias utilizadas por el sapo común *Bufo arenarum* para el aprendizaje espacial, usando agua como reforzador. En los primeros dos experimentos fueron testeadas dos tipos de estrategias. En el Experimento 1 se probó la habilidad para utilizar un patrón motor memorizado (orientación mediante la ejecución de un giro teniendo un sistema de referencia

egocéntrico –i.e., centrado en su propio cuerpo). En el Experimento 2 se probó la habilidad para utilizar una clave ambiental fija como guía (acercarse o evitar una clave visual particular). El Experimento 3 fue planteado con el fin de determinar cuál de estas dos estrategias (“giro” o “guía”) es dominante en una situación de aprendizaje en un laberinto. Los animales fueron entrenados con una clave visual localizada en una posición fija en relación a un giro centrado en el cuerpo del animal (ej., clave visual siempre a la derecha del animal). Posteriormente, en los ensayos de prueba, se presentó información contradictoria (disociando la repuesta de giro de la clave visual), a fin de revelar qué estrategia es más relevante para el sistema de orientación de esta especie.

# Experimento 1

# Estrategia de Giro (auto-referencia)

## Introducción

El sistema clásico de elecciones alternativas en laberintos el T ha sido utilizado por muchos años en ratas, ratones, gusanos, lombrices y una gran variedad de otros organismos, incluyendo diferentes especies de anuros (Greding, 1971). La tarea típica es la de alternancia en un entorno sin claves visuales que permitan la orientación en el espacio (Dudchenko & Davidson, 2002). En el presente trabajo se ha utilizado una variante del paradigma de laberinto en T clásico planteado por Douglas en 1966. En ese procedimiento clásico, un animal es colocado en la base de la T y se le permite avanzar y entrar en el brazo derecho o izquierdo. El animal luego es retirado del brazo por el experimentador y colocado de nuevo en el punto de partida. Avanza por el corredor de nuevo y al brazo opuesto que selecciono en el ensayo anterior. Este procedimiento se conoce como "alternancia" (Dudchenko & Davidson, 2002). Para este trabajo no se ha trabajado con alternancia, sino con el aprendizaje de elección de uno de los brazos.

Existen registros previos de este tipo de aprendizaje en anfibios. En los experimentos llevados a cabo por Greding (1971) se aplicaba una ligera descarga eléctrica a lo largo del eje de la T (corredor de salida) y en el brazo izquierdo. Los animales eran enfrentados a la elección de tomar a la izquierda (donde continuaba la descarga eléctrica) o a la derecha (donde no había descarga). No se utilizó en estos trabajos un sistema de recompensas, ya que se asumió que el interés principal de los animales era el de escapar de la descarga eléctrica. Las seis especies de anuros estudiadas por Greding demostraron capacidades de aprendizaje, teniendo el género *Bufo* un mejor desempeño que el género *Rana*.

Por otro lado, los experimentos de Brattstrom (1990) con *Bombina orientalis* demostraron que esta especie de sapo puede aprender rápidamente. Usando un laberinto en T y agua como reforzador en animales parcialmente deshidratados, se observó un aumento en el éxito para recorrer correctamente el laberinto en sesiones sucesivas (i.e., una reducción del número de errores/sesión). En dicho trabajo, en donde se utilizó un laberinto en T con refuerzo en el brazo derecho, el 80⁄ de los animales alcanzaron el criterio de aprendizaje luego de tres sesiones de

entrenamiento (30 ensayos) y todos los sujetos alcanzaron el criterio luego de la cuarta sesión de aprendizaje.

El experimento que se presenta a continuación fue diseñado para probar la capacidad de desarrollar este tipo de aprendizaje en el sapo terrestre *Bufo arenarum*, mediante el uso de una estrategia de giro, utilizando un estímulo apetitivo (agua) como reforzador en un laberinto en cruz (*plus maze*) con animales parcialmente deshidratados.

Además, se exploró en el siguiente experimento la capacidad de reversión de este aprendizaje. La reversión involucra la habilidad para cambiar la respuesta previamente aprendida en congruencia con la reversión de las contingencias de refuerzo. Así, en una situación de reversión el individuo primero aprende a hacer una discriminación (tal como elegir un objeto negro en un problema de discriminación negro-blanco), y luego debe aprender a revertir esta elección (i.e. a elegir el objeto blanco). La capacidad de reversión en anfibios ha sido previamente explorada en el trabajo de Brattstrom (1990) con *Bombina orientalis.* Allí, luego de lograr un entrenamiento en la elección de uno de los brazos del laberinto en T, se incorporó una segunda fase de reversión del aprendizaje. Esta fase de reversión resultó asombrosamente un poco más dificultosa que la adquisición para algunos de los animales: si bien el 80⁄ había alcanzado el criterio de aprendizaje en la tercera sesión, llevó 8 sesiones para que todos los animales lleguen a criterio. Este resultado no se ajusta totalmente a lo observado en otro grupo filogenéticamente antiguo como los peces, donde el período de reversión ha probado ser distinto (al igual que en mamíferos), con animales que rápidamente aprendieron a encontrar el refuerzo en su nueva localización y que mostraron una tendencia a cometer un menor número de errores que durante la fase de adquisición (López et al., 2000 b).

Para analizar más en detalle este fenómeno en anfibios, se decidió entonces incorporar en este experimento una fase de reversión una vez adquirido el aprendizaje.

## Materiales y método

*Sujetos:* Se utilizaron 20 sapos machos adultos de la especie *Bufo arenarum* (o *Rhinella arenarum*) provenientes de la localidad de San Vicente (Provincia de Buenos Aires).

*Selección de los sujetos:* Tras su arribo al laboratorio se realizó una selección de los animales experimentales mediante la aplicación de un examen general de aptitud que consta de los siguientes puntos:

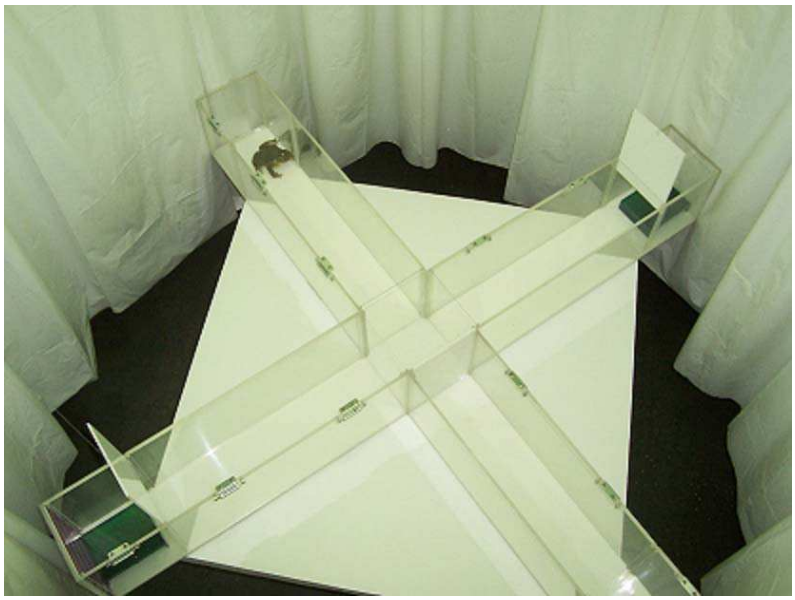
1. Pupilas: comprobar la simetría y reactividad a la luz.
2. Reflejo vestíbulo-ocular: constatar la tendencia del globo ocular a permanecer en la misma posición relativa ante un movimiento de la cabeza en el sentido inferior-superior.
3. Reflejo vestíbulo-cefálico: observar la tendencia de la cabeza a permanecer en la misma posición relativa ante un movimiento en sentido inferior-superior.
4. Abrazo sexual: constatar su existencia y su liberación.
5. Enderezamiento: observar que el animal se endereza inmediatamente al ser colocado en posición cúbito-dorsal.
6. Constatar la presencia de las siguientes respuestas de defensa:
   a. Respuesta de defensa catatónica: inmovilidad de animal al oprimir el esternón.
   b. Respuesta de defensa cefálico "unken": el animal empuja hacia adelante al poner un elemento en contacto con la trompa.
   c. Respuesta de defensa "kicking": el animal da una patada al estimularse los flancos.
7. Marcha a saltos: observar que la marcha del animal sea sin tropiezos.
8. Reflejo de esfínteres: observar liberación de orina durante la manipulación.
9. Canto: verificar su existencia al tomar al animal por sus flancos.
10. Morfología: observar la presencia de simetría general.

*Procedimiento previo general:* Durante 2 semanas, previo al inicio del experimento, los animales fueron habituados a las condiciones de laboratorio. Se los alimentó con alimento balanceado para animales insectívoros (Cedé). Durante la prime semana se la agregó a la comida un desparasitante (Mebutar Compuesto, Lab. Andrómaco, ½ comprimido/200gr de alimento, dosis única) y un antibiótico (Baytril 50mg, Lab. Bayer, 1 comprimido/200gr de alimento, 1 dosis diaria en 7 días continuados) de acuerdo a un protocolo adecuado a la especie (Dr. Troyano, J.C.; comunicación personal).

*Determinación de Peso estándar:* El día previo a comenzar con el experimento se determinó el peso estándar (PS) de los animales. Se define *Peso Estándar* de un animal como el peso del mismo cuando se halla hidratado *ad libitum* pero con sus vejigas vacías (Rubial, 1962). Para el

registro se utilizó una balanza digital Ohaus Scout (rango 0-600g.; precisión 0.1g.) y los valores variaron entre 60 y 105 g.

*Dispositivo experimental:* Se utilizó un laberinto en cruz (de cuatro brazos) o "plus maze" de Plexiglas con piso blanco y paredes y tapas de la parte superior transparentes. Cada brazo de 80 cm de longitud y 12 cm de ancho fue numerado en sentido de las agujas del reloj del 1 al 4. En cada ensayo se utilizaron sólo tres brazos: uno de partida y dos laterales (en un arreglo espacial en T). El compartimento de partida y los compartimentos meta estaban delimitados por una puerta guillotina accionada por el experimentador. Para el entrenamiento se utilizaron azarosamente los dos puntos de partida opuestos del laberinto en cruz (50′ cada uno). Solo en uno de los compartimentos meta se encontraba un recipiente o pileta lleno de agua deionizada que funcionaba como reforzador, en el otro compartimento la pileta poseía agua, pero fuera del alcance del animal (una rejilla evitaba en contacto del animal con el líquido dentro del contenedor). Este procedimiento posee la finalidad de evitar que los animales se guíen hacia la pileta correcta utilizando un gradiente de humedad. El laberinto se ubicó en el centro del cuarto de experimentación, iluminado uniformemente desde arriba. Se encontraba rodeado con cortinas blancas para evitar la visualización de las claves externas. La observación de los animales se realizó desde detrás de la cortina a través de un pequeño visor. El laberinto fue rotado azarosamente entre sesiones para evitar el uso de alguna posible clave interna y fue limpiado entre ensayos, para eliminar potenciales claves olfatorias del ensayo anterior.



Fotografía del laberinto en cruz (*plus maze*)

*Cuarto experimental:* El cuarto experimental tenía una temperatura estándar de 22°C y 50% de humedad relativa. Además tenía un parlante conectado a un generador de ruido blanco (frecuencias entre 20-30.000Hz).

*Procedimiento experimental:* Los 20 animales seleccionados previamente fueron divididos en tres grupos, no registrándose diferencias entre los PSs de los mismos ($F$ (2,17)= 0.09, p= 0.9). Los tres grupos fueron los siguientes:

- Giro a la derecha (n=7)
- Giro a la izquierda (n=7)

  Los animales de este grupo partieron de manera pseudoazarosa de los brazos 1 o 3 del laberinto. La pileta reforzada se encontraba siempre en el brazo de la derecha o de la izquierda, según el animal. Seguir una estrategia de giro fija era necesario para resolver con éxito la consigna.
- Control (n=6): los animales de este grupo también partieron de manera pseudoazarosa de los brazos 1 o 3 del laberinto. La pileta reforzada se encontraba en el brazo de la derecha o de la izquierda, de manera pseudoazarosa.

Los animales de ambos grupos tuvieron 2 sesiones de pre-entrenamiento (1 ensayo cada sesión) y 30 sesiones de entrenamiento (20 de adquisición y 10 de reversión, 3 ensayos cada sesión). Los animales comenzaron los ensayos al 80% de su peso estándar. Esto se logró mediante un proceso de deshidratación diario en jaulas, a fin de aumentar la motivación de los individuos en la búsqueda de agua. Este protocolo de deshidratación es muy utilizado en anfibios y ha demostrado ser no demasiado estresante, e incluso motivante (Battstrom, 1990). Antes y después de cada sesión se registró el peso del animal, calculándose así la variación de peso. Los entrenamientos se realizaron de manera diaria entre las 8:00 y las 13:00hs. Los animales fueron mantenidos en contenedores plásticos individuales durante todo el período experimental.

*Pre-entrenamiento:* Todos los sujetos fueron sometidos a dos días de pre-entrenamiento con el fin de habituarlos a las condiciones experimentales. Durante las sesiones de pre-

entrenamiento los animales podían desplazarse libremente dentro del dispositivo experimental. La duración de cada sesión de pre-entrenamiento fue de 15 minutos.

1. Primera sesión: se colocó al animal en el brazo de partida 1. Los brazos 2 y 4 contenían ambos piletas con agua deionizada. Se colocó una gota de agua deionizada a la salida del compartimento de partida, otra en el punto de decisión (zona central de cruce de los 4 brazos) y otra antes de cada una de las piletas.
2. Segunda sesión: se colocó al animal en el brazo de partida opuesto (brazo 3) con gotas de agua en el punto de decisión y antes de cada pileta.

Si luego de 12 min se observaba que el animal no accedía a ninguna pileta, se lo subió a la más cercana y se lo dejó allí hasta completar los 15 minutos. Durante estas sesiones se observó la tendencia de giro natural del animal, la cual fue contrapuesta durante el entrenamiento (colocando al sujeto en el grupo de giro contrario).

*Entrenamiento:* al día siguiente se inició la fase de entrenamiento diario que constó de 30 sesiones de 3 ensayos cada una. Cada ensayo se iniciaba pesando al animal y colocándolo suavemente en el compartimento de partida con la puerta cerrada. Luego de 20 segundos se abría la puerta guillotina. Cuando el animal abandonaba el compartimento de salida se contabilizaba la Latencia de Partida (tiempo máximo de 3 min). Se observaba en comportamiento del animal en el laberinto y se registraba el Tiempo de Recorrido (hasta que se subía a una pileta o un tiempo máximo de 3 min) y el Tipo de Respuesta (Correcta si accedió a la pileta reforzada, Incorrecta si no). Una vez que accedía a alguna de las piletas se cerraba la puerta guillotina de ese compartimento y se le daba entonces al animal un tiempo de 2 min de acceso a la pileta. Así se daba por concluido el ensayo. El intervalo entre ensayos fue de 2 minutos (donde el animal permanecía en su contenedor individual). Una vez finalizada la sesión (3 ensayos) el animal era retirado del laberinto, pesado y devuelto finalmente a su recipiente hasta el día siguiente.

En caso de ensayo erróneo, se dejaba al animal 1 minuto en contacto con la pileta no reforzada con la puerta del compartimento cerrada (tiempo de penalización), luego de ese período se procedía a realizar un ensayo guiado. En este ensayo guiado se estimulaba al animal a caminar por el brazo hasta el punto de decisión y seleccionar el brazo correcto hasta acceder a la pileta reforzada, donde permanecía 2 minutos.

El piso del laberinto en cruz fue limpiado con un trapo húmedo luego de cada ensayo, al igual que las paredes. Este es un procedimiento utilizado generalmente para eliminar el uso de claves de olor para la orientación (Adler, 1980).

Se estableció un Criterio de Aprendizaje: este criterio fue de un mínimo del 75% de respuestas correctas en 3 sesiones consecutivas (7 de 9 ensayos correctos). Una vez alcanzado el criterio de aprendizaje (Adquisición) se procedió a la fase de Reversión (i.e., si el animal encontraba el refuerzo girando a su derecha, ahora el refuerzo se encontraba girando a la izquierda). El mismo criterio de aprendizaje se aplicó para dar fin a esta fase.

*Análisis de las variables:* Las variables dependientes que se registraron durante los ensayos fueron:

1. *Tiempo de recorrido*: tiempo que tarda el animal desde que sale del compartimento de partida hasta que ingresa a alguno de los dos compartimentos meta. Tiempo máximo: 3 minutos.
2. *Tipo de Respuesta: correcta (elección del compartimento con pileta reforzada) o incorrecta (elección del compartimento con pileta sin refuerzo)*. Esta variable se expresó como % de Respuestas correctas por sesión.
3. *Número de errores hasta criterio de aprendizaje* para las fases de adquisición y reversión.
4. *Peso pre y post sesión:* peso del animal al iniciar y al finalizar cada sesión. Con estos datos se obtuvo la *variación de peso* absoluta (peso post sesión – peso pre sesión). Esta diferencia de peso fue luego dividida por el peso estándar del animal y multiplicada por 100. Esto brinda una medida relativa de la variación de peso, o sea, de la captación de agua por parte del animal.

*Estadística:* Las dos variables dependientes % de respuestas correctas por sesión y variación del peso por sesión, se registraron durante la adquisición y la reversión. Las mismas estuvieron sujetas a un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido de una comparación de a pares utilizando el test LSD (Least Significant Difference). En todos los casos para estas comparaciones la significancia fue evaluada estableciendo el valor de alfa en el nivel 0.05.

## Resultados

El tiempo de recorrido promedio para cada sesión de entrenamiento no reveló diferencias significativas en los tres grupos (datos no mostrados). Un ANOVA para la fase de adquisición no indicó diferencias a lo largo de las sesiones ni entre grupos (*ps*>0.05). Al analizar la fase de reversión tampoco aparecieron diferencias en la primera sesión, ni durante las sesiones o entre los grupos (*ps*>0.05). Podemos observar así que esta variable no mostró cambios significativos a lo largo del entrenamiento.

La *Figura 1* presenta el ⁄ de respuestas correctas por sesión de entrenamiento para cada grupo. Cada punto en el gráfico es el promedio de los datos recolectados para todos los animales del grupo correspondiente. Un ANOVA global para la fase de adquisición revela diferencias significativas entre los grupos ($F$ (2, 17)= 8.23, $p$<0.001), con un aumento significativo del ⁄ de respuestas correctas en el tiempo *(*$F$ (19, 323)= 2.40, $p$<0.01). Un análisis a posteriori de a pares confirmó que la diferencia entre grupos se debía a diferencias entre los grupos de Giro y el grupo Control (giro a la derecha vs giro a la izquierda: $p$>0.05, giro a la derecha vs control: $p$<0.01, giro a la izquierda vs control: $p$<0.01). Durante la sesión 1 no se presentaron diferencias significativas en el desempeño de los grupos ($F$ (2,17)= 1.62, $p$>0.1), la diferencia entre los grupos giro y el grupo control aparecieron durante las últimas tres sesiones del período de adquisición (sesiones 18, 19 y 20, ANOVA de medidas repetidas Grupo x Sesión, $F$ (2,17)= 18.53, $p$<0.001, sin efecto de Sesión o Interacción, $p$=0.97, $p$=0.82. Comparación de a pares a posteriori para estas tres sesiones: giro a la derecha vs giro a la izquierda: $p$>0.1, giro a la derecha vs control: $p$<0.001, giro a la izquierda vs control: $p$<0.001). Esto sugiere que los animales de los grupos Giro aprendieron la estrategia de girar siempre en un mismo sentido para alcanzar la meta.

El período de reversión reveló un patrón de respuestas similar, sin diferencias significativas entre los grupos durante la primer sesión (sesión 21, $F$ (2,17)=0.46, $p$= 0.63) y una diferencia entre grupos que se revela durante las ultimas tres sesiones (sesiones 28, 29 y 30, $F$ (2,17)= 13.66, p<0.001; Comparación a posteriori de a pares: giro a la derecha vs giro a la izquierda: $p$>0.1, giro a la derecha vs control: $p$<0.001, giro a la izquierda vs control: $p$<0.001). Así, los animales aprendieron a cambiar y adaptar la estrategia aprendida durante la fase de

adquisición de acuerdo a los cambios ambientales, tal como lo revela la respuesta observada durante la reversión.

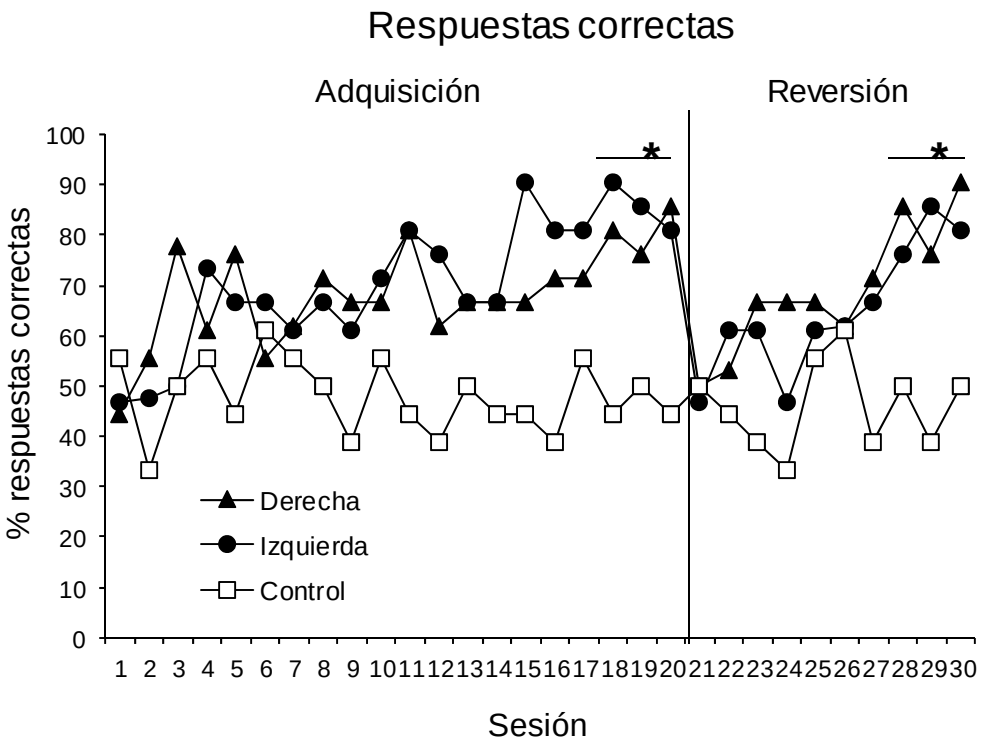



Figura 1: Porcentaje de respuestas correctas para los animales de los grupos Giro (Derecha o Izquierda) y Control durante el Experimento 1. Cada punto representa el promedio de todos los animales del grupo para esa sesión.

En la *Figura 2* se presenta la media del número de errores cometidos por los animales de los grupos experimentales durante la fase de adquisición y de reversión hasta alcanzar el criterio de aprendizaje. Los datos de ambos grupos (giro a la derecha y giro a la izquierda) han sido analizados juntos dado que presentaban un comportamiento muy similar. El análisis reveló una diferencia significativa en el número de errores cometidos entre las dos fases ($F$ (1,26)= 17.14, $p$<0.001). Se observó un número menor de errores durante la fase de reversión; esto implica que durante esta etapa los animales aprendieron la estrategia de giro más rápidamente que durante la adquisición.

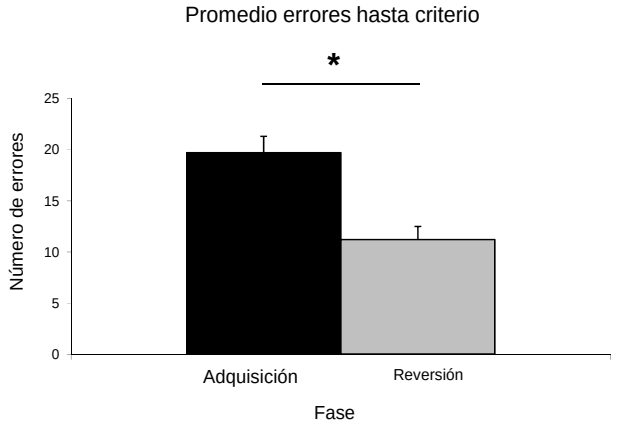



Figura 2: Número promedio de errores por animal hasta criterio de aprendizaje para los sujetos de los grupos Giro (Derecha e Izquierda) en las dos fases del experimento. Las barras verticales indican el error estándar.

La *Figura 3* muestra los datos de la captación de agua para los tres grupos a lo largo de las sesiones. Durante la primera sesión de entrenamiento no se presentaron diferencias significativas entre los grupos ($F(2,17)= 3.52$, $p>0.05$); la exposición a la pileta con agua deionizada generó una leve ganancia de peso. El aprendizaje de la regla y el acceso exitoso al reforzador resultó en una mayor ganancia de peso para los grupos experimentales (revelada durante las sesiones 18, 19 y 20). Un ANOVA de medidas repetidas Grupo x Sesión apoya esta observación (diferencias significativas entre grupos, $F(2,17)= 12.43$, $p<0.001$; Comparaciones de a pares a posteriori: giro a la derecha vs giro a la izquierda: $p>0.1$, giro a la derecha vs control: $p<0.001$, giro a la izquierda vs control: $p<0.001$). El patrón de variación de peso observado durante la reversión reveló que la diferencia entre los grupos se mantuvo durante todo el período. Durante la primera sesión la diferencia fue marginal (sesión 21, $F(2,17)= 4.80$, $p=0.023$) y luego se transformó en una diferencia más significativa entre grupos durante las últimas tres sesiones (sesiones 28, 29 y 30, $F(2,17)= 9.25$, $p<0.01$; Comparaciones de a pares a posteriori: giro a la derecha vs giro a la izquierda: $p>0.1$, giro a la derecha vs control: $p<0.005$, giro a la izquierda vs control: $p<0.005$).

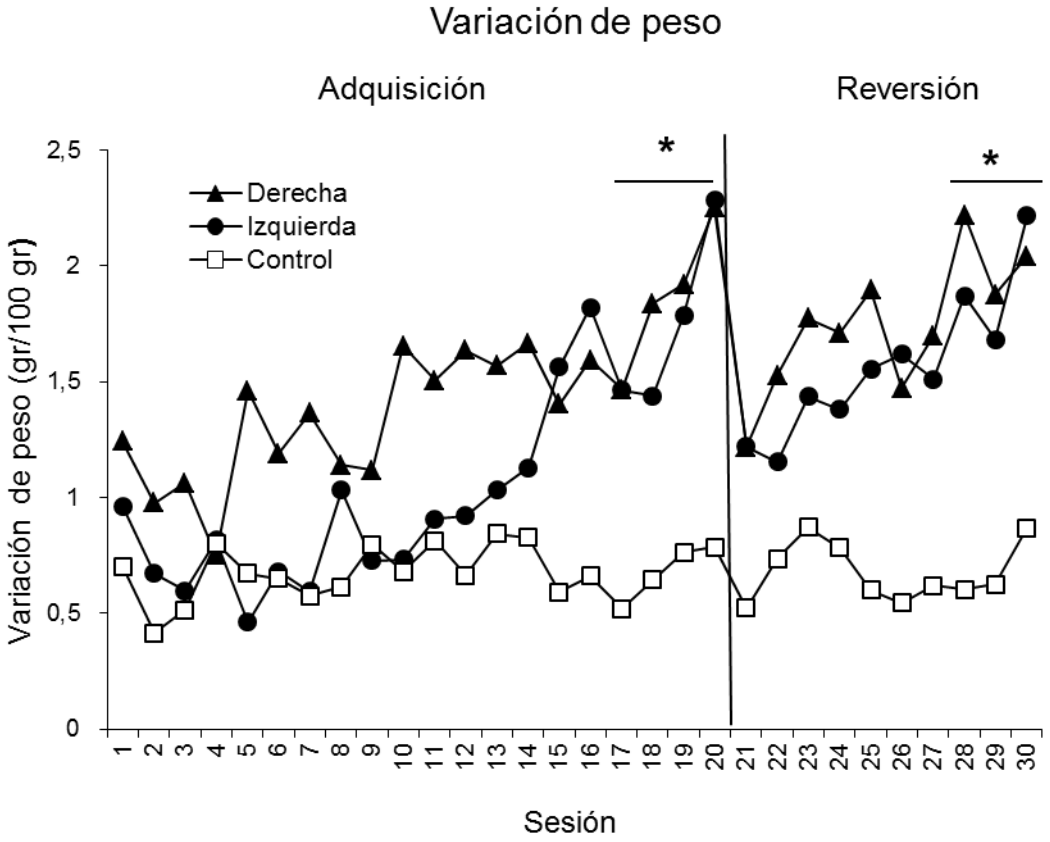



Figura 3: Variación de peso de los animales a lo largo de las sesiones de entrenamiento. Cada punto representa la media para el grupo para esa sesión.

## Conclusiones

Este experimento confirma que los anfibios, al igual que muchos otros grupos de animales, son capaces de utilizar una estrategia de giro centrada en su propio cuerpo para el aprendizaje espacial. Esta habilidad, previamente observada por Greding (1971) utilizando descargas eléctricas, ha sido ahora observada utilizando un estímulo apetitivo. Estos resultados concuerdan con experimentos previos en un campo abierto con ranas verdes (*Rana calamitans*), lo cual sugie que estos animales pueden utilizar patrones motores memorizados para orientarse en el espacio (Adler, 1980). En ese estudio se observó una gran regularidad en las trayectorias descriptas por los sujetos a la hora de recorrer un laberinto, lo que estaría indicando lo memorización de caminos exitosos recorridos anteriormente para llegar hasta el reforzador.

Además, también pudo ser observada la capacidad de reversión. Esto significa que, una vez que los animales han aprendido una regla, son capaces de aplicarla a una nueva situación con una tasa de aprendizaje más rápida.

Como demuestran los resultados de variación de peso, este tipo de aprendizaje posee también otra función adaptativa: permitir al sujeto maximizar su captación de agua durante la exposición al reforzador. Así, una vez alcanzado el criterio de aprendizaje los sujetos de los grupos Giro fueron capaces de triplicar su ganancia de peso comparado con los animales Control.

Vale incluir una aclaración con respecto a una de las variables que se había planteado para este experimento, el Tiempo de Recorrido. Como se observó en los resultados no se presenta una variación del tiempo de recorrido a lo largo del entrenamiento, esta variable no resulto ser un buen indicador del aprendizaje que estaban atravesando los animales en esta situación experimental. Este fenómeno también se ha observado con anterioridad en otro anfibio, en el sapo de vientre rojo *Bombina orientalis* (Brattstrom, 1990). Así, a diferencia de los ratones, ratas y lagartijas que corren o caminan rápidamente a través de los laberintos, el tiempo que les toma a los anfibios completar el recorrido en el laberinto luego del ensayo inicial no decae manera significativa. Por esa razón, se decidió eliminar el análisis de esta variable en los siguientes experimentos que se presentarán en este trabajo.

# Experimento 2

# Estrategia de Guía (claves visuales)

## Introducción

Aunque la importancia de los estudios comparados para comprender la estructura y funcionamiento del aprendizaje espacial y los sistemas de memoria en vertebrados ha sido muy enfatizado (Bingman, 1992; Eichenbaum, 1992; Roitblat, 1987; Sherry & Schacter, 1987) sólo se han llevado a cabo unas pocas pruebas que puedan demostrar el uso de claves visuales en animales no mamíferos. Muchas de estas pruebas han sido llevadas a cabo en peces. Una de ellas fue conducida por Ingle y Sahagian (1973), quienes demostraron que los peces dorados (*Goldfish*) pueden aprender a nadar en una dirección constante en relación a determinadas claves visuales, dentro de un entorno pequeño, aun si se acercan al punto de decisión desde direcciones opuestas y que son capaces de alternar la dirección de los giros en los diferentes ensayos (Salas et al., 1996 b).

Todavía no se conoce si la habilidad de aprender en un laberinto usando claves visuales está presente en los sapos. Pero, ya que los sapos son casi completamente dependientes de claves visuales para alimentarse (Eibl-Eibesfeld, 1951; Brower & Brower, 1962), se podría esperar que consideren relevante la información visual en una situación de aprendizaje en laberinto. En los anfibios la visión es utilizada para la percepción de claves direccionales en todos los estadios de desarrolla, incluyendo los renacuajos (ej. *R. catesbiana*, Justis & Taylor, 1976).

Existen dos clases de claves visuales que los anfibios podrían utilizar en su hábitat natural para orientarse en el espacio: las claves fijas, tales como una línea costera o la silueta de un bosque, y las claves celestes de “movimiento” periódico como el sol, la luna, las estrellas y los patrones de luz polarizada. La función específica de cada clave en la orientación espacial aparentemente difiere entre las especies y también depende de la clase de clave (Sinsch, 2006). En un experimento previo que estudiaba patrones de movimiento en el sapo común europeo, se pudo confirmar que la visión puede ser empleada para la orientación en distancias cortas utilizando claves fijas (Sinsch, 1987).

El experimento que se plantea a continuación fue diseñado para probar la habilidad de aprendizaje en un laberinto en cruz utilizando una clave visual fija en el sapo común *Bufo arenarum.* En este caso, también se evaluó la capacidad de revertir este aprendizaje.

## Materiales y método

*Sujetos y Dispositivo Experimental*: Se utilizaron 12 sapos machos adultos, obtenidos y mantenidos como se describió en el experimento previo. El peso estándar de los animales varió entre 120 y 150 g., y no difirieron de manera significativa entre los grupos (ANOVA, $F<0.1$). Se utilizó el mismo cuarto experimental que en el anterior experimento.

*Procedimiento Experimental*: El pre-entrenamiento utilizado fue el mismo que en el Experimento 1. El entrenamiento comenzó al día siguiente de finalizado el pre-entrenamiento. Se administraron 18 sesiones individuales diarias de entrenamiento, con tres ensayos por sesión. Los sujetos fueron asignados azarosamente a uno de dos grupos:

- Clave (n= 7): Los animales en este grupo fueron entrenados en un procedimiento donde la pileta llena de agua se encontraba directamente señalada por una clave visual proximal intralaberinto (clave visual fija) localizada al final del brazo reforzado. Esta clave consistió de un panel rectangular (0.14 x 0.18 m, ancho x altura) con cuatro barras horizontales azules sobre un fondo rojo. En todos los ensayos la clave estaba localizada pseudoazarosamente en una posición cambiante en relación al punto de partida. Una pileta idéntica con agua fuera de alcance para el animal fue ubicada siempre en el brazo opuesto (brazo no reforzado). Los animales de este grupo debían utilizar una estrategia de guía basada en la clave visual intralaberinto como única solución para resolver el conflicto planteado durante el entrenamiento.
- Control (n= 7): Para los animales en este grupo no existió relación entre la posición de la clave visual y la ubicación de la pileta con el refuerzo (50% de los ensayos en el mismo brazo y 50% de los ensayos en brazos opuestos, de forma azarosa).

Durante el entrenamiento se utilizaron azarosamente dos brazos de salida opuestos (1 y 3, 50% de los ensayos cada uno). Todos los demás detalles de procedimiento fueron idénticos al Experimento1.

Una vez que se alcanzó el criterio de aprendizaje durante la adquisición (10 sesiones) se comenzó con la fase de reversión (8 sesiones). Durante esta segunda fase la pileta con agua estaba ubicada en el brazo opuesto a la clave visual. Para dar por finalizada la fase de reversión se utilizó el mismo criterio de aprendizaje de 75% de respuestas correctas durante tres sesiones consecutivas.

El método de análisis de datos y los análisis estadísticos utilizados en este experimento fueron los mismos que para el Experimento1.

## Resultados

En la *Figura 4* se puede observar que el % de respuestas correctas para el grupo experimental tuvo un efecto significativo durante la adquisición. En la primea sesión ambos grupos seleccionaron al azar cualquiera de los dos brazos meta ($F$ (1,10)=0.62, $p$>0.1). Pero luego del entrenamiento y durante las últimas tres sesiones de la fase de adquisición el desempeño del grupo Clave se diferenció visiblemente del grupo Control (sesiones 8, 9 y 10, ANOVA de medidas repetidas Grupo X Sesión, efecto de grupo $F$ (1,8)= 5.93, $p$<0.05. Sin efecto de sesión ni interacción entre los factores). El cambio en la posición de la clave en relación al reforzador durante la reversión causó una caída en el desempeño de los animales del grupo Clave durante la primera sesión del período ($F$ (1,10)= 18.84, $p$<0.005), esto se revirtió durante las últimas sesiones de entrenamiento (sesiones 16, 17 y 18, ANOVA de medidas repetidas Grupo X Sesión, efecto de grupo $F$ (1,10)= 27.93, $p$<0.001. Sin efecto de sesión o interacción).

Al analizar el promedio de errores por animal hasta alcanzar el criterio de aprendizaje podemos observar en la *Figura 5* que los sujetos del grupo Clave cometieron menos errores durante la fase de reversión en comparación con la fase de adquisición ($F$ (1,10)= 6.25, p<0.05). Esto implica que la relación establecida entre la clave visual intralaberinto y el reforzador establecida durante la adquisición pudo ser rápidamente modificada y adaptada a los cambios en la segunda fase del entrenamiento.

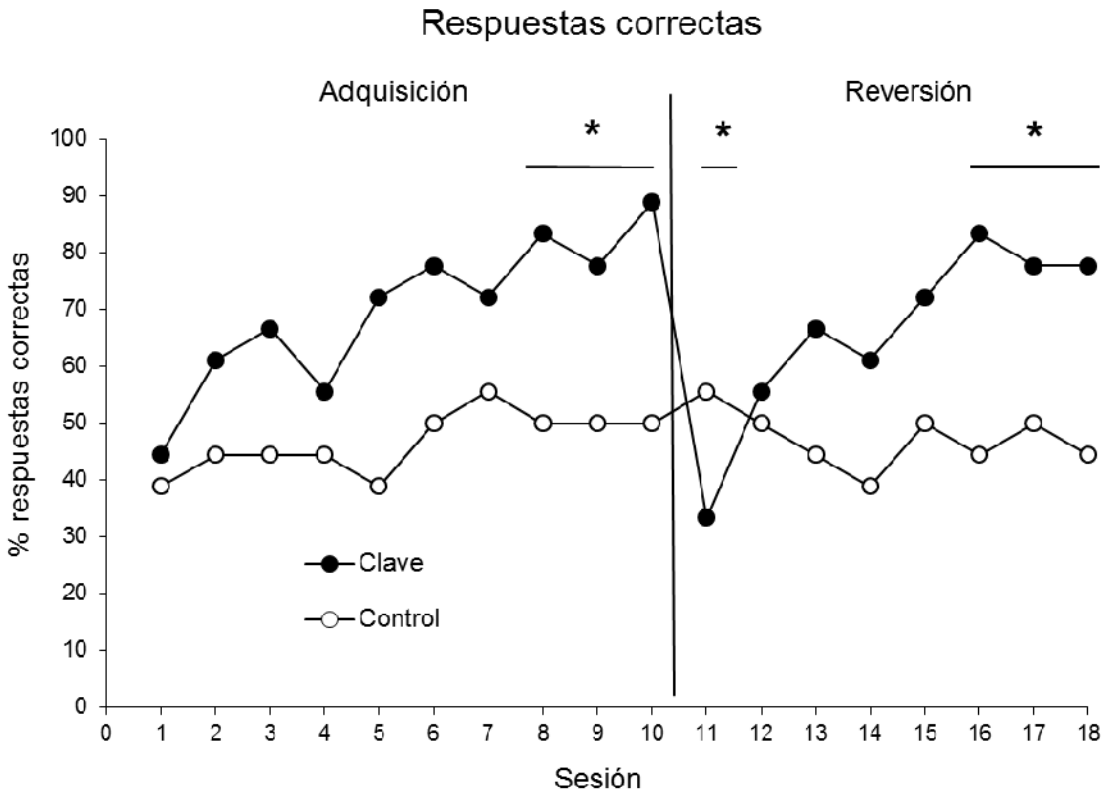



Figura 4: Porcentaje de respuestas correctas para los animales de los grupos Clave y Control durante el Experimento 2. Cada punto representa el promedio de todos los animales del grupo para esa sesión.

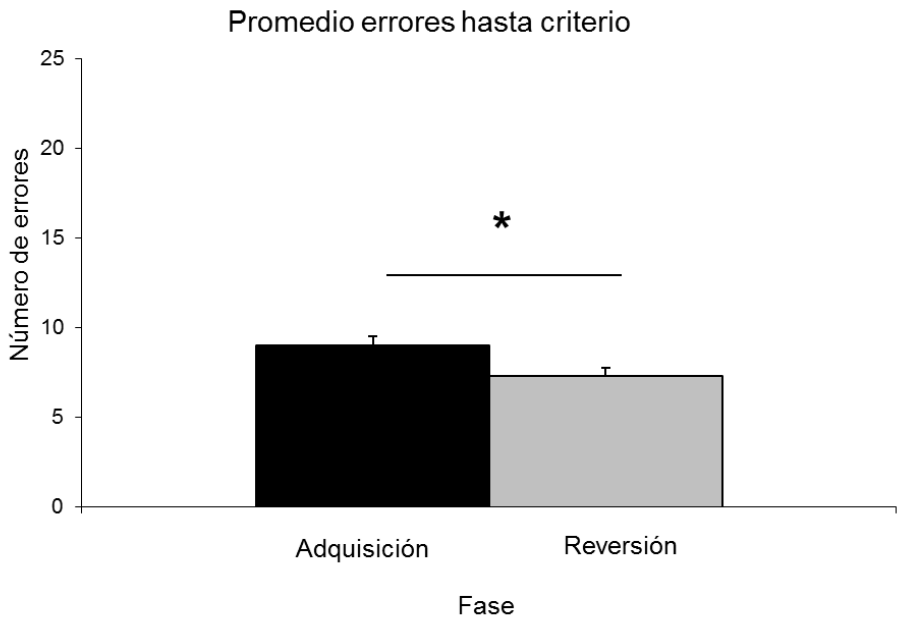



Figura 5: Número promedio de errores por animal hasta criterio de aprendizaje para los sujetos del grupo Clave en las dos fases del experimento.
Las barras verticales indican el error estándar.

Los cambios en la captación de agua se pueden observar en la *Figura 6*. Ambos grupos solo revelaron una pequeña ganancia de peso durante la primer sesión, sin diferencias entre ellos ($F$ (1,10)=0.02, p>0.1). Las diferencias entre grupos aparecieron durante las últimas sesiones de la fase de adquisición, donde los animales del grupo Clave casi duplicaron la ganancia de peso de los animales del grupo Control (sesiones 8, 9 y 10, ANOVA de medidas repetidas Grupo x Sesión, efecto grupo $F$ (1,10)= 4.91, p= 0.05. Si efecto sesión o interacción). Esta diferencia en la ganancia de peso se perdió momentáneamente con el cambio en las condiciones de entrenamiento al comenzar la fase de reversión (sin diferencias entre grupos durante la sesión 11, $F$ (1,10)=0.6, p>0.1) y reapareció durante las últimas tres sesiones del período (sesiones 16, 17 y 18, ANOVA de medidas repetidas Grupo x Sesión, efecto de grupo $F$ (1,10)=8.4, p<0.05. Sin efecto de sesión ni interacción).

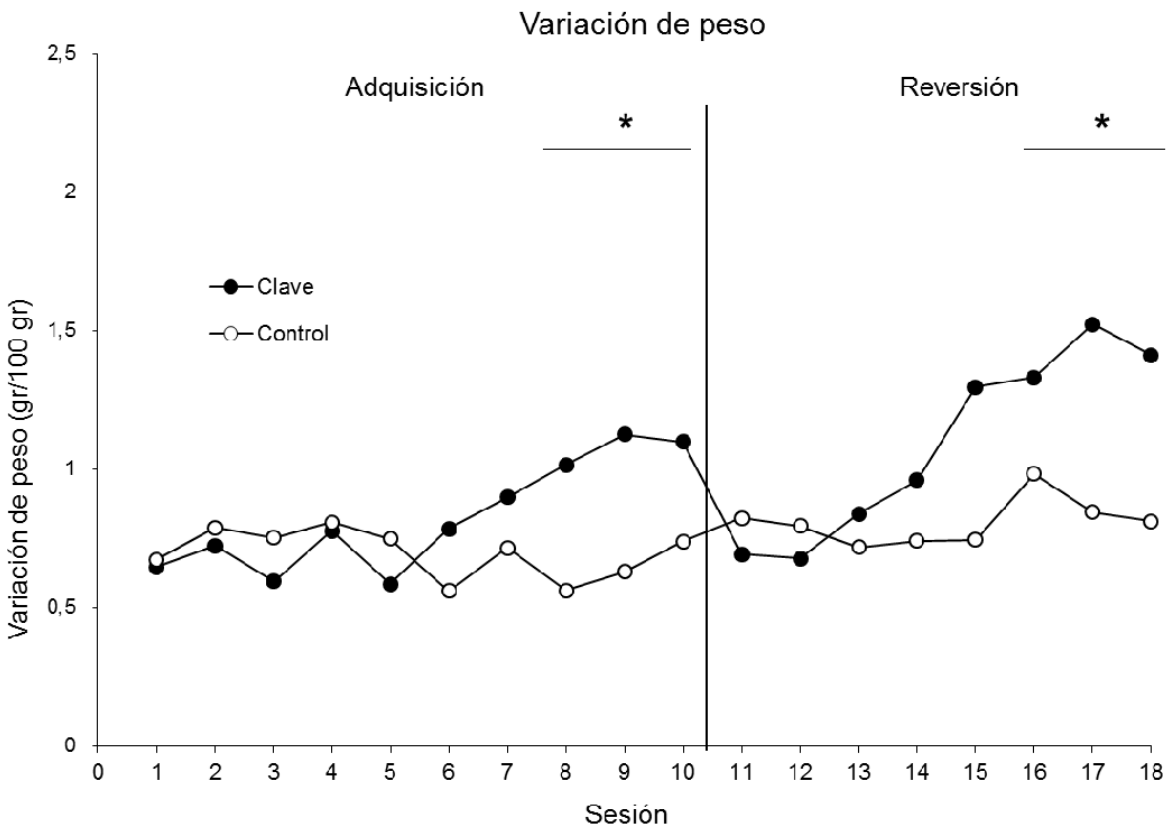



Figura 6: Variación de peso de los animales a lo largo de las sesiones de entrenamiento. Cada punto representa la media para el grupo para esa sesión.

## Conclusiones

Estos resultados revelan que los sapos pueden utilizar una clave visual proximal como clave para orientarse en el espacio en una situación de laberinto. La asociación entre la clave visual y la posición de la pileta reforzada pudo ser fácilmente establecida por los sujetos del grupo Clave tras sólo 10 sesiones de entrenamiento. Luego de esto, los animales pudieron aplicar rápidamente la regla aprendida a una situación novedosa durante la fase de reversión.

Como se observó también en el experimento anterior el aprendizaje le permitió a los sujetos maximizar la ganancia de agua durante la exposición al reforzador, revelando así una función adaptativa.

Para finalizar, si bien no se pueden realizar comparaciones estadísticas entre los resultados de los dos primeros experimentos, haciendo una sencilla descripción del desempeño podemos observar que: (i) utilizando una estrategia de giro (Experimento 1) los animales lograron alcanzar el criterio de aprendizaje en 20 sesiones de entrenamiento, mientras que (ii) el uso de una clave visual (Experimento 2) insumió exactamente la mitad: 10 sesiones. Esta descripción también concuerda con lo observado para el número promedio de errores por animal hasta alcanzar el criterio de aprendizaje para los sujetos de los grupos Giro (Experimento 1: 19.71 +/- 1.60 errores) y Clave (Experimento 2: 9.00 +/- 0.51 errores). De esta forma, esto podría sugerir que la disponibilidad de claves visuales ambientales llevaría a un aprendizaje mucho más rápido de la tarea (ubicar el contenedor con agua). Más registros experimentales deben llevarse a cabo para confirmar esta hipótesis.

# Experimento 3

## Estrategia de Giro vs Estrategia de Guía

## Determinación de la estrategia predominante

### Introducción

Se ha reportado que cuando mamíferos y aves son entrenados para hallar una meta en un laberinto donde pueden utilizar simultáneamente relaciones espaciales entre claves lejanas (estrategia de "lugar") y una clave visual local única y conspicua, los animales aprenden a utilizar ambas estrategias para resolver la situación (López et al, 2000). Así, el uso de combinaciones de varias estrategias es un hecho común en la orientación espacial.

Es bien conocido que los sapos son casi completamente dependientes de claves visuales para alimentarse (Eibl-Eibesfeld, 1951; Brower & Brower, 1962), por ello es naturalmente esperable que utilicen eficazmente las claves visuales ambientales durante una situación de entrenamiento en un laberinto (de hecho, esto fue observado en el Experimento 2 del presente trabajo).

Sin embargo, se ha demostrado previamente que sapos (*Bufo marinus*) en una tarea de escape a una descarga eléctrica en un laberinto en T, giraban hacia el lado en que habían sido entrenados (una respuesta centrada en su cuerpo) en lugar de seguir una clave visual (Williams, 1967 a). En reptiles, otro grupo relativamente antiguo, caimanes (*Caiman sclerops*), al igual que los anfibios muy dependientes de la visión para alimentarse, mostraron que si son entrenados en la misma situación anterior de laberinto en T con claves visuales y de posición (giro a derecha o izquierda), y luego estas claves eran presentadas en conflicto (disociadas) en un ensayo de prueba, éstos prestaban más atención a las claves de posición, siguiendo una estrategia de giro (Williams, 1967 b). Es importante notar que los datos previos en sapos, reportados por Williams (1967 a) usando tanto claves visuales como de giro, fueron registrados en una situación aversiva y, además, el problema planteado puede no haber sido verdaderamente espacial: debido a que los animales realizaron sus respuestas en un laberinto en T con sólo una posición de partida, no es posible disociar la orientación por auto-referencia de la respuesta de guía siguiendo una clave. Por lo tanto, es imposible hacer una predicción

certera a priori acerca de qué tipo de información usaría el sapo común *Bufo arenarum* en una situación de conflicto en nuestra situación de aprendizaje espacial en un laberinto en cruz. Esta ambigüedad puede ser resuelta disociando la repuesta basada en la información de giro, de la respuesta basada en la información de guía de la clave visual usando un tipo específico de ensayo de prueba.

Por lo tanto, en el presente experimento los animales fueron entrenados en una situación donde disponían, en forma simultánea, de información de giro en congruencia con una clave visual que señalaba directamente la localización del refuerzo (información de guía). Luego de la adquisición, esta información fue disociada en varios ensayos de prueba en los cuales el giro centrado en el cuerpo y la guía usando una clave visual proximal llevaban a diferentes respuestas. De esta forma, se hallaban estas dos fuentes de información en conflicto a fin de determinar la importancia relativa de cada una de ellas y las estrategias de memoria que los sapos emplean para resolver esta tarea.

## Materiales y método

*Sujetos y Dispositivo Experimental*: Se utilizaron 10 sapos machos adultos obtenidos y mantenidos como se describió en el Experimento 1. El peso estándar de los animales varió entre 80 y 115 g, y no difirieron de manera significativa entre los grupos (ANOVA, $F$ (1,8)= 2.06, $p>0.1$). Las condiciones de mantenimiento, el aparato y el cuarto experimental fueron los mismos que en el Experimento 1.

*Procedimiento Experimental*: El pre-entrenamiento utilizado fue el mismo que en el Experimento 1. El entrenamiento comenzó al día siguiente. Se administraron 34 sesiones diarias de entrenamiento, con tres ensayos por sesión. El entrenamiento se dividió en tres períodos: adquisición (12 sesiones), sobreentrenamiento y pruebas (14 sesiones) y reversión (8 sesiones). Los sujetos fueron asignados azarosamente a uno de dos grupos:

- Clave-Giro (n= 6): Los animales en este grupo fueron entrenados con un procedimiento mixto en donde la pileta con agua se hallaba ubicada en una posición constante en relación con el punto de partida (siempre en el brazo de la derecha o en el de la

izquierda, 3 sujetos para cada condición) y directamente señalada por un panel ubicado al final del brazo (igual que en el Experimento 2). Se ubicó una pileta con agua fuera del alcance en el brazo opuesto. Los animales de este grupo podían solucionar esta tarea utilizando una estrategia de guía basada en la clave visual intralaberinto o una estrategia de giro basada en la posición fija del reforzador (girar siempre a la derecha o a la izquierda).

- Control (n= 6): Para los animales en este grupo no existió relación entre la posición de la clave visual, la posición del brazo y la ubicación de la pileta con el refuerzo. (i.e., la posición de clave visual así como la posición del refuerzo fue azarosa, como en el Experimento 2). Dos animales de este grupo murieron durante el experimento.

Durante el entrenamiento se utilizaron azarosamente dos brazos de salida opuestos (1 y 3, 50% de los ensayos cada uno). Todos los demás detalles de procedimiento fueron idénticos al Experimento 1.

Una vez alcanzado el criterio de adquisición (75% de respuestas correctas durante tres sesiones consecutivas) comenzó el período de sobreentrenamiento y prueba. Durante estas 14 sesiones los animales recibieron 4 ensayos por sesión: 3 ensayos de entrenamiento y 1 ensayo de prueba (este último en segundo o tercer lugar). Los ensayos de prueba fueron incorporados para determinar si los animales resolvían la tarea basándose en una respuesta fija de giro o guiándose por la clave visual. En estos ensayos, la respuesta de giro y la guiada por la clave visual eran incompatibles y podían ser disociadas. Se incorporaron 14 ensayos de prueba dispuestos pseudoazarosamente entre los ensayos de entrenamiento durante las sesiones de sobreentrenamiento. Durante los ensayos de prueba se retiró el reforzador. Dependiendo de qué brazo fuera seleccionado por el sujeto las respuestas de los animales se clasificaron en “Giro” o “Clave”. Luego de esta fase se comenzó con el período de reversión (8 sesiones). Durante estas sesiones la pileta con agua estaba localizada girando en la dirección opuesta desde el punto de partida, en el brazo opuesto a la clave visual. El mismo criterio de aprendizaje se utilizó para dar por finalizado el período.

El método de análisis de datos y los análisis estadísticos utilizados en este experimento fueron los mismos que para el Experimento1.

## Resultados

La *Figura 7* presenta el ⁄ de respuestas correctas por sesión de entrenamiento para cada grupo. Durante la primer sesión de entrenamiento no se observaron diferencias entre el desempeño de ambos grupos ($F$ (1,8)=0.27, $p$>0.5). Esta diferencia apareció durante las últimas tres sesiones del período (sesiones 10, 11 y 12, ANOVA de medidas repetidas, Grupo x Sesión, $F$ (1,8)= 22.58, $p$<0.005, sin efecto de sesión ni interacción entre factores, $p$=0.86, $p$=0.68). Esto sugiere que los animales del grupo Clave-Giro pudieron establecer fácilmente una estrategia para localizar el objetivo. La presentación de los ensayos de prueba durante el período de sobreentrenamiento no afectó el desempeño del grupo Clave-Giro, manteniéndose las diferencias con el grupo Control durante todas las sesiones ($F$ (1,8)= 145.32, $p$<0.001). El cambio en las claves ambientales durante la reversión generó una caída en el desempeño del grupo Clave-Giro durante la primera sesión (sesión 27, $F$ (1,8)=5.71, $p$<0.05). Esta situación fue revertida hasta estabilizarse durante las últimas sesiones (sesiones 32, 33 y 34, ANOVA de medidas repetidas, Grupo x Sesión, efecto de grupo $F$ (1,8)= 29.25, $p$<0.001. Sin efecto de sesión ni interacción).

Los cambios en las claves ambientales durante el período de reversión generaron cambios rápidos en las estrategias de orientación de los sujetos del grupo experimental. Estas estrategias fueron fácilmente modificadas y, como se puede observar en la *Figura 8*, el criterio de aprendizaje se alcanzó cometiendo menos errores ($F$ (1,10)= 5.43, $p$<0.05).

Una comparación descriptiva global de estos resultados con los del Experimento 1 podría sugerir que los sapos con dos fuentes de información ambiental disponibles (posición relativa al punto de partida y clave visual) cometerían menos errores hasta alcanzar el criterio de aprendizaje que animales con sólo una fuente de información (solamente la posición relativa al punto de partida). Además, estos animales resolverían el problema en un menor número de sesiones en comparación con los sujetos que sólo disponían de la información de auto-referencia. (Adquisición: 12 +/- 1.5 errores en Exp. 3 vs. 19 +/- 2 errores en Exp. 1; Reversión: 8 +/- 1.3 errores en Exp. 3 vs. 11 +/- 2 errores en Exp. 1).

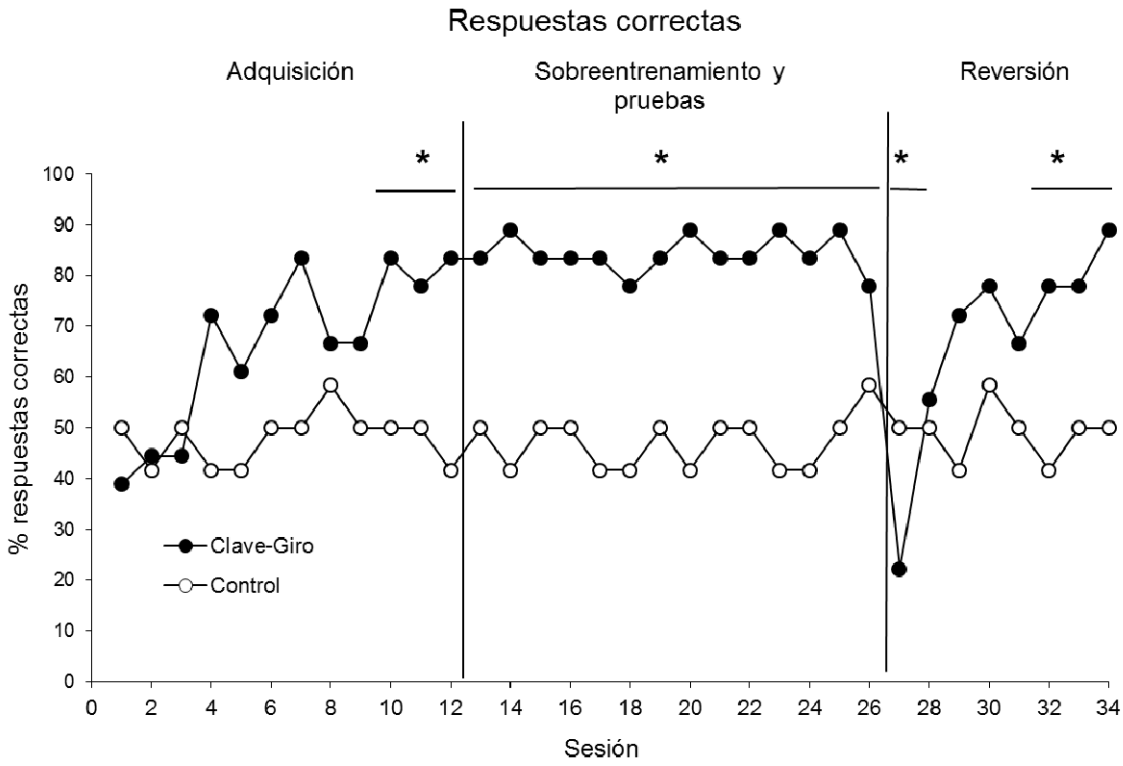



Figura 7: Porcentaje de respuestas correctas para los animales de los grupos Clave-Giro y Control durante las tres fase de entrenamiento del Experimento 3. Cada punto representa el promedio de todos los animales del grupo para esa sesión.

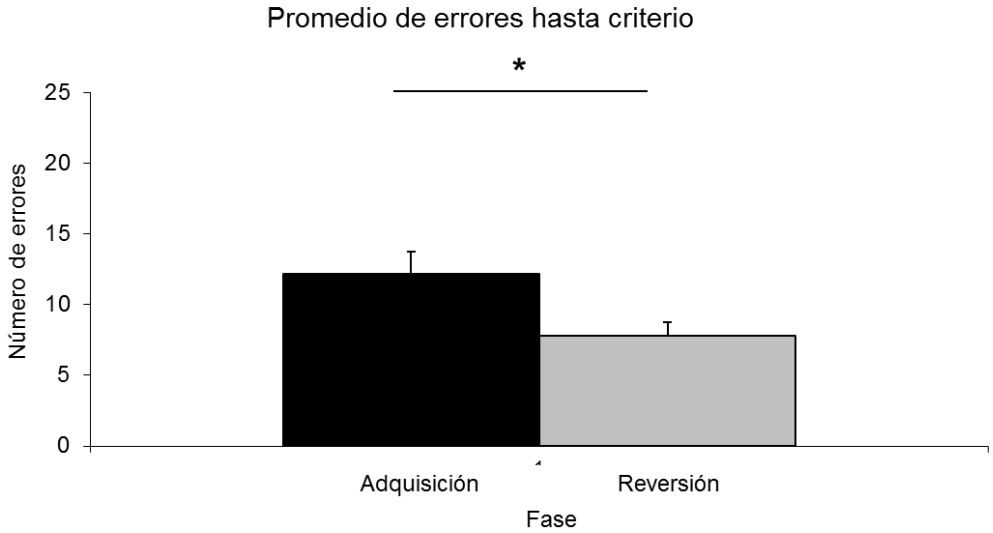



Figura 8: Número promedio de errores por animal hasta criterio de aprendizaje para los sujetos de los grupos Clave-Giro en las fases de adquisición y reversión del experimento. Las barras verticales indican el error estándar.

Los ensayos de prueba se aplicaron para determinar si los sujetos resolvían la tarea mediante una ejecución de una respuesta fija de giro o guiándose por la clave visual. En la *Figura 9* podemos observar que, cuando las respuestas se tornaron incompatibles, los animales del grupo Clave-Giro prefirieron responder basados en una estrategia de giro, más que en una estrategia de guía. Por otro lado, no se encontraron diferencias entre las estrategias elegidas en los animales del grupo Control ($F$ (3,52)=22.3, p<0.001, test LSD para el grupo Clave-Giro p<0.001, para el grupo Control p=0.09).

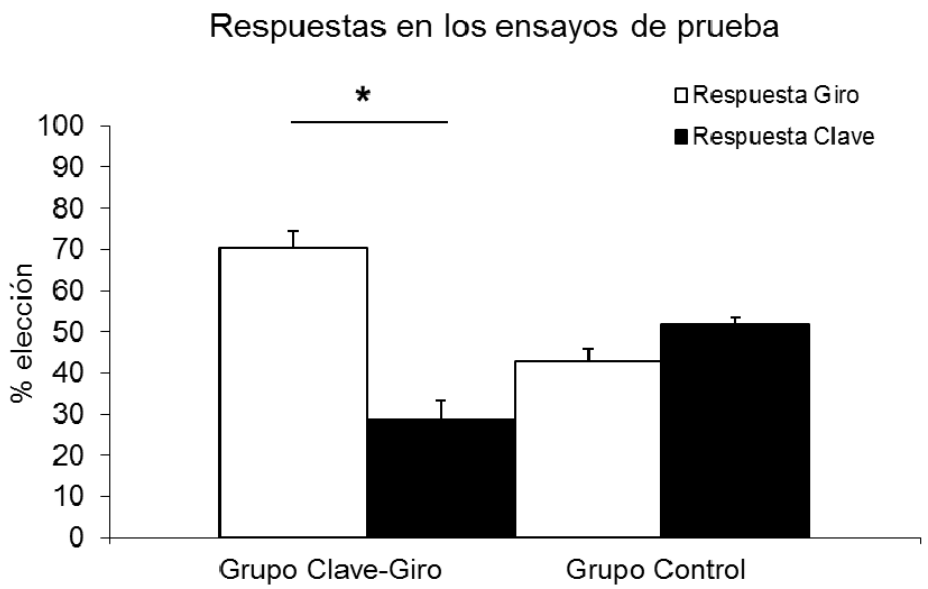



Figura 9: Porcentaje de elección de cada tipo de respuesta en los ensayos de prueba para cada grupo. Las barras verticales indican el error estándar.

En la *Figura 10* podemos observar un leve cambio en la captación de agua para ambos grupos durante la primera sesión de entrenamiento ($F$ (1,8)= 1.64, $p$>0.1). Esta situación cambió durante el entrenamiento y hacia el final del período de adquisición los sujetos del grupo Clave-Giro lograron que la ganancia de agua sea significativa (tres últimas sesiones, efecto de grupo $F$ (1,8)= 10.20, $p$<0.05. Sin efecto de sesión ni interacción). Esta diferencia no fue reducida con la incorporación de los ensayos de prueba durante el sobreentrenamiento; por el contrario, el fenómeno se vio incrementado con estas sesiones extra de entrenamiento (efecto de grupo $F$ (1,8)=23.13, $p$<0.05, efecto de sesión $F$ (13,104)=3.0, $p$<0.001. Sin efecto de interacción). El cambio en las condiciones de entrenamiento con el comienzo del período de reversión generó que se pierda capacidad de ganancia de peso en el grupo experimental (sin diferencia entre los

grupos durante la sesión 27, $F$ (1,8)=4.9, $p$=0.06). El fenómeno reapareció durante las sesiones finales (sesiones 32, 33 y 34, ANOVA de medidas repetidas, Grupo x Sesión, efecto de grupo $F$ (1,8)= 31.84, $p$<0.001. Sin efecto de sesión ni interacción entre los factores).

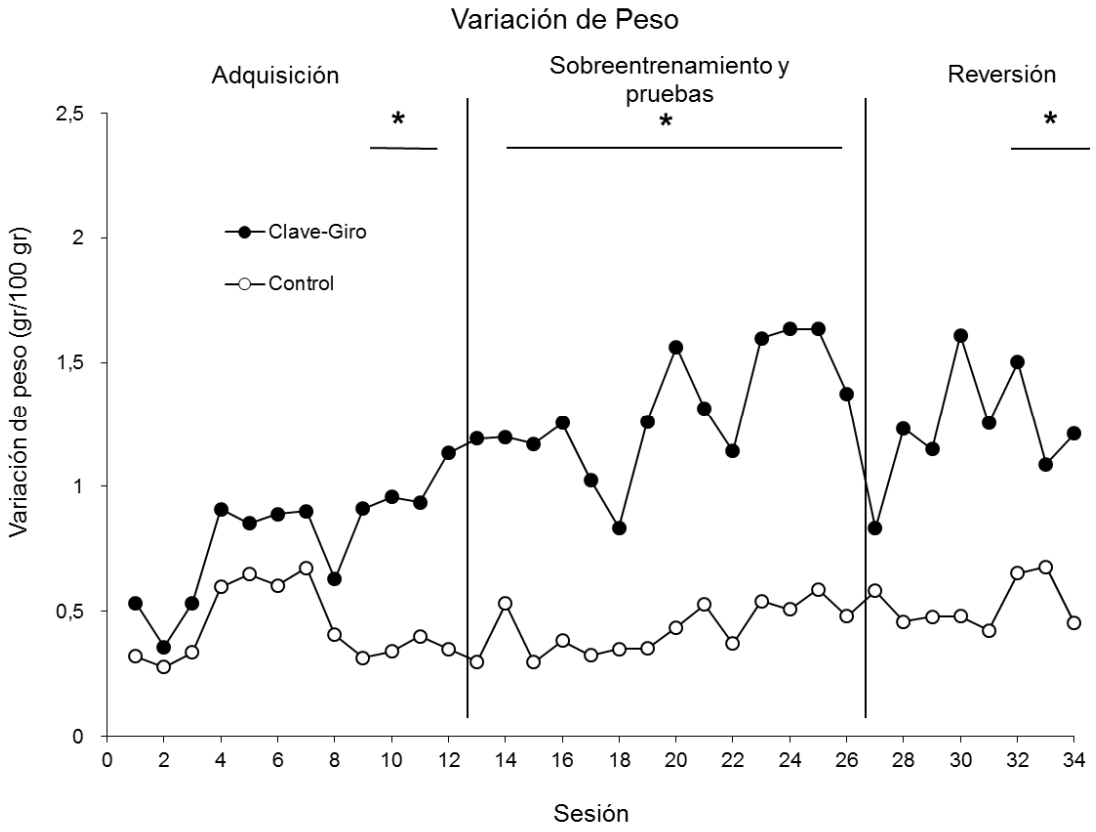



Figura 10: Variación de peso de los animales a lo largo de las sesiones de entrenamiento. Cada punto representa la media para el grupo para esa sesión.

## Conclusiones

Durante los ensayos de entrenamiento, la localización del refuerzo siempre se conservó en el mismo lugar en relación con el punto de partida (girando a la derecha o a la izquierda) y, a demás, podía ser identificada por la presencia de una clave visual intra-laberinto conspicua. Así, los animales podían aprender a resolver la tarea basándose en las relaciones espaciales entre la meta y el punto de partida o acercándose a la clave visual asociada al refuerzo. En los ensayos de prueba la clave visual se colocó en conflicto con la posición, así una respuesta de giro era incompatible con una respuesta de guía. Esta circunstancia forzó a los sujetos a elegir entre

seguir la clave visual o girar hacia el lugar donde obtenían el refuerzo durante el entrenamiento. Los resultados muestran que eligieron el brazo correspondiente a una respuesta de giro.

Como se mencionó anteriormente, este mismo fenómeno ha sido observado en experimentos previos por Williams (1967a); donde el entrenamiento de sapos de la especie *Bufo marinus* reveló que todos los sujetos experimentales en los ensayos de prueba eligieron girar en el sentido que habían sido entrenados, en lugar de seguir la clave visual. Estos resultados con sapos concuerdan con los hallazgos en caimanes, que eligieron la estrategia de giro de manera unánime en la misma situación (Williams, 1967b). Sin embargo, sigue resultando sorprendente que estos animales, naturalmente tan dependientes de la visión, no prefieran seguir las claves visuales ante la dicotomía de la situación de prueba.

## Discusión General acerca de Estrategias

Los animales poseen una amplia variedad de estrategias, algunas innatas y otras aprendidas, que los ayuda a navegar. Cuando se enfrentan a una tarea espacial específica, la estrategia que elijan dependerá de sus capacidades sensoriales y de la naturaleza de los estímulos disponibles (Chamizo, 2002). Existen muy pocos estudios hechos en laberintos en anfibios y, excepto por el estudio de la conducta de volver a su propio territorio (Lüddecke, 2003), no existen muchos estudios de aprendizaje con significancia ecológica. El único antecedente directo del presente estudio es un experimento previo realizado en nuestro laboratorio, pero no en una situación espacial. En ese caso Schmajuk et al. (1980) entrenaron sapos en una situación de laberinto en Y usando agua como reforzador, mostrando aprendizaje apetitivo discriminativo.

Nuestros experimentos indican que utilizando la especie correcta, en el laberinto correcto, con el reforzador correcto, los anfibios anuros son capaces de aprender rápidamente una tarea espacial, mostrando que los anfibios poseen la habilidad de llevar a cabo un aprendizaje detallado acerca del ambiente que los rodea.

***Estrategia de Giro***. Nuestro primer experimento mostró que los sapos son capaces de utilizar una estrategia de giro para orientarse en un laberinto en cruz. Se cree que este tipo de aprendizaje sirve normalmente para aprender rutas dentro del territorio propio del animal. Por ejemplo, se sabe que otros vertebrados como los peces y las ratas se mueven rápidamente a través de un terreno complejo para buscar la protección de su propio territorio cuando son acechados por un predador (Ingle & Sahagian, 1973). Estas habilidades también pueden ser útiles en los anfibios para llegar fácilmente a un refugio cuando hay riesgo de predación o para localizar una charca cuando necesitan agua. De hecho existen otros estudios en ranas verdes (Adler, 1980) que sugieren que los anfibios utilizan patrones motores memorizados para orientarse en el espacio (a través de la memorización de un camino exitoso utilizado con anterioridad para alcanzar una meta determinada).

***Estrategia de Guía***. El segundo experimento reveló la habilidad de estos animales para codificar ciertas relaciones espaciales entre la ubicación de la meta y un punto de referencia visual y utilizar esta relación espacial para orientarse y retornar a la meta. Esta capacidad para utilizar puntos de referencia para orientarse ya ha sido evidenciada en numerosas especies, tal como abejas (Cheng, 1999), ratas (Benhamou, 1998; Cheng, 1986) y palomas (Cheng, 1994; Spetch et al., 1996, 1997).

***Clave vs Giro***. Se sabe que en los ratones existe una preferencia jerárquica en los tipos de referencias utilizadas para la navegación. Esta jerarquía esta definida por la preferencia, ante una opción, por una determinada estrategia o sistema de referencia de navegación (Alyan & Jander, 1994). En el primer nivel (primera prioridad) de los sistemas de referencia de los ratones experimentados se hallan las claves visuales distales o extra laberinto. En el segundo nivel (prioridad media) se hallan los sistemas de integración de caminos (claves internas de auto referencia, como por ejemplo la estrategia de giro); y en el tercer nivel (la prioridad más baja) el uso de claves proximales utilizadas como guía. También se ha observado que las ratas (Cohen et al, 1990) y los hamsters (Teroni et al, 1990) poseen sistemas de jerarquías similares. Los resultados de nuestro último experimento sugieren que, cuando la integración de distintas fuentes de referencias falla, los anfibios también podrían seguir este mismo sistema de jerarquías. Los sapos entrenados con una combinación de claves visuales e internas (auto referencia) prefieren estas últimas cuando las dos fuentes de información entran en conflicto.

La naturaleza generalmente no presenta información espacial conflictiva; sin embargo, se puede suponer que la existencia de sistemas múltiples de memoria espacial aumente la eficiencia de navegación en ambientes con claves redundantes (Able, 1991; Bossema, 1979). En nuestro caso, el uso cooperativo de de ambas estrategias (giro y guía visual) podría explicar el mejor desempeño y el hecho de alcanzar el criterio de aprendizaje más rápidamente que con el uso de la clave de posición únicamente. En este sentido el uso cooperativo de diferentes estrategias para resolver tareas espaciales ya ha sido descripto en peces y mamíferos (Salas et al., 1996 a).

# Fenómenos

## Introducción

Sabemos que un animal puede aprender cuándo responder o dónde responder para llegar a la solución de un problema. En el trabajo de O'Keefe y Nadel (1978) se muestra que las ratas puede aprender la trayectoria correcta para alcanzar la meta de dos maneras: (i) a través de un verdadero aprendizaje espacial (*hipótesis del mapa cognitivo*) o (ii) a través de un *aprendizaje de guía*. En el primer caso, la rata formaría un *mapa cognitivo* del ambiente donde el laberinto está ubicado, y de la ubicación específica del brazo reforzado dentro de ese entorno. Esto implicaría la formación y reajuste de una representación completa del entorno en respuesta a las novedades. O'Keefe y Nadel consideraron este tipo de aprendizaje como no asociativo, muy flexible y que la estructura cerebral responsable es el hipocampo (Chamizo, 2002). Por otro lado, el *aprendizaje de guía* implica el acercamiento a una clave o grupo de claves específicas (un color, una forma, olor o textura particular en el brazo reforzado o una clave o configuración de claves visuales detrás del brazo reforzado) (Chamizo, 2002). Este aprendizaje de guía está catalogado como una forma de aprendizaje taxonómico; la otra forma sería la orientación (que Hull (1943) denominó aprendizaje de "respuesta"). El aprendizaje de guía es un aprendizaje asociativo y no depende del hipocampo; también es menos flexible (Chamizo, 2002).

O'Keefe y Nadel enfatizan que estas dos estrategias son dos formas de aprendizaje diferentes e independientes, cada una de ellas controlada por una estructura cerebral distinta y que sólo la estrategia taxonómica, la de guía, está controlada por las leyes asociativas (Chamizo, 2002).

Una manera para tratar de esclarecer esta cuestión es considerar si es posible hallar paralelos entre el aprendizaje espacial y otras formas de aprendizaje (Chamizo, 2002).

Para determinar estos paralelismos hemos seleccionado un grupo de cuatro efectos básicos del aprendizaje: el **efecto de la proximidad de la clave al refuerzo**, el **bloqueo** entre claves, el **ensombrecimiento** y la **inhibición latente**. La presencia de estos fenómenos ha sido ampliamente demostrada en mamíferos (Chamizo, 2002), sin que existan datos en anfibios hasta el presente trabajo.

Analizando la presencia de estos fenómenos en anfibios nos permitirá estudiar luego los mecanismos biológicos que rigen estos aprendizajes, en búsqueda de patrones funcionales comunes con otras clases de vertebrados, potencialmente presentes en un ancestro común.

# Experimento 4

# Proximidad espacial entre la clave y el refuerzo

## Introducción

El efecto de la proximidad temporal absoluta entre el estímulo condicionado (EC) y el estímulo incondicionado (EI) en un experimento de condicionamiento es bien conocida (Revusky, 1971). Normalmente, el condicionamiento mejora a medida que el intervalo entre EC y EI decrece (a pesar de que a intervalos muy pequeños el condicionamiento puede empeorar). Esto no debe sorprendernos, es de esperar que la contingencia espacial ente EC y el refuerzo tenga un efecto fuerte dado que la función del condicionamiento es asociar eventos relacionados causalmente (Mackintosh, 1983). Por ejemplo, en un estudio de supresión condicionada en ratas realizado por Testa (1975) se utilizó una luz como EC presentada en una pantalla de vidrio en el techo de la jaula o por debajo del piso de alambre. Esta luz servía como señal de presentación de un soplo de aire (*puff*), utilizado como reforzador, que se presentaba a través de dos orificios en la pantalla superior o inferior. Cuando la luz y el soplo de aire eran presentados en el mismo lugar, los dos desde arriba o desde abajo, el condicionamiento se lograba mucho más rápido que si venían de lugares diferentes (Mackintosh, 1983).

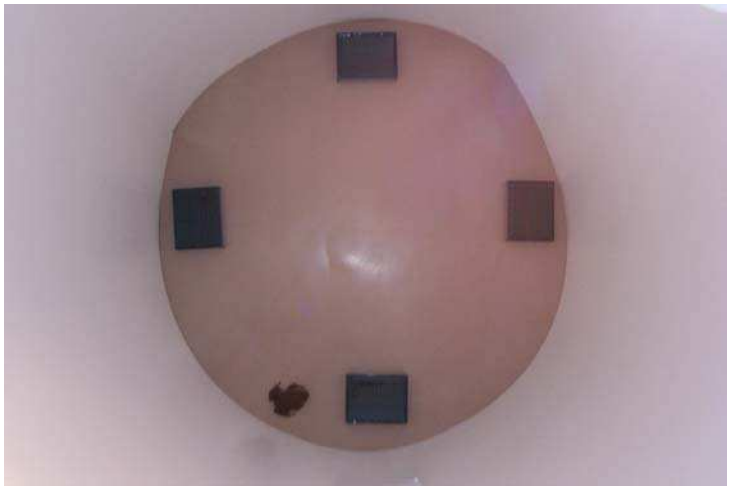
De manera paralela, en el campo del aprendizaje espacial se ha observado que el control adquirido por un único punto de referencia (una única clave visual) es diferente dependiendo de su distancia relativa o proximidad espacial absoluta a la meta (Cheng, 1989; Spetch & Wilkie, 1994). Por ejemplo, en los experimentos típicos con laberintos acuáticos de Morris los puntos de referencia más cercanos son más relevantes para el animal y adquieren un mayor control sobre la navegación que los más lejanos. Existe entonces un claro paralelismo en comparación con el efecto de la proximidad temporal entre el EC y el EI en el condicionamiento clásico.

El objetivo de este trabajo es determinar la importancia de la distancia entre la clave visual y el refuerzo en una situación de aprendizaje espacial en anfibios.

## Materiales y método

*Sujetos:* Se utilizaron 18 sapos machos adultos de la especie *Bufo arenarum* provenientes de la localidad de Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires). Los valores de peso estándar variaron entre 94 y 120 g. Los animales se distribuyeron azarosamente en tres grupos experimentales, no registrándose diferencias significativas entre los pesos de los mismos ($F$ (2,15)= 0.09, p= 0.91).

*Dispositivo Experimental:* Se utilizó un campo abierto, arena u *open field* circular de 86 cm de diámetro y paredes blancas de 100 cm de altura. Se ubicó en el centro del cuarto de experimentación, iluminado uniformemente desde arriba. El dispositivo se encontraba rodeado con cortinas blancas para evitar la visualización de las claves externas. La observación de los animales se realizó desde detrás de la cortina a través de un pequeño visor. Durante los ensayos se ubicaron cuatro piletas idénticas distribuidas en cruz contra las paredes laterales, donde sólo una permitía acceso al refuerzo (agua deionizada). Las otras tres piletas también poseían agua, pero la misma estaba fuera del alcance del animal (una rejilla evitaba el contacto del sujeto con el líquido dentro del contenedor). Este procedimiento posee la finalidad de evitar que los animales se guíen hacia la pileta correcta utilizando un gradiente de humedad.



Fotografía del campo abierto (*open field*)

*Procedimiento Experimental:* Los 18 animales se distribuyeron azarosamente en tres grupos:

- Arriba (n=6): Para los animales de este grupo la pileta reforzada se encontraba señalada por una clave visual (panel rayado horizontal multicolor de goma eva de 10 cm x 10 cm) pegada en la pared blanca de la arena a 10 cm sobre la pileta.
- Cerca 10 (n=6): En este caso la pileta reforzada estaba señalada por el panel rayado ubicado a 10 cm sobre y 10 cm hacia la derecha de la pileta.
- Cerca 30 (n=6): Para este grupo el panel que señalaba la pileta reforzada se hallaba a 10 cm sobre y 30 cm hacia la derecha de la pileta.

Los animales de los tres grupos tuvieron 2 sesiones de pre-entrenamiento (1 ensayo cada sesión) y 24 sesiones de entrenamiento de 3 ensayos cada sesión. Los animales comenzaron los ensayos al 80 ⁄ de su peso estándar. Esto se logró mediante un proceso de deshidratación diario en jaulas, a fin de aumentar la motivación de los individuos en la búsqueda de agua. Antes y después de cada sesión se registró el peso del animal, calculándose así la variación de peso. Los entrenamientos se realizaron de manera diaria entre las 8:00 y las 13:00hs. Los animales fueron mantenidos en contenedores plásticos individuales durante todo el período experimental.

*Pre-Entrenamiento:* Todos los sujetos fueron sometidos a dos días de pre-entrenamiento con el fin de habituarlos a las condiciones experimentales. Durante las sesiones de pre-entrenamiento los animales podían desplazarse libremente dentro del dispositivo experimental, en el cual se hallaban las cuatro piletas reforzadas con agua. La duración de cada sesión de pre-entrenamiento fue de 5 minutos.

*Entrenamiento:* Al día siguiente se inició la fase de entrenamiento, que constó de 24 sesiones diarias de 3 ensayos cada una.

Cada ensayo se iniciaba extrayendo al animal de su contenedor individual, apoyándolo en un lienzo para eliminar cualquier posible exceso de humedad, y colocándolo suavemente en el centro de la arena debajo de un contenedor plástico cuadrado translucido invertido (medidas 12cm lado, 8cm alto), siempre en la misma posición (con el rostro hacia el norte). Los animales no podían ver a través de las paredes del contenedor. Se los mantuvo allí por 30 segundos para que se recuperen de los efectos de la manipulación. Luego se retiraba el contenedor, dejando al

animal en libertad de movimiento. Se observaba el comportamiento del sujeto en el dispositivo y se registraba la Latencia de Recorrido (hasta que se subía a una pileta o un tiempo máximo de 3 minutos) y el Tipo de Respuesta (Correcta, si accedió a la pileta reforzada; Incorrecta, si no). Una vez que accedía a alguna de las piletas, se le daba al animal un tiempo de reforzamiento de 2 minutos, dándose luego por concluido el ensayo. El movimiento de los animales en el campo abierto durante el ensayo fue grabado en video; esto permitió observar a posteriori con mayor detalle la trayectoria hasta la elección de una de las piletas. El intervalo entre ensayos fue de 2 minutos (donde el animal permanecía en su contenedor individual). Una vez finalizada la sesión (3 ensayos) el animal era retirado del laberinto, pesado y devuelto finalmente a su recipiente hasta el día siguiente.

En caso de ensayo erróneo, se dejaba al animal 1 minuto en contacto con la pileta no reforzada (o hasta que se baje), luego de ese período se procedía a realizar un ensayo guiado. En este ensayo guiado se estimulaba al animal a caminar hasta acceder a la pileta reforzada, donde permanecía 2 minutos. Generalmente los animales comenzaban a explorar las otras piletas, sin necesidad de guiarlos.

Se estableció un Criterio de Aprendizaje: este criterio fue de un mínimo del 50⁄ de respuestas correctas en 3 sesiones consecutivas (5 de 9 ensayos correctos). Esta modificación del criterio de aprendizaje respecto de los experimentos anteriores se debió a que al utilizar este dispositivo, el animal posee cuatro opciones de elección (y no dos).

*Análisis de las variables:* Las variables dependientes que se registraron durante los ensayos fueron:

5. *Respuesta correcta (elección de la pileta reforzada) o incorrecta (elección de la pileta sin refuerzo)*.
6. *Peso pre y post sesión:* peso del animal al iniciar y al finalizar cada sesión. Con estos datos se obtuvo la *variación de peso* absoluta (peso post sesión – peso pre sesión). Esa diferencia de peso fue luego dividida por el peso estándar del animal y multiplicada por 100. Esto brinda una medida relativa de la variación de peso, o sea, de la captación de agua por parte del animal.

*Estadística:* Las variables estuvieron sujetas a un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido de una comparación de a pares utilizando el test LSD (Least Significant

Difference). En todos los casos para estas comparaciones la significancia fue evaluada estableciendo el valor de alfa en el nivel 0.05.

## Resultados

La *Figura 11* presenta el ⁄ de respuestas correctas por sesión de entrenamiento para cada grupo. Cada punto en el gráfico es el promedio de los datos recolectados para todos los animales del grupo correspondiente. Un ANOVA de 2 factores señala que existen diferencias significativas entre los grupos ($F$ (2,15)=22.18, p<0.05) y en el factor tiempo ($F$ (23,345)=6.34, p<0.05), sin interacción entre factores ($p$>0.5). Un test LSD a posteriori mostró diferencias significativas entre los 3 grupos (Comparación de a pares a posteriori para los tres grupos: Arriba vs Cerca 10: $p$<0.01, Arriba vs Cerca 30: $p$<0.01, Cerca 10 vs Cerca 30: $p$<0.05).

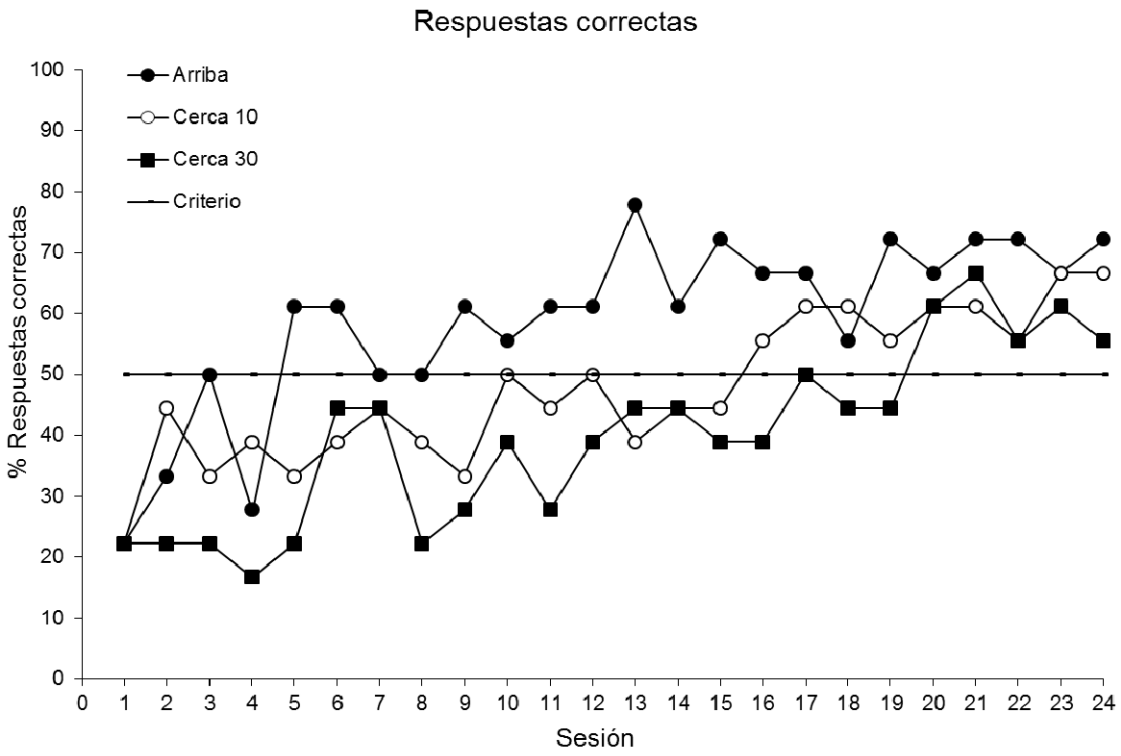



Figura 11: Porcentaje de respuestas correctas para los animales de los tres grupos durante el Experimento 4. Cada punto representa el promedio de todos los animales del grupo para esa sesión.

Para ilustrar las diferencias en el tiempo de adquisición de los 3 grupos se tomó como variable el tiempo hasta llegar a criterio de aprendizaje, graficado en la *Figura 12*. Un ANOVA muestra diferencias significativas entre grupos ($F$ (2,15)=45.89, p<0.05). Un Test LSD a posteriori mostró que esas diferencias fueron entre todos los grupos (Comparación de a pares a posteriori para los tres grupos: Arriba vs Cerca 10: $p$<0.001, Arriba vs Cerca 30: $p$<0.001, Cerca 10 vs Cerca 30: $p$<0.005).

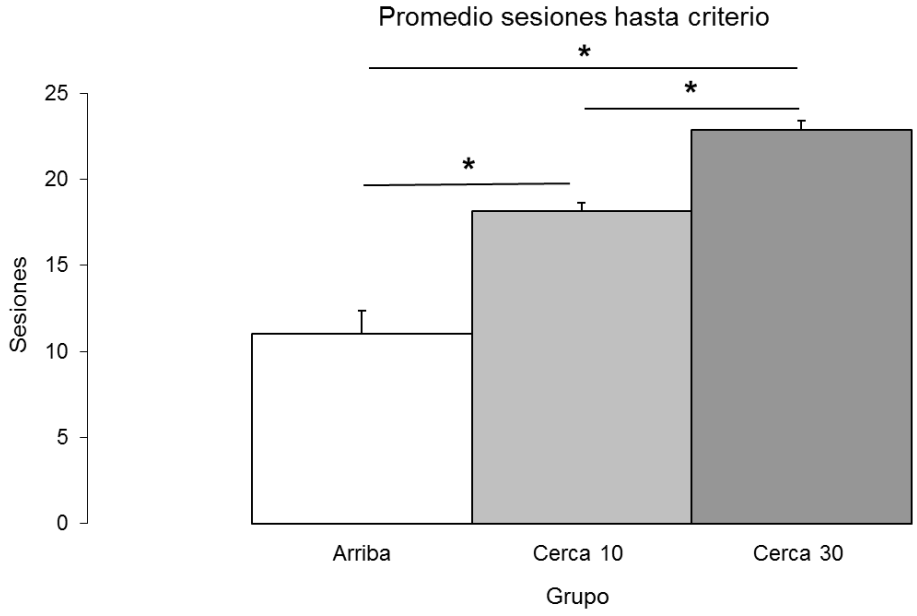



Figura 12: Número promedio de sesiones por animal hasta criterio de aprendizaje para los sujetos de los tres grupos. Las barras verticales indican el error estándar.

La *Figura* 13 muestra la variación de pesos de los tres grupos a lo largo del tiempo. Un ANOVA de 2 factores señala que no existen diferencias significativas entre los grupos ($F$ (2,15)=1.32, p>0.05), pero sí en el factor tiempo ($F$ (23,345)=23.64, p<0.05), aumentando significativamente con el transcurso de las sesiones de entrenamiento. Estos datos sugieren que los individuos en los tres grupos han aprendido la tarea espacial, maximizando su capacidad de incorporar agua durante el período de exposición al refuerzo.

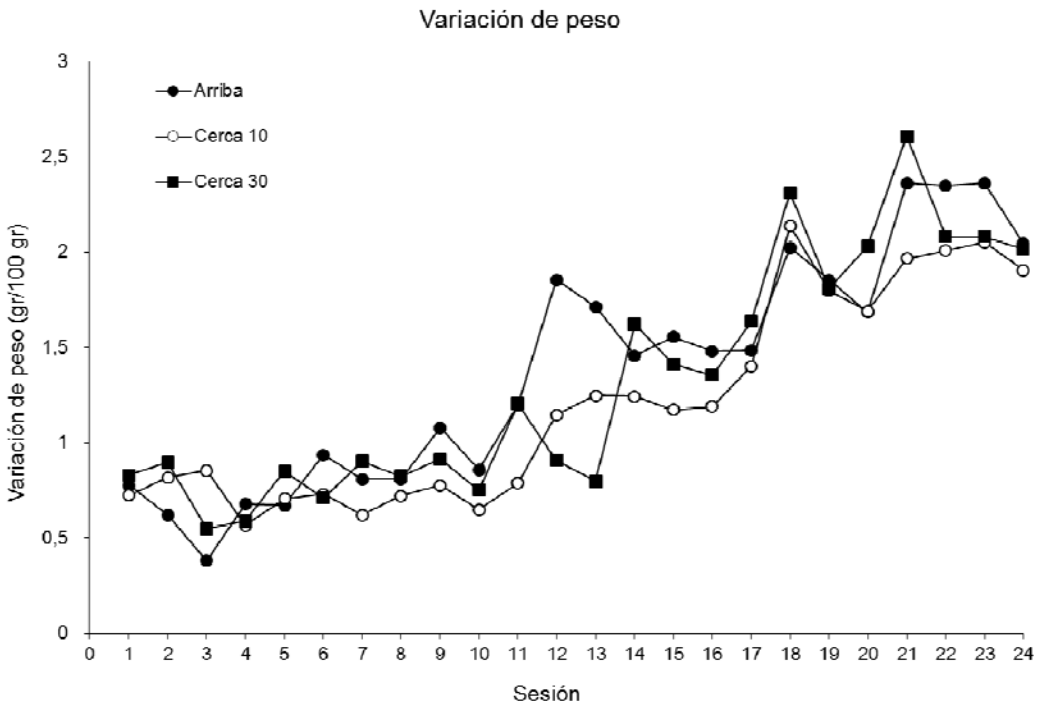



Figura 13: Variación de peso de los tres grupos de animales a lo largo de las sesiones de entrenamiento. Cada punto representa la media para el grupo para esa sesión.

## Conclusiones

Estos resultados demuestran que la distancia entre las claves visuales ambientales y el refuerzo es un factor importante que regula el ritmo de aprendizaje: cuanto más cercanas están las claves, los animales se orientan más rápidamente en el espacio (requiriendo menos sesiones para alcanzar el criterio de aprendizaje). También se observó que la ganancia de agua aumenta con el tiempo, esto sugiere que la capacidad de predicción desarrollada durante el aprendizaje permitiría optimizar la obtención de refuerzo (constituyendo así una respuesta fisiológica adaptativa modulada por procesos cognitivos).

# Bloqueo y Ensombrecimiento

## Introducción

El fenómeno de *bloqueo* se observa cuando el establecimiento previo de un elemento de una clave compuesta como señal del reforzador, reduce o "bloquea" lo que se puede aprender acerca del segundo (Kamin, 1969). Así, el entrenamiento previo con una sola clave bloquea la asociación del refuerzo con otra clave cuando, en una segunda fase del experimento, ambas claves son presentadas simultáneamente señalando la posición del refuerzo.

El término *ensombrecimiento* se refiere al hecho de que una segunda clave, muy conspicua y saliente, causa que los animales aprendan menos acerca de una primera de lo que lo habrían hecho si se los hubiese entrenado sólo con ella (Pavlov, 1927; Kamin, 1969). En una situación de entrenamiento donde se ofrecen dos claves, la más conspicua "ensombrecerá" a la otra quitándole poder de asociación con el reforzador.

Chamizo et al. (1985) verificó por primera vez la existencia de los fenómenos de bloqueo y ensombrecimiento en el uso de claves visuales locales. Estos trabajos permitieron luego ahondaron en el análisis de dichos fenómenos, determinándose que las claves espaciales que rodean a un laberinto de Morris pueden afectar al aprendizaje de esta tarea de modo similar a los estímulos condicionados en el condicionamiento clásico o a los estímulos discriminativos en el condicionamiento instrumental (Rodrigo et al., 1997; Sanchez-Moreno et.al., 1999).

Los siguientes experimentos se realizaron para determinar la existencia de estos dos fenómenos en el aprendizaje espacial en anfibios.

# Experimento 5

# Bloqueo entre claves

## Materiales y método

*Sujetos:* Se utilizaron 13 sapos machos adultos de la especie *Bufo arenarum* provenientes de la localidad de Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires). Los valores de peso estándar variaron

entre 65 y 115 g. Los animales se distribuyeron azarosamente en dos grupos, no registrándose diferencias significativas entre los pesos de los mismos ($F$ (1,11)= 0.88, p= 0.36).

*Dispositivo Experimental, Análisis de las Variables y Estadística:* todos estos aspectos utilizados en este experimento fueron los mismos que para el Experimento 4.

*Procedimiento Experimental:* Los 13 animales se distribuyeron azarosamente en dos grupos:

- Bloqueo (n=7): Para los animales de este grupo, en una primera etapa de entrenamiento la pileta reforzada se encontraba señalada por una clave visual pegada en la pared blanca de la arena a 10 cm de la pileta (la mitad de los animales con un rombo rojo a la izquierda y la otra mitad con un panel rayado horizontal multicolor a la derecha de la pileta). Luego, en una segunda etapa, se agregó otra clave visual (la clave a bloquear: rombo o panel, según qué clave recibieron en la primera etapa).
- No Bloqueo (n=6): En este caso la pileta reforzada siempre estaba señalada por dos claves visuales ubicadas a 10 cm de la pileta (rombo rojo y panel rayado). Los animales de este grupo sólo tuvieron una etapa de entrenamiento.

Los animales de los dos grupos tuvieron 2 sesiones de pre-entrenamiento (1 ensayo cada sesión). Los animales del grupo Bloqueo tuvieron 40 sesiones de entrenamiento divididas en tres etapas: 1 clave, 2 claves y prueba. En la primera etapa se entrenó a los animales con una sola clave visual hasta criterio de aprendizaje (18 sesiones), luego se introdujo la otra clave durante 16 sesiones (hasta criterio de aprendizaje del grupo No Bloqueo) y finalmente se procedió a la etapa de pruebas. Para el grupo No Bloqueo se entrenó a los animales con las dos claves visuales durante 16 sesiones hasta criterio de aprendizaje y luego comenzaron las pruebas. Se administraron 6 sesiones de prueba. Durante las mismas los animales recibieron 4 ensayos por sesión: 3 ensayos de entrenamiento y 1 ensayo de prueba (en segundo o tercer lugar). Los ensayos de prueba fueron incorporados para determinar el valor de predicción de las distintas claves visuales para los animales de ambos grupos. Estos ensayos se dispusieron pseudoazarosamente entre los ensayos de entrenamiento y se retiró el reforzador. Se plantearon 3 tipos de ensayos de prueba: (i) con las dos claves, (ii) sólo con el rombo, y (iii) sólo con el panel rayado (para el grupo Bloqueo, con la primera clave presentada: “clave bloqueadora”, o con la segunda clave presentada: “clave bloqueada”). Se dieron dos presentaciones de cada tipo de ensayo (una vez en la segunda posición y la otra en la tercera).

*Pre-Entrenamiento y Entrenamiento:* Se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 4.

## Resultados

La *Figura 14* presenta el ⁄ de respuestas correctas por sesión de entrenamiento para cada grupo. Un ANOVA de 2 factores señala que no existen diferencias significativas entre los grupos, ni durante las 3 últimas sesiones antes de comenzar con los ensayos de prueba ($p$>0.4), ni durante estos ensayos ($p$>0.5). El aprendizaje de cada uno de los grupos está revelado por un ANOVA con diferencias significativas en el tiempo (Grupo Bloqueo: $F$ (1,12)=23.54, $p$<0.001 - Grupo No Bloqueo: $F$ (1,12)=18.69, $p$<0.001).

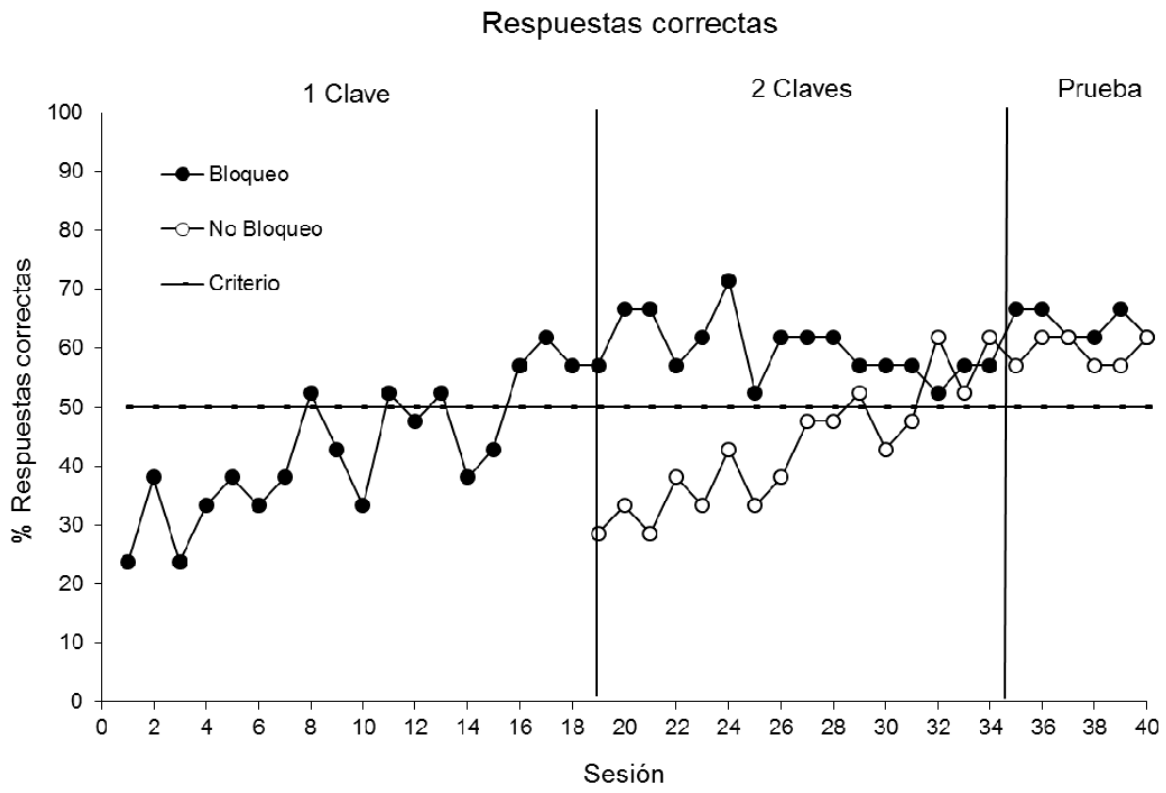
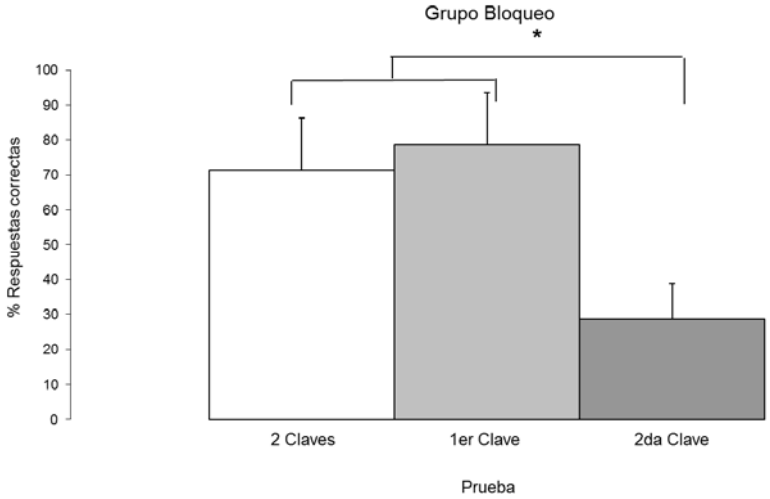



Figura 14: Porcentaje de respuestas correctas para los animales de los grupos Bloqueo y No Bloqueo durante las tres fases del Experimento 5. Cada punto representa el promedio de todos los animales del grupo para esa sesión.

El análisis mediante un ANOVA de los ensayos de prueba reveló diferencias significativas entre las distintas condiciones. En la *Figura 15* podemos observar que los animales del grupo Bloqueo presentaron un desempeño significativamente menor ante la presentación de la segunda clave (clave bloqueada) ($F$ (2,18)=4.03, $p$=0.03; Test LSD a posteriori, 2 Claves vs 1ra Clave: $p$=0.7, 2 Claves vs 2da Clave: $p$<0.05, 1ra Clave vs 2da Clave: $p$<0.05). Estas diferencias no se observaron para el Grupo No Bloqueo ($p$=0.69).



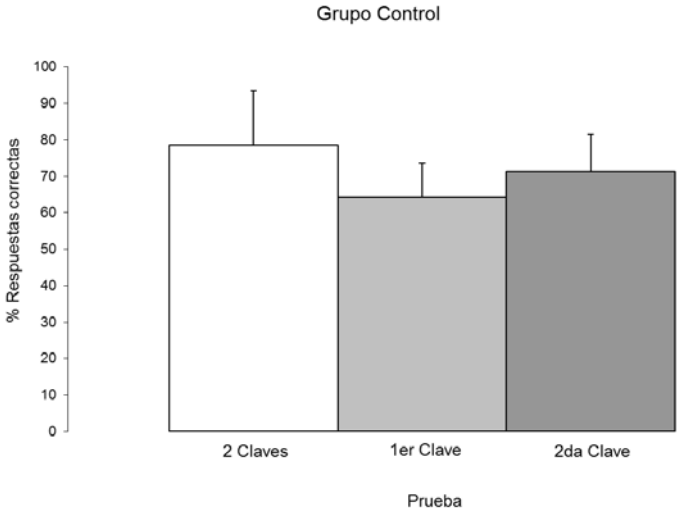




Figura 15: ⁄ de respuestas correctas en las distintas condiciones de prueba para los sujetos de los dos grupos (Arriba: Bloqueo; Abajo: No Bloqueo). Las barras verticales indican el error estándar.

La *Figura 16* muestra la variación de peso de los grupos a lo largo de las sesiones. Un ANOVA de dos factores revela que existen diferencias en el tiempo para cada uno de los grupos (Grupo Bloqueo: $F$ (1,12)=5.47, $p$<0.05; Grupo No Bloqueo: $F$ (1,10)=24.23, $p$<0.001) lo que señala que la ganancia de peso aumentó con el aprendizaje. No existen diferencias significativas entre los grupos una vez que llegaron a criterio de aprendizaje (ANOVA de medidas repetidas para las sesiones 32 a 34, $F$ (1,11)<1, $p$>0.1; sin efecto en el factor sesión: $p$>0.5, ni interacción entre factores: $p$>0.1). Tampoco hubo diferencias durante la aplicación de las pruebas (ANOVA de medidas repetidas para las sesiones 35 a 40, $F$ (1,11)=1.23, $p$>0.1; sin efecto en el factor sesión: $p$>0.5, ni interacción entre factores: $p$>0.5).

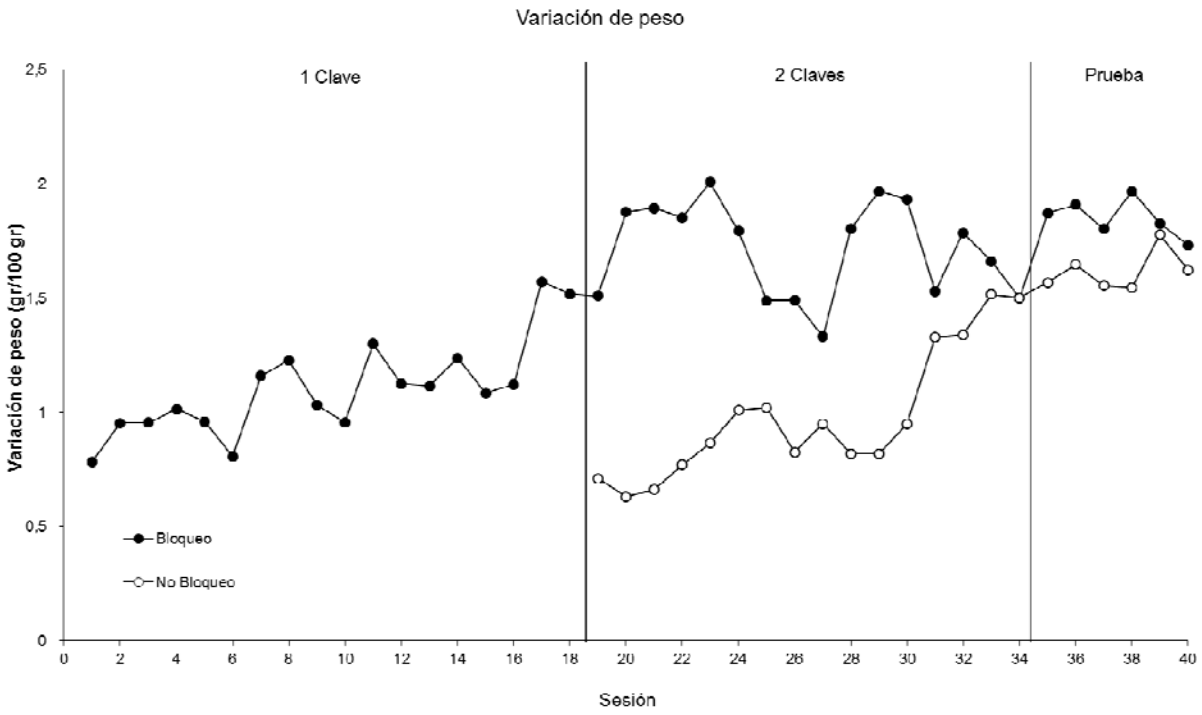



Figura 16: Variación de peso de los animales a lo largo de las sesiones de entrenamiento. Cada punto representa la media para el grupo para esa sesión.

## Conclusiones

En los animales del grupo Bloqueo se observó que el entrenamiento previo con una sola de las claves bloquea la asociación del refuerzo con la otra clave cuando, en una segunda fase del experimento, ambas claves son presentadas simultáneamente señalando la posición del

refuerzo. Este fenómeno no se observó en los animales del grupo No Bloqueo (sin exposición previa), donde las dos claves de presentación simultánea fueron asociadas exitosamente con el reforzador. Este resultado demuestra que el bloqueo entre claves visuales durante el aprendizaje espacial es un fenómeno generalizado, presente en una amplia variedad de vertebrados, que incluye también a los anfibios.

# Experimento 6

# Ensombrecimiento entre claves

## Materiales y método

*Sujetos:* Se utilizaron 16 sapos machos adultos de la especie *Bufo arenarum* provenientes de la localidad de Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires). Los valores de peso estándar variaron entre 100 y 150 g. Los animales se distribuyeron azarosamente en dos grupos, no registrándose diferencias significativas entre los pesos de los mismos ($F$ (1,14)<0.01, $p$= 0.99).

*Dispositivo Experimental, Análisis de las Variables y Estadística:* todos estos aspectos utilizados en este experimento fueron los mismos que para el Experimento 4.

*Procedimiento Experimental:* Los animales se distribuyeron azarosamente en dos grupos:

- Ensombrecimiento (n=8): Para los animales de este grupo la pileta reforzada se encontraba señalada por dos claves visuales (un rombo rojo y un panel rayado horizontal multicolor) pegadas en la pared blanca de la arena a 10 cm de altura: la primera, ubicada a 10 cm a la derecha de la pileta reforzada (clave cercana), y la segunda, colocada en la pared que estaba entre la pileta opuesta y la contigua izquierda (clave lejana). Se entrenaron 4 sujetos con el rombo cerca y el panel rayado lejos, y 4 sujetos a la inversa.
- Control (n=8): En este caso la pileta reforzada estaba señalada por sólo una clave visual (para la mitad de los animales el panel rayado y para la otra mitad el rombo) ubicada en la pared que estaba entre la pileta opuesta a la pileta reforzada y la contigua izquierda (clave lejana).

Los animales de los dos grupos tuvieron 2 sesiones de pre-entrenamiento (1 ensayo cada sesión), 24 sesiones de entrenamiento y 8 sesiones de prueba. Las sesiones de entrenamiento se dieron hasta que ambos grupos habían alcanzado el criterio de aprendizaje. Los ensayos de prueba fueron 8 para el grupo Ensombrecimiento y 4 para el grupo Control. Durante las sesiones de prueba los animales recibieron 4 ensayos por sesión: 3 ensayos de entrenamiento y 1 ensayo de prueba (en segundo o tercer lugar). Los ensayos de prueba fueron incorporados para determinar el valor de predicción de las distintas claves visuales para los animales de

ambos grupos. Estos ensayos se dispusieron pseudoazarosamente entre los ensayos de entrenamiento y se retiró el reforzador. Se plantearon 4 tipos de ensayos de prueba: (i) con las dos claves, (ii) sólo con la clave lejana, (iii) sólo con la clave cercana, y (iv) sin claves. Se dieron dos presentaciones de cada tipo de ensayo (una vez en la segunda posición y la otra en la tercera), sumando 8 ensayos de prueba totales. Los animales del grupo Control sólo tuvieron dos condiciones de prueba (con la clave lejana y sin clave), con un total de 4 ensayos de prueba.

*Pre-Entrenamiento y Entrenamiento:* Se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 4.

## Resultados

La *Figura 17* presenta el ⁄ de respuestas correctas por sesión de entrenamiento para cada grupo. Un ANOVA de 2 factores señala que no existen diferencias significativas entre los grupos, ni durante las 3 últimas sesiones antes de comenzar con los ensayos de prueba ($F$ (1,14)=0.37, $p$=0.54), ni durante estos ensayos ($F$ (1,14)=1.27, $p$=0.27). El aprendizaje de cada uno de los grupos está revelado por un ANOVA con diferencias significativas en el tiempo para cada uno de los grupos (primeras tres sesiones de entrenamiento vs últimas tres sesiones: Grupo Ensombrecimiento: $F$ (1,46)=35.1, $p$<0.001 - Grupo Control: $F$ (1,46)=18.9, $p$<0.001).

Para ilustrar las diferencias en el tiempo de adquisición de los dos grupos se tomó como variable el tiempo hasta llegar a criterio de aprendizaje, graficado en la *Figura 18*. Un ANOVA mostró que existen diferencias significativas entre grupos ($F$ (1,14)=84.45, p<0.001). El grupo Ensombrecimiento necesitó menos sesiones hasta adquirir el aprendizaje. Esto probablemente se deba a la presencia de una clave cercana al reforzador.

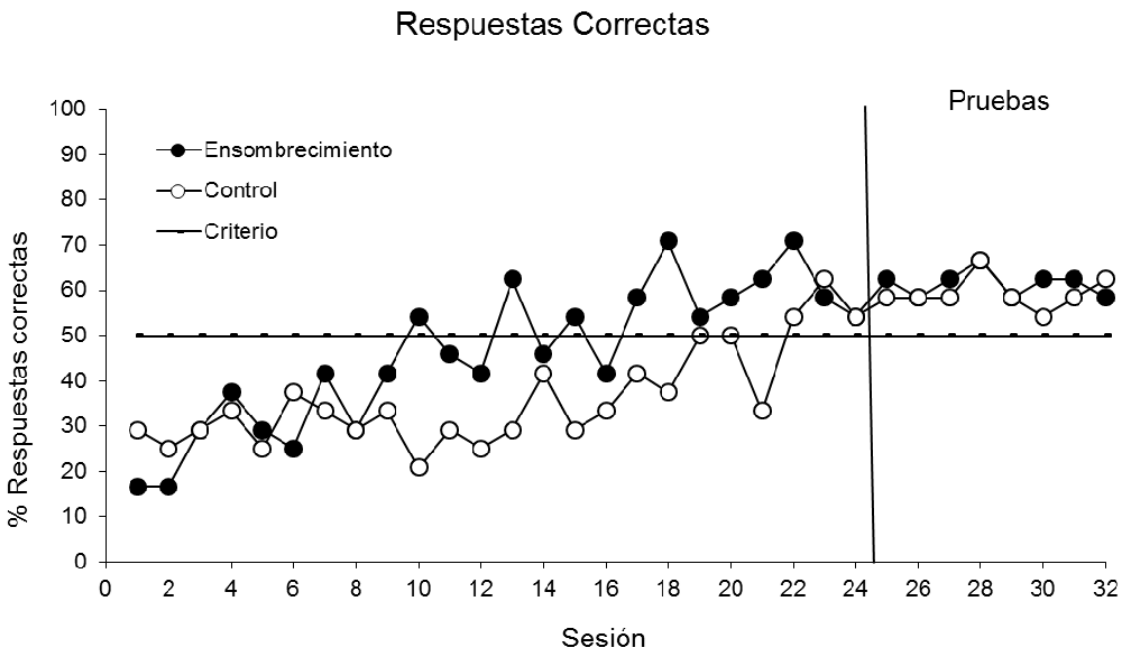



Figura 17: Porcentaje de respuestas correctas para los animales de los dos grupos durante el Experimento 6. Cada punto representa el promedio de todos los animales del grupo para esa sesión.

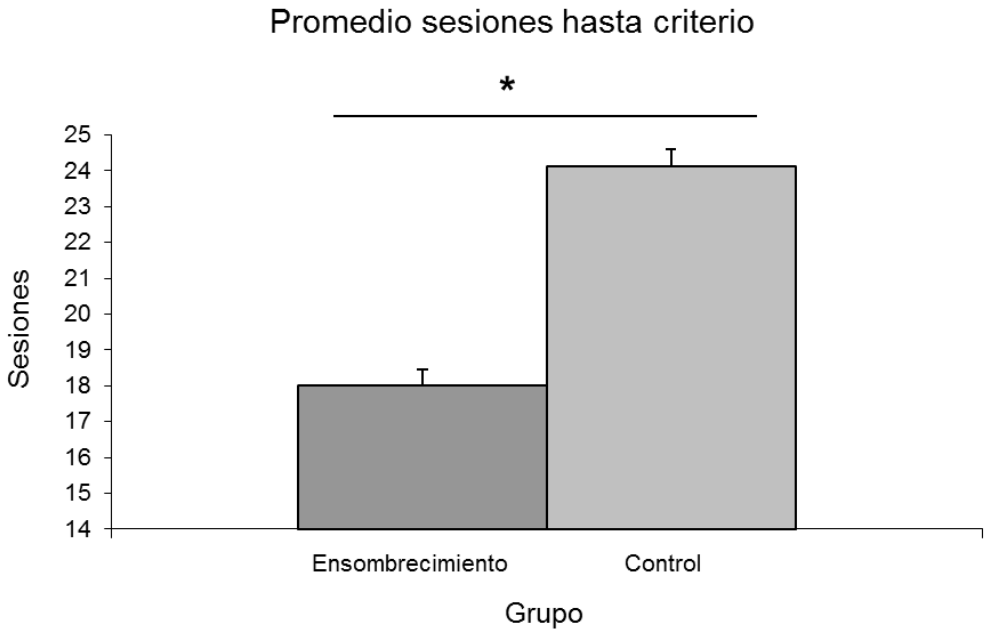
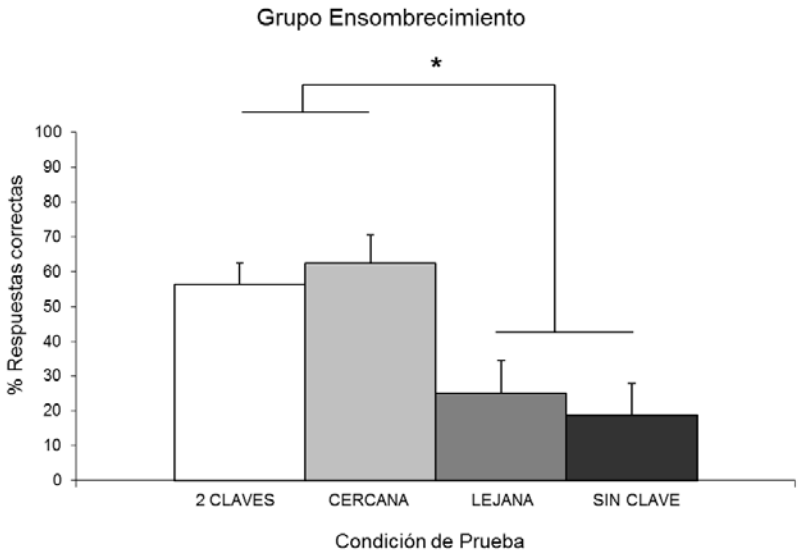



Figura 18: Número promedio de sesiones por animal hasta criterio de aprendizaje para los sujetos de los dos grupos. Las barras verticales indican el error estándar.

La *Figura 19* muestra los resultados de los ensayos de prueba. Un ANOVA comparando el desempeño de ambos grupos en cada situación de prueba revela que los animales del grupo Bloqueo se desempeñaron significativamente peor en la condición de prueba en la cual se presentaba únicamente la clave visual lejana, comportándose de manera similar a la condición sin clave ($F$ (3,28)=6.9, $p$<0.01; Test LSD a posteriori, Clave lejana vs Clave cercana: $p$<0.005, Clave lejana vs dos claves: p<0.05, Clave lejana vs sin clave: p=0.6). Esto sugiere que la clave visual lejana en el grupo experimental fue ensombrecida por la presencia de una clave visual cercana al contenedor y se transformó en una clave sin valor predictivo. Esto no se observó en el grupo Control, donde la clave lejana fue asociada exitosamente con la ubicación del refuerzo ($F$ (1,14)=9, $p$<0.01).



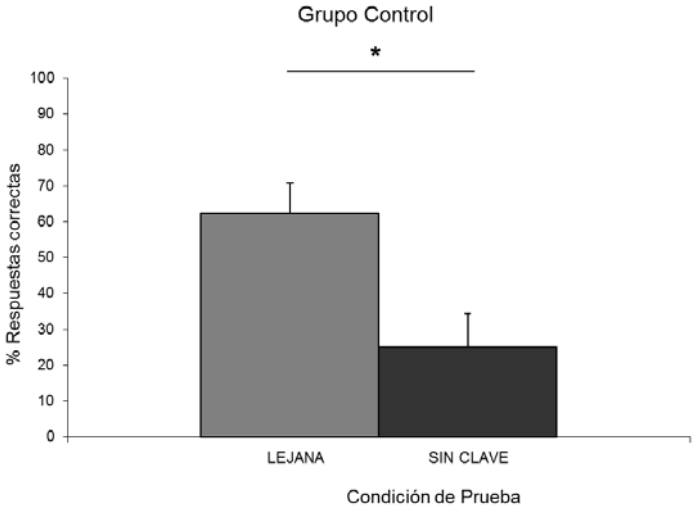




Figura 19: ⁄ de respuestas correctas en las distintas condiciones de prueba para los sujetos de los dos grupos (Arriba: Ensombrecimiento; Abajo: Control). Las barras verticales indican el error estándar.

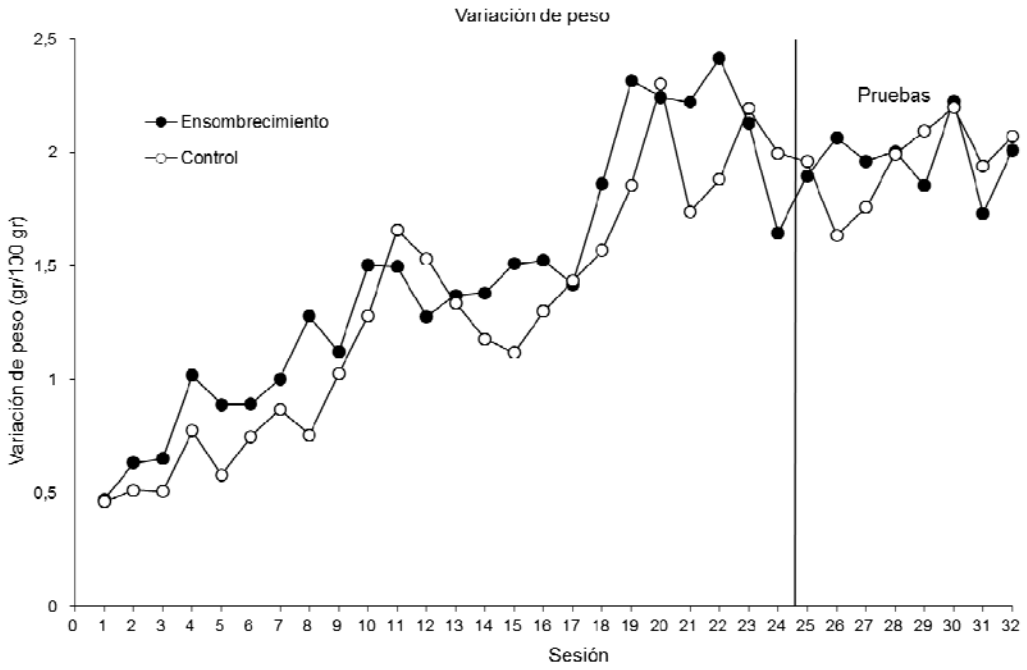



Figura 20: Variación del peso a lo largo de las sesiones de entrenamiento y durante las sesiones de prueba. Cada punto representa la media para el grupo para esa sesión.

En la *Figura 20* podemos ver la variación del peso a lo largo de las sesiones. Un ANOVA de dos factores revela que no existen diferencias entre los grupos durante la fase de adquisición, pero que sí existe una variación significativa en el tiempo (factor grupo: $F$ (1,14)=2.05, $p$=0.17; factor sesión: $F$ (23,322)=21.63, $p$<0.001; sin efecto de interacción: p>0.1). Esto señala que la ganancia de peso aumentó con el aprendizaje para todos los animales. Tampoco aparecieron diferencias entre los grupos en la ganancia de peso durante el período de pruebas (ANOVA de dos factores, factor grupo: $F$ (1,14)=0.006, $p$=0.96) donde la ganancia de peso ya estaba estabilizada (factor sesión: $F$ (7,98)=0.74, $p$=0.63, sin interacción entre factores: $p$>0.5).

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en este experimento sugieren que la clave visual localizada lejos de la pileta con agua fue ensombrecida por la presencia de la clave cercana en los animales del grupo Ensombrecimiento (dicha clave no adquirió ningún valor predictivo). Este fenómeno no se observó en los animales del grupo Control, donde la clave fue estrechamente asociada con la

presencia del reforzador y pudo ser utilizada para predecir su posición. Estos resultados muestran que el fenómeno de ensombrecimiento está claramente presente en anfibios.

## Conclusiones Generales acerca de los fenómenos de Bloqueo y Ensombrecimiento

Spetch (1995) realizó experimentos en palomas y humanos utilizando una pantalla táctil y claves generadas por computadora. Halló que en ambas especies el control adquirido sobre la respuesta (picoteo en las palomas y presionar en los humanos) por una clave a una distancia dada del objetivo, se reducía en presencia de otra clave más cercana. Estos resultados son una clara demostración de ensombrecimiento debido a la proximidad espacial relativa. Este fenómeno de ensombrecimiento también ha sido hallado en humanos utilizando un procedimiento de navegación virtual (Chamizo, 2002).

El efecto de bloqueo ha sido probado en humanos utilizando una versión computarizada del laberinto de Morris (Hamilton & Sutherland, 1999). Los sujetos inicialmente entrenados para localizar una meta invisible con un determinado conjunto de claves, se desempeñaron pobremente al intentar localizar la meta cuando fueron probados con un grupo de claves agregadas con posterioridad (efecto claro de bloqueo).

El bloqueo y el ensombrecimiento entre claves también ha sido probado y estudiado extensamente en abejas (Hammer & Menzel, 1995; Bitterman, 1996). En conjunto, estos resultados sugieren que son fenómenos presentes en un amplio grupo de seres vivos, incluyendo invertebrados. El hallazgo realizado en el presente trabajo de estos dos fenómenos de aprendizaje en anfibios, se suma a los resultados anteriores y apoyan la idea de un origen evolutivo temprano de los mismos.

# Experimento 7

# Inhibición Latente

## Introducción

La *inhibición latente* es un fenómeno que se observa cuando la exposición previa a un estímulo solo, en ausencia de un reforzador, retarda significativamente el condicionamiento subsecuente de ese estímulo cuando se lo presenta asociado a un refuerzo (Lubow, 1973). Lubow y Moore denominaron al efecto como "inhibición latente" porque la presentación no reforzada de un estímulo puede resultar en la adquisición de una inhibición que puede interferir con un condicionamiento subsecuente (Mackintosh, 1983). En su experimento original, utilizaron el termino inhibición latente para describir sus hallazgos de que 10 presentaciones no reforzadas de un estímulo, previo a cualquier condicionamiento, retrasaba significativamente la adquisición de la respuesta condicionada de flexión de la pata ante ese estímulo en ovejas y cabras (Mackintosh, 1974).

La idea de que la pre-exposición no reforzada a un estímulo interfiere significativamente con un condicionamiento subsecuente a ese estímulo está bien establecida. Sin embargo, existe menos consenso acerca de la explicación de ese fenómeno (Mackintosh, 1974).

La interpretación del fenómeno de inhibición latente puede verse desde dos puntos de vista: (i) como una forma de habituación, o (ii) como una pérdida en el valor de predicción. En el primer caso, la presentación repetida de un estímulo puede reducir su novedad; el sujeto se familiariza con él y ya no se sorprende con su presentación. Visto en este sentido la inhibición latente sería una forma de habituación. En el segundo caso, el estímulo se presenta repetidamente sin ser seguido por otro evento, perdiendo así el valor predictivo que puede tener un estímulo novedoso. Como el condicionamiento involucra el establecimiento de un estímulo como predictor de un evento, este cambio en el valor predictivo subyace la baja asociabilidad del estímulo pre-expuesto (Mackintosh, 1983).

También se observa que, además de retrasar la adquisición de la respuesta, la inhibición latente facilita su extinción. Este fenómeno ha sido confirmado en varios procedimientos de aprendizaje: la supresión condicionada, el condicionamiento de parpadeo en conejos, la respuesta de flexión de la pata en ratas, etc. Este fenómeno de facilitación de la extinción de la

respuesta condicionada fue observado por primera vez en 1968 por Lubow en conejos, utilizando un diseño de condicionamiento del movimiento de la oreja ante la presentación de un tono que anticipaba una descarga eléctrica (Mackintosh, 1974). La magnitud del efecto varía con el número de presentaciones no reforzadas del estímulo, y el efecto se generaliza a estímulos similares. Como se mencionaba anteriormente, el hecho de que la preexposición no reforzada a un estímulo interfiere significativamente con su consecuente asociación con un reforzador está bien establecido, lo que no se ha llegado a un acuerdo es en la explicación del fenómeno.

Con respecto a la presencia de este fenómeno en un contexto de aprendizaje espacial existe evidencia previa en un trabajo de Chamizo & Mackintosh (1989) donde se pudo observar en ratas en una situación de entrenamiento en un laberinto con distintos tipos de claves.

En el presente experimento se buscará determinar si el fenómeno de inhibición latente se puede observar usando claves visuales en una situación de aprendizaje espacial en anfibios.

## Materiales y método

*Sujetos:* Se utilizaron 12 sapos machos adultos de la especie *Bufo arenarum* provenientes de la localidad de Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires). Los valores de peso estándar variaron entre 65 y 110 g. Los animales se distribuyeron azarosamente en dos grupos, no registrándose diferencias significativas entre los pesos de los mismos ($F$ (1,10)<0.1, $p$= 0.76).

*Dispositivo Experimental, Análisis de las Variables y Estadística:* todos estos aspectos utilizados en este experimento fueron los mismos que para el Experimento 4.

*Procedimiento Experimental:* Los animales se distribuyeron azarosamente en dos grupos:

- Pre-Expuesto (n=6)
- Control (n=6)

  En ambos casos, la pileta reforzada estaba señalada por sólo una clave visual (un panel rayado horizontal multicolor) ubicada en la pared justo encima de la pileta a 10 cm de altura.

Los animales de los dos grupos tuvieron 2 sesiones de pre-entrenamiento (1 ensayo cada sesión), 16 sesiones de adquisición y 12 sesiones de extinción. Los animales del grupo Pre-Expuesto tuvieron 5 sesiones previas al entrenamiento, donde se presentaba la clave visual sin reforzador. Las sesiones de entrenamiento se realizaron hasta que ambos grupos alcanzaron el criterio de aprendizaje. Las sesiones de extinción se realizaron hasta que ambos grupos retornaron a un nivel de respuesta azaroso.

*Pre-Entrenamiento y Entrenamiento:* Se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 4.

## Resultados

La *Figura 21* presenta el ⁄ de respuestas correctas por sesión de entrenamiento para cada grupo. Un ANOVA para cada uno de los grupos revela diferencias significativas a lo largo de las sesiones, con un aumento significativo en el ⁄ de rtas correctas que refleja el aprendizaje (Grupo Pre-Expuesto: $F$ (15, 80)= 3.08, $p$<0.001; Grupo Control: $F$ (15, 80)= 2.83, $p$<0.005). No se registraron diferencias entre los grupos para las tres últimas sesiones de adquisición (sesiones 14, 15 y 16; ANOVA de medidas repetidas Grupo x Sesión, $F$ (1,10)= 1.08, $p$=0.32; sin efecto de sesión o interacción, $ps$>0.64). El período de extinción finalizó con ambos grupos comportándose de manera azarosa, sin registrarse diferencias entre los mismos (sesiones 31, 32 y 33; ANOVA de medidas repetidas Grupo x Sesión, $F$ (1,10)<0.001, $p$=1; sin efecto de sesión o interacción, $p$=0.89, $p$=0.72).

La *Figura 22* muestra el número promedio de sesiones hasta criterio en ambos grupos para la adquisición y la extinción. Se observó una diferencia significativa en el tiempo de adquisición entre los grupos Pre-expuesto y Control ($F$ (1,10)=80,52, p<.001), reflejando así que los animales del grupo Pre-expuesto necesitaron más entrenamiento para el aprendizaje (aproximadamente 16 sesiones para el grupo Pre-expuesto y 10 sesiones en el grupo Control). Durante la fase de extinción, ese mismo grupo Pre-expuesto presentó una extinción de la respuesta mucho más rápida: se requirieron aproximadamente 11 sesiones en el grupo Control, y sólo 8 sesiones en el grupo Pre-expuesto ($F$ (1,10)=25,6, p<.001).

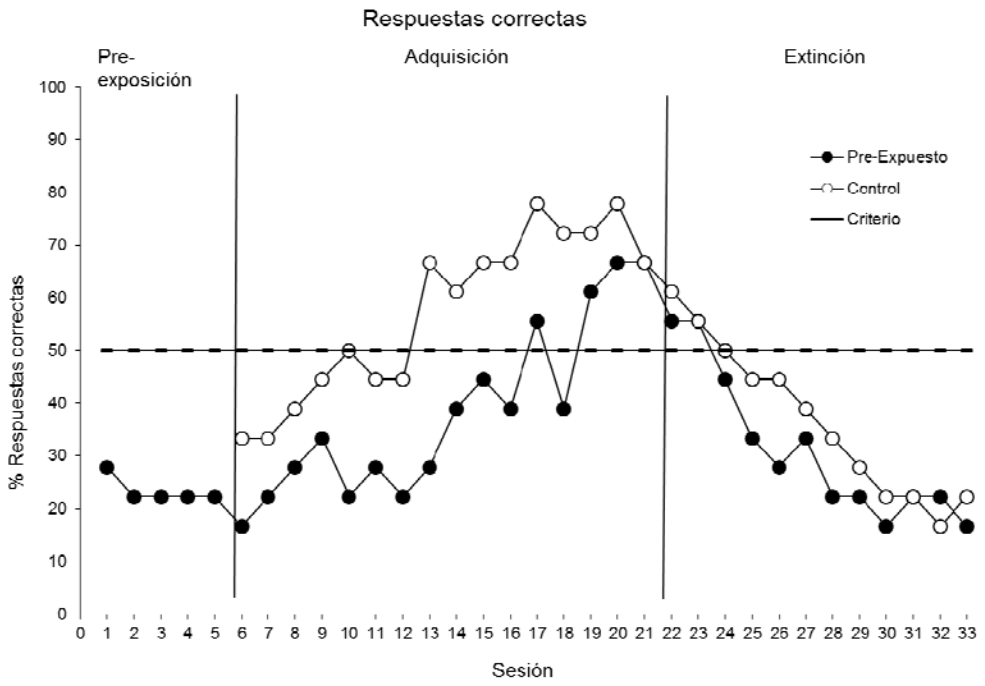



Figura 21: Porcentaje de respuestas correctas para los animales de los dos grupos durante las distintas fases del Experimento 7. Cada punto representa el promedio de todos los animales del grupo para esa sesión.

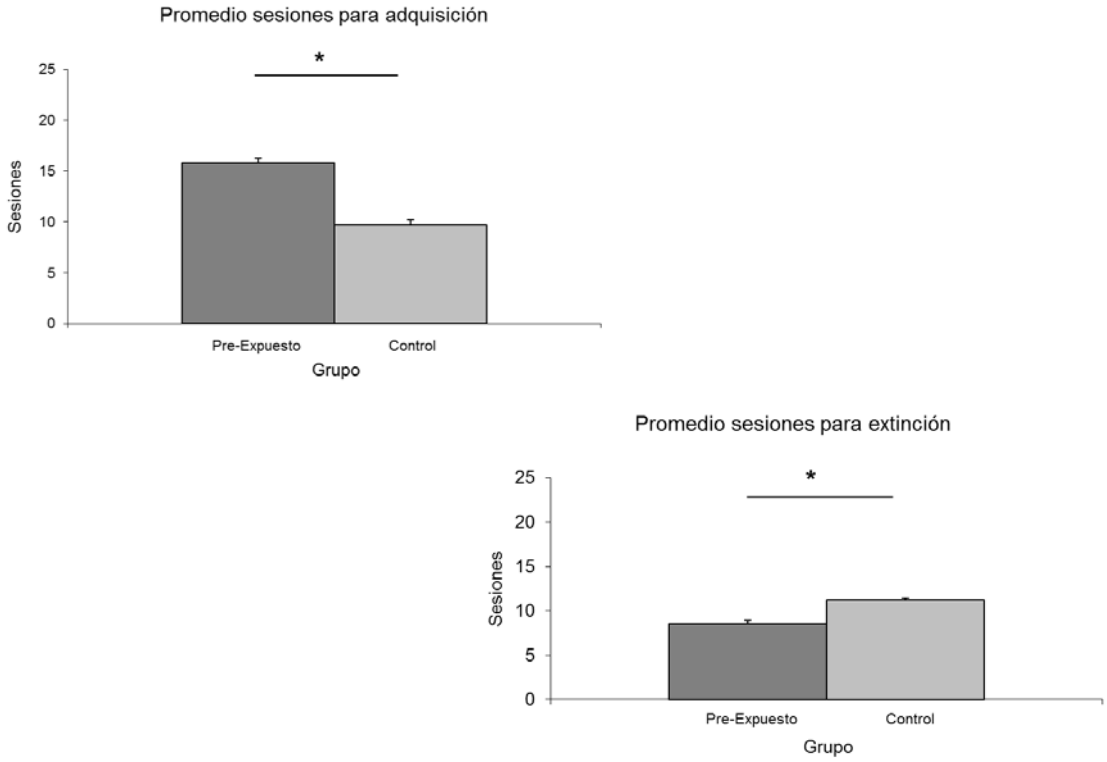



Figura 22: Número promedio de sesiones por animal hasta criterio de adquisición (Arriba) y extinción (Abajo) para los sujetos de los dos grupos. Las barras verticales indican el error estándar.

La *Figura 23* muestra la variación de peso de los grupos a lo largo de las sesiones. Un ANOVA de dos factores revela que no existen diferencias en el desempeño de los dos grupos en la adquisición ($F$ (1,10)=0.02, p=0.87). A su vez, cada uno de los grupos tuvo un aumento significativo de la ganancia de peso a lo largo de este período (Grupo Pre-Expuesto: $F$ (15,80)=3.09, $p$<0.001; Grupo Control: $F$ (15,80)=2.01, $p$<0.05), hecho que refleja un aprendizaje de las condiciones de entrenamiento (capacidad anticipatoria que permitió maximizar la ganancia de agua). Durante la extinción la variación de peso fue similar para ambos grupos, sin registrarse diferencias entre los mismos ($F$ (1,10)=0.20, $p$=0.65).

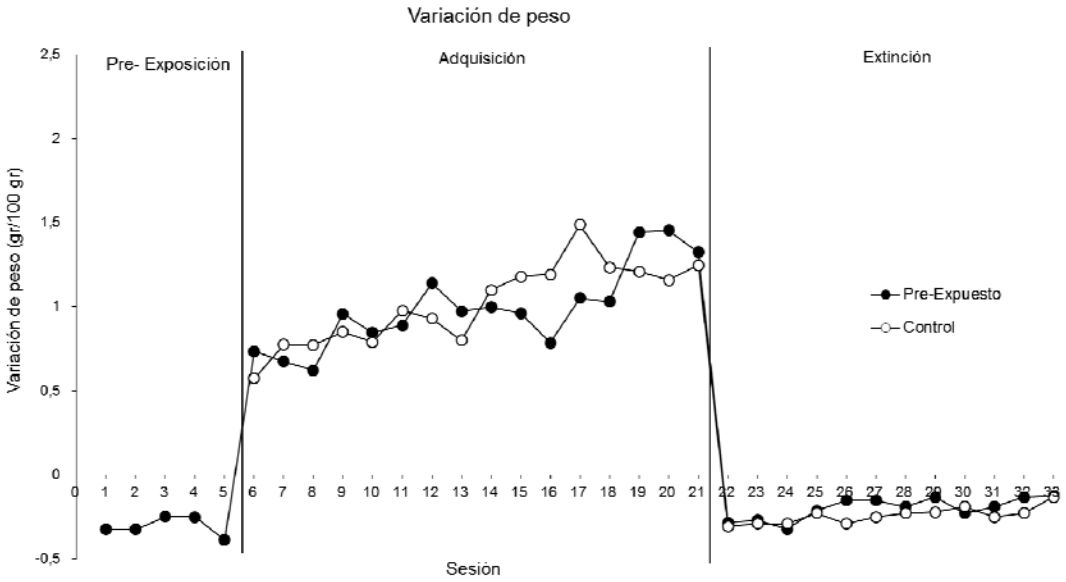



Figura 23: Variación de peso de los animales a lo largo de las sesiones de entrenamiento. Cada punto representa la media para el grupo para esa sesión.

## Conclusiones

Como se puede observar en los resultados, la preexposición a la clave visual (exposición no reforzada del estímulo) retrasó significativamente la adquisición, demorando la asociación de este estímulo con el reforzador. También se observó una facilitación de la extinción en la última fase del entrenamiento. Una pre-exposición de cinco presentaciones no reforzadas del estímulo (clave visual) fueron suficientes para que el fenómeno tenga una magnitud significativa tanto en la adquisición como en la extinción.

Podemos concluir, entonces, que estos resultados revelan la presencia del fenómeno de inhibición latente usando claves visuales en una situación de aprendizaje espacial en anfibios.

## Discusión General acerca de Fenómenos

Como conclusión general de este capítulo, podemos afirmar que el conjunto de estos cuatros fenómenos (efecto de la proximidad de la clave la refuerzo, bloqueo y ensombrecimiento entre claves, e inhibición latente), previamente documentados en aves y mamíferos, también están presentes en anfibios (siendo este trabajo el primero en reportarlos para este grupo).

Por otra parte, confirma el paralelismo establecido entre el aprendizaje espacial mediante el uso de claves visuales proximales y otras formas de aprendizaje, las que estarían gobernadas por las mismas leyes asociativas. Estos fenómenos observados comparten una dinámica asociativa común, todos ellos son fenómenos proactivos de procesamiento de la información (Loy et. al., 2006).

Es altamente probable que los procesos de aprendizaje asociativo observados en estos experimentos jueguen un papel importante en los procesos a través de los cuales un animal se orienta en el espacio (Loy et. al., 2006).

Dado que estos fenómenos ya habían sido observados en aves, mamíferos e incluso invertebrados, este primer registro en anfibios sugiere que los mecanismos biológicos de estos fenómenos de aprendizaje habrían surgido muy tempranamente en el curso de la evolución y que han sido fuertemente conservados.

Así, la información obtenida en estos experimentos constituye un paso importante en el análisis comparado de estos fenómenos de aprendizaje.

# Bases Neurales

## Introducción

La relación del hipocampo en los procesos de aprendizaje y memoria espacial aparece como una constante en todas las especies animales estudiadas (Rodríguez et al., 1998). Los osteíctios ancestrales que poblaron la tierra a principios del período Devónico (hace cerca de 400 millones de años), son ancestros comunes tanto de los peces actinopterigios actuales como de los sarcopterigios actuales (entre los que se incluyen los anfibios, reptiles, aves y mamíferos). Resultados de estudios en diversas especies sugieren que estos osteíctios ancestrales poseían un pallium medial o hipocampo que se desarrolló como un sistema de navegación espacial que incluía mecanismos cerebrales y cognitivos especializados en el procesamiento de la información espacial y en procesos de aprendizaje y memoria espacial, sistema que se ha conservado a lo largo de la filogenia (Rodríguez et al., 1998).

Además de las similitudes anatómicas, pueden encontrarse estrechas similitudes en cuanto a las funciones del pallium medial o hipocampo de todos los vertebrados.

Numerosas evidencias apoyan la participación del hipocampo de las aves y los mamíferos en el aprendizaje y la memoria espacial.

En aves y mamíferos, el daño a la formación hipocampal causa deficiencias selectivas en la resolución de problemas espaciales cuando la localización de un lugar requiere la codificación de relaciones recíprocas con un conjunto de claves ambientales (aprendizaje de “lugar”), pero no cuando requiere acercarse a una única clave (estrategia de guía), o cuando discriminaciones no espaciales le permiten al animal alcanzar la meta (Salas et al., 2003).

O’Keefe y Conway (1980) estudiaron en ratas los efectos de una lesión en el fornix (removiendo todas las grandes entradas de información al hipocampo). Observaron que estos animales tenían severamente disminuidas su capacidad de orientarse en el espacio utilizando una serie de claves visuales distribuidas alrededor de todo un laberinto de 4 brazos en cruz. Si, por el contrario, las claves se hallaban conglomeradas

cerca del brazo reforzado no tenían problemas en orientarse. Estos hallazgos sugirieron que dicha conglomeración de claves les permitía a los animales utilizar una estrategia alternativa al mapa cognitivo para localizar el brazo reforzado, posiblemente utilizando una asociación clave-refuerzo (taxón) que no fue afectada por la lesión. Siguiendo con esta lógica, Eichenbaum et al. (1991) hallaron que los animales con lesión en fibria-fornix no presentaban problemas en su desempeño en un laberinto de agua o laberinto de Morris si comenzaban todos los ensayos desde el mismo punto de partida, permitiendo una orientación mediante una estrategia de guía (i.e., taxón) hacia la plataforma; pero sufrieron un impedimento durante el procedimiento estándar donde se ubicaba a las ratas en la pileta en diferentes posiciones en cada ensayo, requiriendo de un aprendizaje flexible de las relaciones entre claves alrededor de la pileta (Hodges, 1996).

Los hallazgos de que las lesiones hipocampales afectaban el desempeño de los animales en tareas que implicaban el uso de múltiples claves espaciales, pero no en tareas con clave única sugirieron que las tareas involucraban procesos diferentes (Hodges, 1996).

En los distintos grupos de vertebrados las habilidades de aprendizaje espacial parecen estar asentadas en mecanismos neurales homólogos: como el hipocampo en aves y mamíferos, el cortex medial en los reptiles es crítico para las habilidades de mapeo cognitivo y, de manera similar, el pallium telencefálico lateral de peces, el presunto homólogo del hipocampo de amniotas, está selectivamente involucrado en la cognición espacial (Salas et al., 2003). Así, en peces y reptiles, el sustrato neural involucrado en el aprendizaje espacial podría corresponder a estructuras telencefálicas homólogas al hipocampo: el *pallium lateral* y *medial*, respectivamente (López, 1999; Papini et al., 1999).

Evidencia experimental reciente indica que el córtex medial de los reptiles posee una función central en la cognición espacial. Por ejemplo, el volumen relativo del cortex medial es mayor en especies de lagartijas que forrajean activamente en búsqueda de presas en comparación con aquellas especies con estrategias de forrajeo más pasivas (Day et al., 1999). Las lesiones en córtex medial producen una deficiencia severa y

selectiva en la memoria de lugar en tortugas entrenadas pero, al igual que con las lesiones en hipocampo, no se ve afectado el uso de estrategias de guía u otras estrategias egocénticas para alcanzar la meta (Grisham & Powers, 1990). Así, el efecto del daño en cortex medial de tortugas y en el hipocampo de aves y mamíferos son sorprendentemente similares no sólo en relación a las funciones que se ven disminuidas, sino también en relación a los procesos que no se ven afectados (Salas et al., 2003).

Los amniotas parecen ser un grupo monofilético que evolucionó de un grupo primitivo de tetrápodos durante los inicios del Carbonífero (Gaffney, 1980; Carroll, 1988). Las capacidades de memoria y la presencia de aprendizaje espacial alocéntrico dependiente del cortex medial en reptiles, aves y mamíferos sugieren que este rasgo podría ser un carácter primitivo de amniotas. Así, estas capacidades de aprendizaje podrían ya haber estado presentes en el ancestro común reptiliano de los amniotas modernos que habitó la tierra en la era Mesozoica, habiendo sido conservado a lo largo de la evolución en cada linaje independientemente. Es más, evidencia experimental reciente muestra que el pallium lateral de los peces actinopterigios está involucrado de manera similar en el aprendizaje de lugar, lo cual sugiere la posibilidad de que este rasgo relacionado con la cognición espacial puede haber aparecido más temprano aún durante la filogénesis de los vertebrados (Salas et al., 2003).

El telencéfalo de los anfibios presenta un nivel de organización primitivo (en el sentido de no derivado) entre los tetrápodos. En los anuros, el telencéfalo presenta bulbos olfatorios pares rostrales a los hemisferios telencefálicos pares evaginados, con ventrículos bien desarrollados que se continúan caudalmente por el telencéfalo medio o impar no evaginado. El telencéfalo de los anfibios puede dividirse en una región palial o pallium y otra subpalial (Muzio, 1999; Rodríguez et al., 1998). En el palio o pallium pueden distinguirse las siguientes zonas principales: 1) El **pallium medial** es la región más extensa del pallium de los anfibios y ocupa el cuadrante dorsomedial del hemisferio. 2) Se continúa lateralmente con el **pallium dorsal**, sin que se aprecie una frontera precisa entre ambas zonas. El pallium dorsal de los anfibios puede considerarse homólogo al mismo o isocortex de otros vertebrados. 3) Finalmente, el pallium lateral es la zona que recibe las principales aferencias olfativas, por lo que su

topología y conectividad puede ser considerada homóloga al córtex piriforme de otros vertebrados.

Existe una hipótesis muy aceptada con respecto al *pallium medial* de anuros respecto de que es homólogo al complejo hipocampal de otros tetrápodos, basado en la posición topográfica (cuadrante dorsomedial del telencéfalo), presuntas interconexiones neurales e histoquímica (Northcutt & Ronan, 1992). Esta hipótesis se basa en que hay muchas similitudes en las conexiones aferentes y eferentes del pallium medial de los anuros y aquellas de las regiones subicular y CA (*Cornu Ammonis*) del hipocampo de los mamíferos. En ambos casos se presentan extensas aferencias de áreas relacionadas con la olfación, núcleo septal, núcleos de la banda diagonal de Broca, tálamo anterior y rafe. También, en ambos casos, las proyecciones eferentes terminan en el bulbo olfatorio principal, el núcleo septal, núcleo accumbens, la áreas hipotalámicas anteriores y preópticas y el tálamo anterior (Northcutt & Ronan, 1992). Además, se reportó que una vía de fibras identificada como homóloga al fórnix de mamíferos se origina en la región dorsomedial del telencéfalo en anfibios (Northcutt & Ronan, 1992).

El pallium medial del telencéfalo anfibio, a diferencia de otras regiones del pallium, se caracteriza por una pronunciada hipertrofia y migración de neuronas desde la pared ependimal. Este grado de desarrollo sugiere que es una estructura importante en el cerebro de los anfibios. En el presente, sin embargo, su papel funcional es desconocido, y sus fibras de conexión primarias en anfibios sólo se conocen parcialmente (Northcutt & Ronan, 1992).

En mamíferos, aves, reptiles y peces, las lesiones del hipocampo o estructuras funcionalmente homólogas producen deficiencias en la resolución de tareas espaciales basadas en el empleo de múltiples claves distribuidas en el entorno, pero no en tareas que requieren estrategias básicas (Bingman, 1992; Peterson, 1980; Rodríguez et al, 1994). Por ejemplo, se ha observado que ratas con pérdida de células CA1 hipocampales luego de isquemia global inducida por oclusión, mostraron una marcada imposibilidad de aprendizaje de lugar en el laberinto de agua o de Morris, pero no

mostraron impedimentos en tareas de aprendizaje de giro o con uso de claves visuales en un laberinto radial (Nunn, et al., 1991).

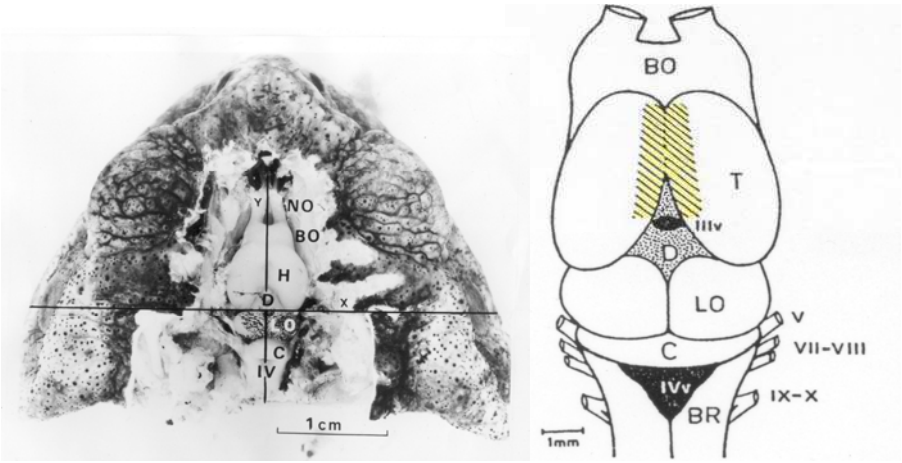
Dada la importancia de esta capacidad para la supervivencia, probablemente haya surgido muy tempranamente en el curso de la evolución, conservándose hasta nuestros días.

En la actualidad no existen estudios sobre los sistemas de aprendizaje y memoria espacial de los anfibios. Este hecho es llamativo ya que resultan excelentes modelos de cerebro con una organización simple sin neocortex, donde se esperan hallar aquellos componentes básicos del aprendizaje espacial (i.e., sin modulación cortical) dado que conforman un grupo filogenéticamente muy antiguo. Las primeras investigaciones experimentales en el pallium medial de anuros no pudieron demostrar una clara homología con la formación hipocampal de mamíferos. Sin embargo, el pallium medial en *Bufo* y *Ambystoma* presenta una extensa conectividad, incluyendo proyecciones a regiones palliares y subpalliares ipsilaterales al igual que proyecciones comisurales al pallium medial contralateral y proyecciones tipo fórnix a hipotálamo y tálamo ventral (Northcutt & Ronan, 1992).

El objetivo de este capítulo de la tesis fue entonces estudiar la implicancia del *pallium medial* de los anfibios en tareas simples de orientación espacial mediante el análisis de los efectos de la lesión de esta estructura. Se espera así contribuir a una mejor comprensión, tanto de la homología como de las equivalencias funcionales del pallium medial de los anfibios con el hipocampo de otros grupos de vertebrados.

En este punto vale aclarar que al realizar una exploración neural en el sapo *Bufo arenarum* con el fin de ubicar el *pallium medial*, se ha observado que la relación de tamaño de cráneo/cerebro es muy inconstante a pesar de seleccionar animales de similar tamaño corporal. Este hecho hace imposible el establecimiento de un cero estereotáxico o de otro punto de referencia en el cráneo del animal como marca para la ubicación de dicha estructura a la hora de efectuar una intervención quirúrgica. Para subsanar este inconveniente, fue necesario seleccionar un punto fácilmente localizable de manera visual en el cerebro del sapo. El punto elegido fue el vértice del ángulo formado en el punto de divergencia de los hemisferios, que coincide centralmente con

el foramen interventricular (foramen Monroi). Anatómicamente los hemisferios cerebrales están situados justo detrás de los bulbos olfatorios, la línea de demarcación está constituida por una depresión leve. Los ventrículos laterales corren a lo largo de sus correspondientes hemisferios, posteriormente se unen y, con el tercer ventrículo, forman el foramen interventricular o foramen Monroi (Hoffmann, 1973). El primordio hipocampal, también llamado *pallium medial* o archipallium, se encuentra en la convexidad dorsal de los hemisferios. Ventralmente está separado del septum por una zona libre de células llamada zona limitante medial y lateralmente es lindante con la pared ventricular. Este primordio hipocampal disminuye su tamaño en la región caudal y finalmente termina en el polo posterior de los hemisferios (Hoffmann, 1973).

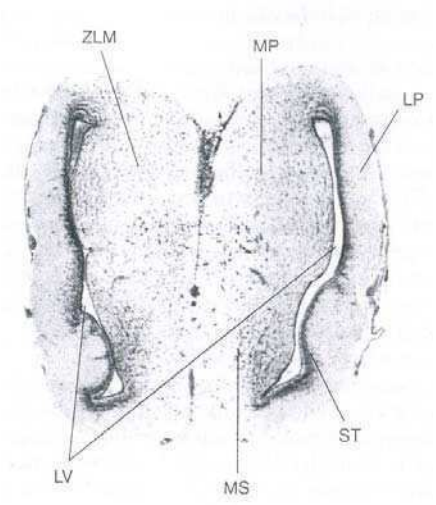



**Anatomía del encéfalo de *Bufo arenarum***

**Izquierda**: Disección que expone una vista dorsal del encéfalo de *Bufo arenarum.* Se señala el punto de referencia (o) que se utilizó para localizar el pallium medial.

**Derecha**: Esquema dorsal donde se señala la estructura de interés: el pallium medial.

NO: nervio olfatorio, BO: bulbo olfatorio, H: hemisferio, T: telencéfalo, LO: lóbulo óptico, C: cerebelo, BR: bulbo raquídeo, V - X: pares craneanos.




**Corte transversal del cerebro de *Bufo arenarum* a nivel medio del telencéfalo (x50)**

MP: medial pallium.
LP: lateral pallium.
ST: striatum.
LV: lateral ventriculus.
ZLM: zona limitans medialis.
MS: medial septum.

## Experimento 8

## Efecto de la lesión del pallium medial en la estrategia de giro

### Materiales y método

*Sujetos y Dispositivo Experimental*: Se utilizaron 17 sapos machos adultos de la especie *Bufo arenarum* provenientes de la localidad de San Vicente (Provincia de Buenos Aires). El peso estándar de los animales varió entre 75 y 110 g, y no difirió de manera significativa entre los grupos (ANOVA, $F$ (2,14)= 0.34, p=0.71). Las condiciones de mantenimiento, el aparato y el cuarto experimental fueron los mismos que en el Experimento 1.

*Procedimiento Experimental*: las condiciones de pre-entrenamiento fueron las mismas que en el Experimento 1. El entrenamiento comenzó al día siguiente. Se administraron 20 sesiones diarias de entrenamiento, con tres ensayos por sesión. Los sujetos fueron asignados azarosamente a uno de tres grupos:

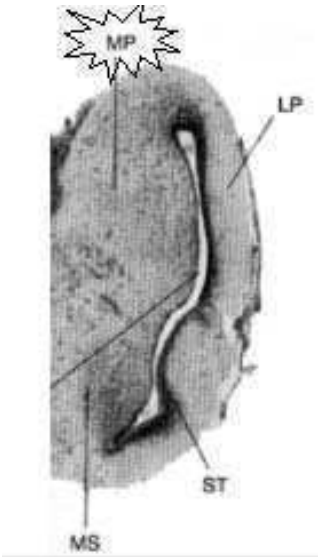
- Lesión (n= 7): Animales con lesión en el pallium medial.
- Control Sham (n= 5): Animales con operación simulada; es decir, se les practicaba todo el procedimiento quirúrgico sin realizar la lesión.
- Control Intacto (n= 5): Animales intactos, sin ninguna manipulación quirúrgica.

Para los tres grupos, las condiciones de entrenamiento fueron las mismas: los animales partieron de manera pseudoazarosa de los brazos 1 o 3 del laberinto. La pileta reforzada se encontraba siempre en el brazo de la derecha o de la izquierda, según el animal. Seguir una estrategia de giro fija era necesario para resolver con éxito la consigna.

*Lesión del pallium medial*: Los sujetos lesionados y los sujetos control sham fueron anestesiados con tricaina metanosulfonato (MS222, Sigma) y ubicados en la mesa de operaciones. Se realizó una incisión en el cráneo con torno, retirando una porción de hueso en el área dorsal (procedimiento bajo control visual a través de una lupa

binocular). Una vez expuesto el cerebro y retiradas las meninges, se procedió a realizar una lesión bilateral en el pallium medial mediante la aspiración del tejido utilizando una micropipeta conectada a una bomba de vacío. Luego de la lesión, el trozo de cráneo y la piel fueron devueltos a su posición original y fijados con pegamento sintético. Los sujetos fueron devueltos a sus contenedores individuales para su período de recuperación. El procedimiento quirúrgico de los sujetos control sham fue el mismo, excepto por la lesión.

El método de análisis de datos y los análisis estadísticos utilizados en este experimento fueron los mismos que para el Experimento1.




**Fotografía de un corte del hemisferio izquierdo de encéfalo intacto de *Bufo arenarum* (Grupo Control) (x50)**
MP (pallium medial), LP (pallium lateral), ST (striatum) y MS (septum medial).

**Fotografía de un corte del hemisferio izquierdo de encéfalo lesionado de *Bufo arenarum* (Grupo Lesión) (x50)**
Nótese la lesión del pallium medial que ha sido removido por aspiración.

## Resultados

La *Figura 24* presenta el ⁄ de respuestas correctas por sesión de entrenamiento para cada grupo. Cada punto en el gráfico es el promedio de los datos recolectados para todos los animales del grupo correspondiente. Un ANOVA global de medidas repetidas revela diferencias significativas entre los grupos ($F$ (2,14)=25.14, $p$<0.001) y a través del tiempo *(*$F$ (19, 266)= 4.39, $p$<0.01). Si analizamos el desempeño de los grupos a lo largo de las sesiones podemos observar que el grupo Control Sham y el Control Intacto aumentaron significativamente su desempeño con el correr del entrenamiento (ANOVA, $F$ (19,80)=3.21, $p$<0.001 y $F$ (19,80)=2.51, $p$<0.005, respectivamente). Para los animales del grupo Lesión no hubo un mejoramiento en el desempeño a lo largo de los ensayos ($F$ (19,120)=0.59, $p$=0.90), lo que refleja una falta de aprendizaje. Al analizar el desempeño de los grupos durante el período asintótico final de adquisición (últimas tres sesiones de entrenamiento): (i) no se ven diferencias entre el grupo Control Intacto y Control Sham, y (ii) ambos difieren del grupo Lesión (sesiones 18, 19 y 20; ANOVA de medidas repetidas Grupo x Sesión, $F$ (2,14)= 36.77, $p$<0.001; sin efecto de Sesión o Interacción, $p$=0.90, $p$=0.63. Comparación de a pares a posteriori: Control Intacto vs Control Sham: $p$=0.53, Control Intacto vs Lesión: $p$<0.001, Control Sham vs Lesión: $p$<0.001).

La *Figura 25* muestra los datos de la captación de agua para los tres grupos a lo largo de las sesiones. Durante las primeras tres sesiones de entrenamiento no se presentaron diferencias significativas entre los grupos (F (2,14)= 2.01, p=0.17, efecto de sesión e interacción también no significativos, p=0.26 y p=0.19 respectivamente). Las diferencias entre los grupos aparecieron en las últimas tres sesiones de entrenamiento (sesiones 18, 19 y 20; ANOVA de medidas repetidas Grupo x Sesión, F (2,14)= 12.27, p<0.001; sin efecto de Sesión o Interacción, p=0.89, p=0.96. Comparación de a pares a posteriori: Control Intacto vs Control Sham: p=0.28, Control Intacto vs Lesión: p<0.005, Control Sham vs Lesión: p<0.005), donde los sujetos de los grupos Controles se diferenciaron significativamente de los sujetos lesionados, que no mostraron una mejora en la captación de agua. Esto muestra que la falta de

aprendizaje por parte de los animales lesionados les impide anticipar la presentación del reforzador y así maximizar la ganancia de agua.

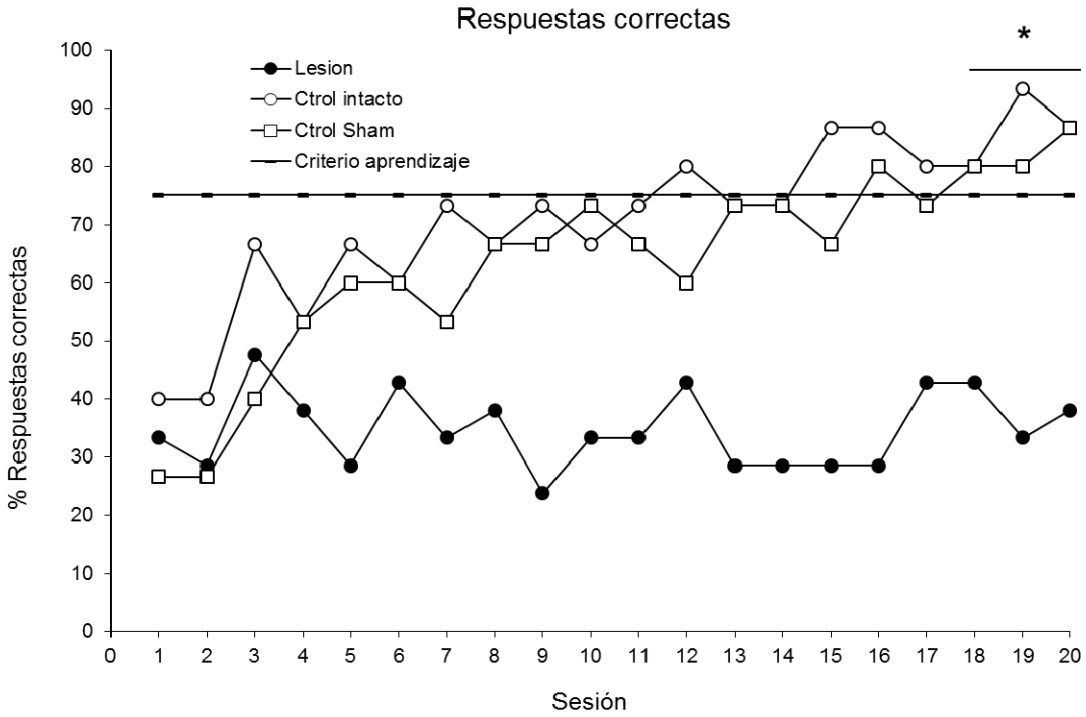



Figura 24: Porcentaje de respuestas correctas para los animales de los tres grupos durante el Experimento 8. Cada punto representa el promedio de todos los animales del grupo para esa sesión.

## Conclusiones

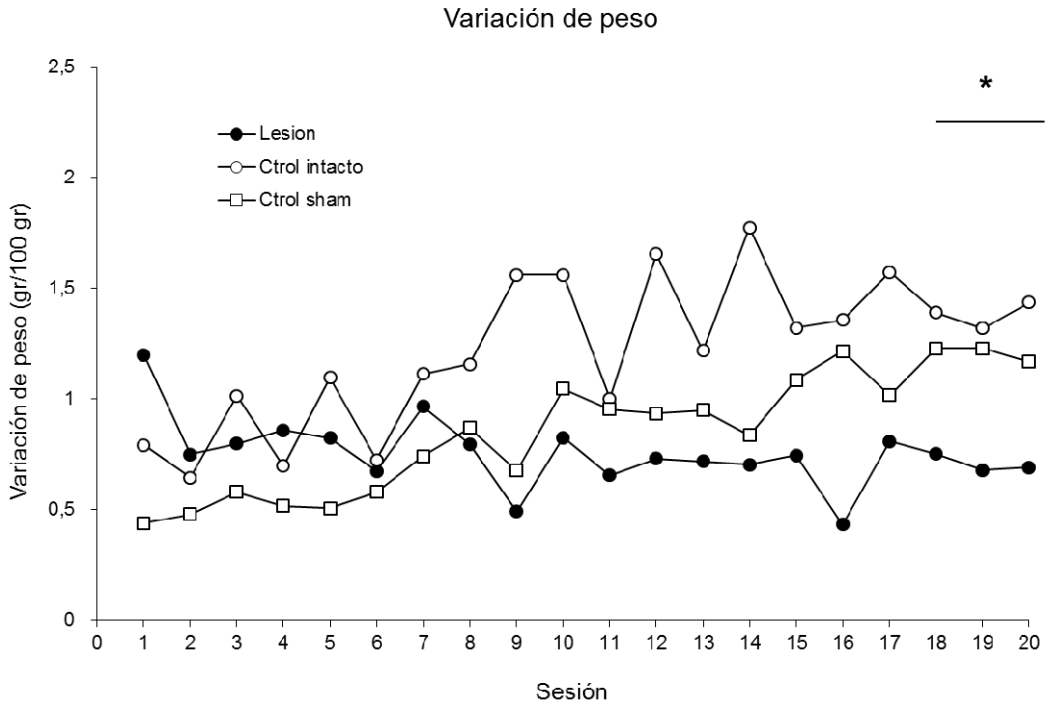



Figura 25: Variación de peso de los animales a lo largo de las sesiones de entrenamiento. Cada punto representa la media para el grupo para esa sesión.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que los animales con lesión del pallium medial pierden la capacidad de orientarse en el espacio mediante una estrategia de giro y, por lo tanto, de anticipar la presentación del refuerzo en una determinada ubicación en el espacio. Esto muestra que en los anfibios, a diferencia de lo que ocurre con el hipocampo de los mamíferos, el pallium medial participa en la regulación de esta estrategia básica de orientación en el espacio. Estos resultados sugieren que el hipocampo de mamíferos y el pallium medial de anfibios, si bien son estructuralmente homólogos, no tienen una equivalencia funcional completa.

## Experimento 9

## Efecto de la lesión del pallium medial en la estrategia de guía

### Materiales y método

*Sujetos y Dispositivo Experimental:* Se utilizaron 19 sapos machos adultos de la especie *Bufo arenarum* provenientes de la localidad de San Vicente (Provincia de Buenos Aires). El peso estándar de los animales varió entre 70 y 120 g, y no difirió de manera significativa entre los grupos (ANOVA, $F$ (2,16)= 0.06, p=0.93). Las condiciones de mantenimiento, el aparato y el cuarto experimental fueron los mismos que en el Experimento 1.

*Procedimiento Experimental:* las condiciones de pre-entrenamiento fueron las mismas que en el Experimento 1. El entrenamiento comenzó al día siguiente. Se administraron 10 sesiones diarias de entrenamiento, con tres ensayos por sesión. Los sujetos fueron asignados azarosamente a uno de tres grupos:

- Lesión (n = 7): Animales con lesión en el pallium medial.
- Control Sham (n = 6): Animales con lesión simulada; es decir, se les practicaba todo el procedimiento quirúrgico sin realizar la lesión.
- Control Intacto (n = 6): Animales intactos, sin ninguna manipulación quirúrgica.

Para los tres grupos las condiciones de entrenamiento fueron las mismas: los animales partieron de manera pseudoazarosa de los brazos 1 o 3 del laberinto. En este caso, la pileta llena de agua se encontraba directamente señalada por una clave visual proximal intra-laberinto (clave visual fija) localizada al final del brazo reforzado. Esta clave consistió de un panel rectangular con cuatro barras horizontales azules sobre un fondo rojo (mismo panel que en el Experimeto 2). En todos los ensayos la clave estaba localizada en una posición cambiante en relación al punto de partida. Una pileta idéntica con agua fuera de alcance para el animal fue ubicada siempre en el brazo opuesto (brazo no reforzado). Los animales debían utilizar una estrategia de guía

basada en la clave visual intra-laberinto como única solución para resolver el problema planteado durante el entrenamiento.

La lesión de pallium medial se realizó de la misma manera que en el experimento anterior. El método de análisis de datos y los análisis estadísticos utilizados en este experimento fueron los mismos que para el Experimento 2.

## Resultados

La *Figura 24* muestra que el entrenamiento tuvo un efecto significativo en el ⁄ de respuestas correctas sólo para los grupos controles. Durante las últimas tres sesiones el desempeño de ambos grupos Controles se diferenció visiblemente del grupo Lesión (sesiones 8, 9 y 10; ANOVA de medidas repetidas Grupo X Sesión, efecto de grupo $F$ (2,16)= 46.39, $p$<0.001; sin efecto de sesión o interacción, $p$=0.88, $p$=0.87, respectivamente. Comparación de a pares a posteriori: Control Intacto vs Control Sham: $p$=0.26, Control Intacto vs Lesión: $p$<0.001, Control Sham vs Lesión: $p$<0.001). La falta de capacidad para adquirir el aprendizaje hizo que los sujetos del grupo Lesión se comporten azarosamente a lo largo de todo el entrenamiento.

La *Figura 25* muestra los datos de la captación de agua para los tres grupos a lo largo de las sesiones. Durante la primera sesión de entrenamiento no se presentaron diferencias significativas entre los grupos ($F$ (2,16)= 0.77, $p$=0.47). Pero sí aparecieron diferencias en las últimas tres sesiones (sesiones 8, 9 y 10; ANOVA de medidas repetidas Grupo x Sesión, $F$ (2,16)= 25.68, $p$<0.001; sin efecto de sesión o interacción, $p$=0.35, $p$=0.53, respectivamente. Comparación de a pares a posteriori: Control Intacto vs Control Sham: $p$=0.71, Control Intacto vs Lesión: $p$<0.005, Control Sham vs Lesión: $p$<0.005). De esta forma, los sujetos de los grupos Controles se diferenciaron significativamente de los sujetos lesionados, que no mostraron una mejora en la captación de agua. Esto muestra que la falta de aprendizaje por parte de los animales lesionados les impide anticipar la presentación del reforzador y así maximizar la ganancia de agua.

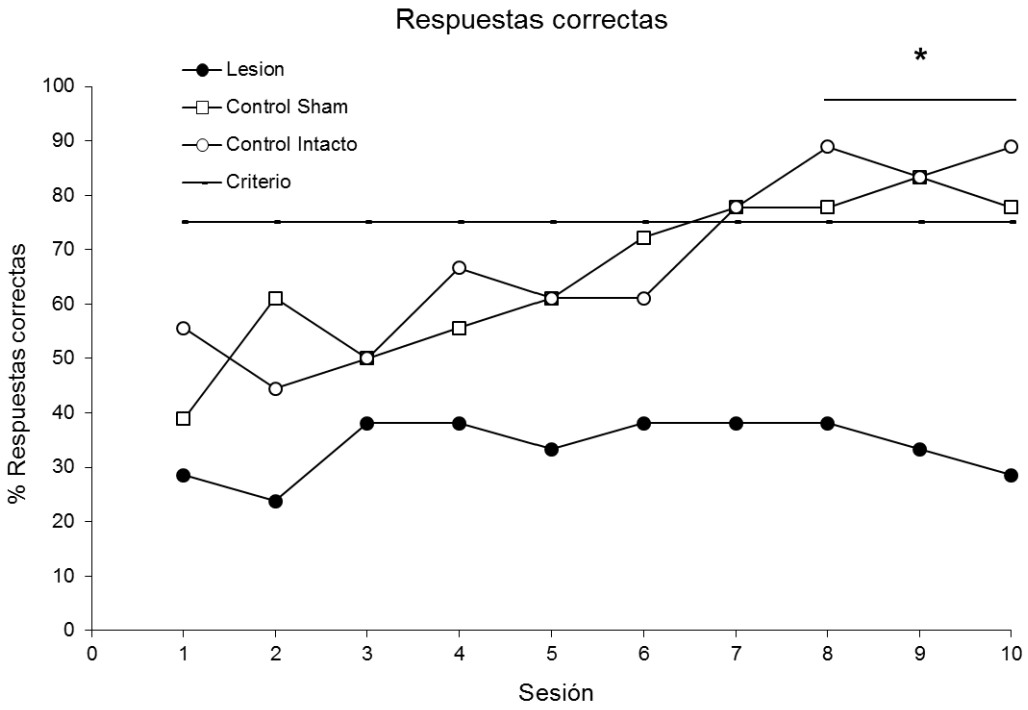



Figura 26: Porcentaje de respuestas correctas para los animales de los grupos Lesión en el pallium medial, Sham e Intacto durante el Experimento 9. Cada punto representa el promedio de todos los animales del grupo para esa sesión.

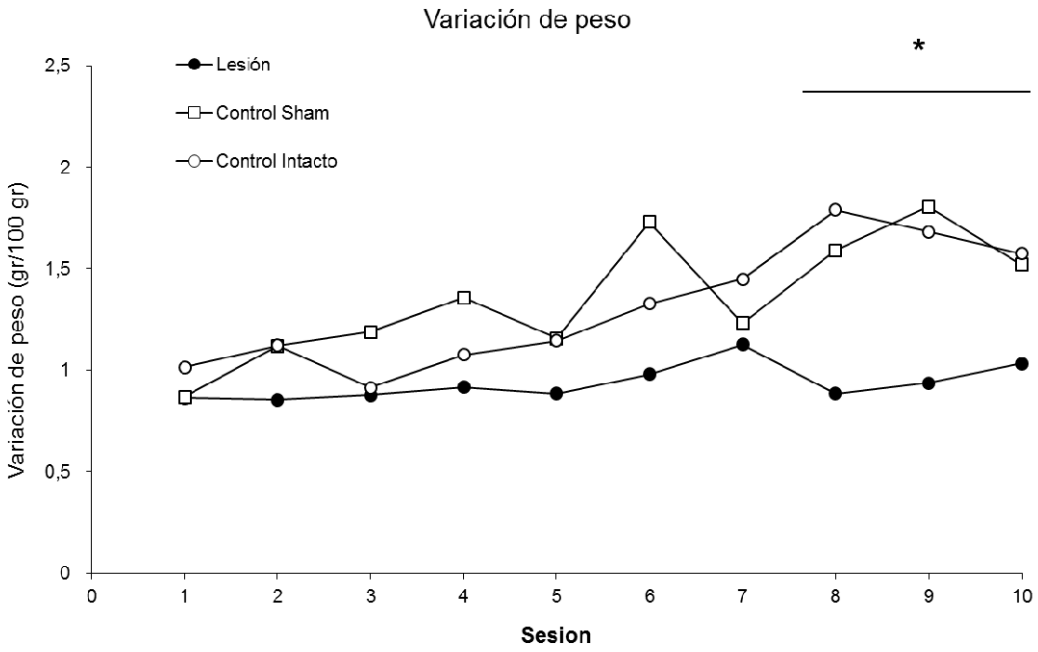



Figura 27: Variación de peso de los animales de los tres grupos a lo largo de las sesiones de entrenamiento. Cada punto representa la media para el grupo para esa sesión.

## Conclusiones

Estos resultados sugieren que los animales con lesión del pallium medial pierden la capacidad de orientarse en el espacio mediante el uso de claves visuales proximales y de anticipar la presentación del refuerzo en una determinada ubicación en el espacio. Esto muestra que en los anfibios el pallium medial participa en la regulación de esta estrategia básica de orientación en el espacio. Así, los resultados obtenidos sugieren que el hipocampo de mamíferos y el pallium medial de anfibios presentan equivalencia funcional a este nivel.

## Discusión General acerca de Bases Naurales

Existe considerable consenso sobre la homología del hipocampo de mamíferos, el córtex medial de reptiles, el área hipocampal-parahipocampal de las aves y el pallium medial de los anfibios. Esto sugiere que los peces óseos que poblaron la tierra a principios del Devónico (hace 400 millones de años), y que eventualmente dieron lugar a los actuales peces óseos y a los tetrápodos, ya poseían un hipocampo desarrollado como un sistema de navegación espacial que se ha conservado a lo largo de la filogenia. Aunque se han enfatizado aspectos conservados en la evolución del telencéfalo de los vertebrados, existe también evidencia de que la selección natural ha producido el desarrollo de partes específicas en correlación con la evolución de conductas especializadas (Papini, et al., 1999).

Los resultados presentados en esta sección muestran que los anfibios con lesión del pallium medial pierden la capacidad de orientarse en el espacio mediante el uso de estrategias simples de orientación (giro y uso de claves visuales proximales). Esto les impide anticipar la presentación del refuerzo en una determinada ubicación en el espacio.

Globalmente, el conjunto de resultados obtenidos sugieren que en los anfibios, a diferencia de los mamíferos (donde el hipocampo participa fundamentalmente en el desarrollo de las estrategias de guía), el pallium medial es el responsable de ambas estrategias básicas de orientación en el espacio (giro y guía). De esta forma, se podría concluir que el pallium medial de anfibios y el hipocampo de mamíferos, aunque son neuroanatómicamente homólogos, comparten sólo una equivalencia funcional parcial.

# Discusión General y Conclusiones

Este trabajo revela lo poco que se conoce acerca de los límites del aprendizaje en anfibios. Un mejor conocimiento de estos límites nos llevaría a reflexionar acerca del concepto de "inteligencia comparada" dentro de la filogenia de los vertebrados. La investigación comparada con anfibios puede brindar datos interesantes acerca de la importancia evolutiva y adaptativa del uso de las distintas estrategias de aprendizaje en vertebrados. Así, el estudio del cerebro y la conducta de vertebrados no mamíferos, y en particular los anfibios como los primeros en colonizar el medio terrestre, puede ayudar a entender la historia evolutiva del cerebro de los mamíferos (Muzio, 1999).

Varios estudios han sugerido que mamíferos, aves, reptiles y peces pueden aprender, recordar y retornar a un lugar utilizando diferentes estrategias de navegación. Ahora los anfibios también pueden ser incluidos en este grupo. Si asumimos que los mismos sistemas de memoria se presentan en esta amplia variedad de especies, entonces podríamos suponer que estos procesos de memoria pueden haber aparecido tempranamente durante la filogénesis. Los estudios comparados en anfibios pueden ser una herramienta para averiguar en qué momento particular de la filogenia aparecieron estas particulares habilidades espaciales.

Nuestros experimentos mostraron que los anfibios anuros de la especie *Bufo arenarum* poseen un mecanismo complejo de aprendizaje espacial. Dicho mecanismo implica el uso de distintas estrategias que se ponen en juego de manera cooperativa y entre las cuales existe una preferencia jerárquica. También involucra la existencia de distintos fenómenos complejos cuando se utilizan claves visuales del ambiente. Como era predecible, la base neural de estas habilidades complejas pudo establecerse en el pallium medial, estructura homóloga al hipocampo de los mamíferos.

***Estrategias***. De las **estrategias** existentes en vertebrados se demostró que los individuos de esta especie utilizan la orientación usando como referencia su propio cuerpo (respuesta de ***giro***) y que también poseen la habilidad para codificar ciertas relaciones espaciales entre la ubicación de la meta y un punto de referencia visual

(respuesta de ***guía***). A su vez, se pudo establecer que son capaces de integrar varias fuentes de información conformando sistemas múltiples de memoria espacial a fin de aumentar la eficiencia de navegación. Cuando la integración de distintas fuentes de referencias falla o es contradictoria, los anfibios podrían seguir un sistema de jerarquías, al igual que los mamíferos. Nuestros resultados muestran que sapos entrenados con una combinación de claves visuales e internas (auto-referencia) prefieren estas últimas (i.e., una respuesta de ***giro***) cuando las dos fuentes de información entran en conflicto. Esta existencia de sistemas múltiples de memoria espacial estaría aumentando la eficiencia de navegación en ambientes con claves redundantes.

***Fenómenos***. Al analizar el uso de claves visuales para la orientación en el espacio se planteó la búsqueda de la presencia de 4 fenómenos básicos del aprendizaje: el **efecto de la proximidad de la clave al refuerzo**, el **bloqueo** y el **ensombrecimiento** entre claves y la **inhibición latente**. Dado que estos fenómenos ya habían sido observados en aves, mamíferos e incluso invertebrados, resultaba muy importante determinar su presencia en anfibios. Así, los resultados de esta tesis constituyen el primer registro de la presencia de estos fenómenos en anfibios. Estos resultados son de gran relevancia, ya que sugieren que los mecanismos biológicos de estos fenómenos de aprendizaje habrían surgido muy tempranamente en el curso de la evolución y que han sido fuertemente conservados.

***Bases neurales***. Uno de los resultados más importantes de los reportados en esta tesis es que, al igual que el hipocampo de las aves y mamíferos, el *pallium medial* de los anfibios está involucrado en la **memoria espacial**. El estudio de las bases neurales nos muestra que los anfibios con lesión del pallium medial pierden la capacidad de orientarse en el espacio mediante el uso de estrategias simples de orientación (giro y uso de claves visuales proximales). Estos resultados sugieren que en los anfibios el *pallium medial* participa en la regulación de ambas estrategias básicas de orientación en el espacio (giro y guía), a diferencia de los mamíferos donde el hipocampo participa fundamentalmente en el desarrollo de la estrategia de guía. Se puede concluir así que el **pallium medial** de anfibios y el **hipocampo** de mamíferos, aunque son neuroanatómicamente homólogos, comparten sólo una equivalencia funcional parcial.

Globalmente, el conjunto de resultados reportados en esta tesis tiene un gran valor en el ámbito del análisis comparado del aprendizaje, brindando nueva información acerca de la evolución del telencéfalo y las capacidades cognitivas de los vertebrados.

| | |
|---|---|
| Doctorando | Director de Tesis |
| Lic. María Florencia Daneri | Dr. Rubén N. Muzio |

# Bibliografía

Able, K. P. (1991). Common themes and variations in animal orientation systems. *American Zoologist,* **31**, 157-167.

Adler, K. (1980). Individuality in the use of orientation cues by green frogs. *Animal Behaviour,* **28**, 413-425.

Alyan, S. & Jander, R. (1994). Short-range homing in the house mouse, *Mus musculus*: stages in the learning of directions. *Animal Behaviour*, **48**, 285-298.

Baldwin, R. A. (1974). The water balance response of the pelvic "patch"of *Bufo punctuatus* and *Bufo boreas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **47A**, 1285-1295.

Benhamou, S. (1998). Place navigation in mammals: a configuration-based model. *Animal Cognition,* **1**, 55-63.

Bentley, P. J. (1966). Adaptations of amphibian to arid environments. *Science*, **152**, 619-623.

Bingman, V. P. (1990). Spatial navigation in birds. In R. Kesner & D. S. Olton (Eds.). *Neurobiology of Comparative Cognition.* Hillsdale, NJ: Erlbaum. Pp. 423-477.

Bingman, V. P. (1992). *Spatial navigation in birds*. Neurobiology of Comparative Cognition. Hillsdales. Lawrence Erlbaum Associates.

Bingman, V. P. (1992). The importance of comparative studies and ecological validity for understanding hippocampal structure and cognitive function. *Hippocampus,* **2**, 213-220.

Bingman, V. P., Bagnoli, P., Loale, P., & Casisni, G. (1989). Behavioral and anatomical studies of the avian hippocampus. In V. Chanpalay & C. Kohler (Eds.). *The Hippocampus: New vistas.* New York: Alan R. Liss. Pp. 379-394.

Bitterman, M. E. (1996). Comparative analysis of learning in honeybee. *Animal Learning and Behavior*, **24**, 123-141.

Boice, R., Quanty, C. B. & Williams, R. C. (1974). Competition and possible dominance in turtles, toads and frogs. *Journal of Comparative and Physiological Psychology,* **86**, 1116-1131.

Bossema, I. (1979). Jays and oaks: An eco-ethological study of a symbiosis. *Behaviour,* **70**, 1-117.

Brattstrom, B. H. (1990). Maze learning in the fire-bellied toad, *Bombina orientalis*. *Journal of Herpetology,* **24 (1)**, 44-47.

Brower, L. P. & Brower, J. V. Z. (1962). Investigations into mimicry. *Natural History,* **71**, 8-19.

Butler, A. B & Hodos, W. (1996). *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation*. New York: Wiley-Liss.

Carroll, R. (1988). *Vertebrate Paleontology and Evolution*. New York: Freeman.

Chamizo, V. D. (2002). Spatial Learning: Conditions and Basic Effects. *Psicológica,* **23***,* 33-57.

Chamizo, V. D. & Mackintosh, N. J. (1989). Latent learning and latent inhibition in maze discriminations. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, Section B, **41(1)**, 21-31.

Chamizo, V. D., Sterio, D. & Mackintosh, N. J. (1985). Blocking and overshadowing between intra-maze and extra-maze cues: a tests of the independence of locale and guidance learning. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, **37B**, 235-253.

Cheng, K. (1986). A purely geometric module in the rat's spatial representation. *Cognition,* **23**, 149-178.

Cheng, K. (1989). The vector sum model of pigeon landmark use. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, **15**, 366-375.

Cheng, K. (1994). The determination of direction in landmark-based spatial search in pigeons: A further test of the vector sum model. *Animal Learning and Behavior,* **22**, 291-301.

Cheng, K. (1999). Landmark-based spatial search in honeybees I. *Animal Cognition,* **2***,* 73-78*.*

Cohen, J. S., Burkhart, P., Jones, N., & Innis, N. K. (1990). The effect of intra-maze cue search rule on rat's spatial working memory. *Behavioral Processes*, **22**, 73-88.

Dall'Antonia, P. & Sinsch, U. (2001). In search of water: orientation behaviour of dehydrated natterjack toads, *Bufo calamita. Animal Behaviour*, **61**, 617-629.

Daneri M. F., Papini M. R. & Muzio R. N. (2007). Common toads (*Bufo arenarum*) learn to anticipate and avoid hypertonic saline solutions*. J Comp Psychol*, **121**, 419–427.

Day, L. B., Crews, D., & Wilczynski, W. (1999). Spatial and reversal learning in congeneric lizards with different foraging strategies. *Animal Behaviour*, **57**, 395-407.

Day, L. B., Ismail, N., & Wilczynski, W. (2003). Use of Position and Feature Cues in Discrimination Learning by the Wiptail Lizard (*Cnemidophorus inornatus*). *Journal of Comparative Psychology,* **117 (4)**, 440-448.

Deacon, T. W. (1990). Rethinking mammalian brain evolution. *Am Zool*, **30**, 629-705.

Dudchenko, P. A. & Davidson, M. (2002). Rats use a sense of direction to alternate on T-mazes located in adjacent rooms. *Animal Cognition*, **5 (2)**, 115-118.

Duellman, W. E. & Trueb, L. (1986). *Biology of amphibians*. Ed. McGraw-Hill.

Eibl-Eibesfeld, I. (1951). Nahrungswerb und Beuteschema der Erdkrote (*Bufo bufo L.*). *Behaviour,* **4**, 1-35.

Eichenbaum, H., (1992). The hippocampal system and declarative memory in animals. *Journal of Cognitive Neuroscience,* **4**, 217-231.

Eichenbaum, H., Stewart, C. & Morris, R.G.M. (1991). Hippocampal representation in place learning. *J. Neurosci*., **10**, 3531-3542.

Ferguson, D. E. (1971). The sensory basis of orientation in amphibians. *Annual N.Y. Academy of Sciences,* **188**, 30-36.

Freeland, W.J. & Martin, K.C. (1985). The rate of range expansion by *Bufo marinus* in Northern Australia, 1980-1984. *Aust. Wildl. Research*, **12**, 555-559.

Gaffney, E. S. (1980). Phylogenetic relationships of the major groups of amniotes. En A. L. Panchen (ed.) *The Terrestrial Environment and the Origin of Land Vertebrates*: 593-610. London: Academic Press.

Gallardo, J. M. (1974). *Anfibios de los alrededores de Buenos Aires*. Ed. Eudeba. Buenos Aires, Argentina.

Gallardo, J. M. (1987). *Anfibios Argentinos: Guía para su identificación*. Ed. Librería Agropuecuaria. Buenos Aires, Argentina.

Greding, E. J. (1971). Comparative rates of learning in frogs (Ranidae) and toads (Bufonidae). *Caribbean Journal of Science,* **11 (3-4)**, 203-208.

Grisham, W. & Powers, A. (1990). Effects of Dorsal and Medial Cortex Lesions on Reversal in Turtles. *Physiology and Behavior,* **47**, 43-49.

Hamilton, D. A. & Sutherland, R. J. (1999). Blocking in human place learning: Evidence from virtual navigation. *Psychobiology*, **27**, 453-461.

Hammer, M. & Menzel, R. (1995). Learning and memory in the honeybee. *Journal of Neuroscience*, **15**, 1617-1630.

Hodges, H. (1996). Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Cogntive Brain Research*, **3**, 167-181.

Hodos, W. & Campbell, C. B. G. (1969). The scala naturae: Why there is no theory in comparative psychology. *Psychol Rev*, **76**, 337-350.

Hodos, W. & Campbell, C. B. G. (1990). Evolutionary scales and comparative studies of animal cognition. En: *Neurobiology of Comparative Cognition* (Kesner, R. P. & Olton, D. S., Eds). Hillsdale Associates. Pp. 1-20.

Hoffmann, A. (1973). Stereotaxic atlas of the toad's brain. Acta.anat. , **84**, 416-451.

Hull, C. L. (1943). *Principles of behavior*. N.Y.: Appleton-Century-Crofts.

Ingle, D. & Sahagian, D. (1973). Solution of a spatial constancy problem by goldfish. *Physiological Psychology,* **1**, 83-84.

Jarrard, L. E. (1986). Selective hippocampal lesions and behavior: implications for current research and theorizing. En R. L. Iversen & K.H. Pribram (Eds.), *The hippocampus*, **4**, New York, Plenum Press, 93-126.

Jarrard, L. E. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behavioral and Neural Biology,* **60 (1)**, 9-26.

Justis, S. C. & Taylor, D. H. (1976). Extraocular photoreception and compass orientation in larval bullfrogs, *Rana catesbiana*. *Copeia,* **9**, 98-105.

Kamin, L. J. (1969). Predictability, surprise, attention and conditioning. En B.A. Campbell and R.M. Church (Eds). *Punishment and aversive behavior*. N.Y.: Appleton-Century-Crofts.

López, J. C. 1999. *Memoria espacial y corteza medial en la tortuga Pseudemys scripta.* Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.

López, J. C., Broglio, C, Rodríguez, F, Thinus-Blanc, C., & Salas, C. (1999). Multiple spatial learning strategies in golfish (*Carassius auratus*). *Animal Cognition,* **2**, 109-120.

López, J. C., Bingman, V. P., Rodríguez, F., Gomez, Y., & Salas, C. (2000). Dissociation of place and cue learning by telencephalic ablation in goldfish. *Behavioral Neuroscience,* **114 (4)**, 687-699.

López, J. C., Broglio, C., Rodríguez, F., Thinus-Blanc, C. & Salas, C. (2000 b). Reversal learning deficit in a spatial task but not in a cued one after telencephalic ablation in goldfish. *Behavioural Brain Research,* **109**, 91–98.

López, J. C., Vargas, J. P., Gomez, Y., & Salas, C. (2003). Spatial and non-spatial learning in turtles: the role of medial cortex. *Behavioral Brain Research,* **143***,* 109-120.

Loy, I., Fernandez, V. & Acebes, F. (2006). Conditioning of tentacle lowering in the snail (*Helix aspersa*): Aquisition, latent inhibition, overshadowing, second-order conditioning and sensory preconditioning. *Learning & Behavior*, **34 (3)**, 305-314.

Lubow, R. E. (1973). Latent inhibition. *Psychol. Bull*., **79**, 398-407.

Lüddecke, H. (2003). Space use, cave choice and spatial learning in the dendrobatid frog *Colostethus palmatus*. *Amphibia-Reptilia,* **24**, 37-46.

Mackintosh, N. J. (1974). *The Psychology of Learning*. Academic Press.

Mackintosh, N. J. (1983). *Conditioning and associative learning*. Oxford University Press.

Macphail, E. M. (1982). *Brain and intelligence in vertebrates.* Oxford University Press.

Muzio, R. N. (1999). Aprendizaje instrumental en anfibios. *Revista Latinoamericana de Psicología*, **31**, 35-47.

Muzio, R. N., Segura, E. T., & Papini, M. R. (1992). Effect of schedule and magnitude of reinforcement on instrumental learning 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 & Behavior*, **54 (1)**, 185-188.

Muzio, R. N., Segura, E. T., & Papini, M. R. (1994). Learning under partial reinforcement in the toad (*Bufo arenarum*): Effects of lesions in the medial pallium. *Behavioral and Neural Biology*, **61 (1)**, 36-46.

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.

Nadel, L. (1991). The hippocampus and space revisited. *Hippocampus,* **1**, 221-229.

Nieuwenhuys, R., ten Donkelaar, H. J. & Nicholson, C. (1998). *The central nervous system of vertebrate*s. Berlin: Springer-Verlag.

Northcutt, R. G. (1981). Evolution of the telencephalon in nonmammals. *Ann Rev Neurosci*, **4**, 301-350.

Northcutt, R. G. (1995). The forebrain of gnathostomes: In search of a morphotype. *Brain Behav Evol*, **46**, 275-318.

Northcutt, R. G. & Kaas, J. H. (1995). The emergence and evolution of mammal neocortex. *Trends in Neurosciences*, **18**, 371-426.

Northcutt, R. G. & Ronan, M. (1992). Afferent and efferent connections of the bullfrog medial pallium. *Brain Behav Evol,* **40**, 1-16.

Nunn, J. A., Le Peillet, E., Netto, C. A., Sowinski, P., Hodges, H., Meldrum, B. S., & Gray, J. A. (1991). CA1 cell loss produces deficits in the water maze but not in the radial maze. *Soc. Neurosci. Abstr*., **17**, 108.

O'Keefe, J. & Conway, D. H. (1980). On the trail of the hippocampal engram. *Physiol. Psychol*., **8**, 229-238.

O'Keefe, J. & Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon Press.

Papini, M. R., Muzio, R. N. & Segura, E.T. (1995). Instrumental Learning in Toads (*Bufo arenarum*): Reinforcer Magnitude and the Medial Pallium. *Brain Behav Evol.,* **46**, 61-71.

Papini, M. R., Salas, C. & Muzio, R. N. (1999). Análisis comparativo del aprendizaje en vertebrados. *Revista Latinoamericana de Psicología*, **31**, 15-34.

Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes*. Oxford University Press.

Peterson, E. 1980. *Behavioral studies of telencephalic functions in reptiles.* Comparative neurology of the telencephalon*.* Plenum Press. New York.

Reboreda, J. C.; Muzio, R. N.; Viñas, M. C. and Segura, E. T. (1991). β-adrenergic control of the water permeability of the skin during rehydration in the toad *Bufo arenarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C, 433-437.

Reboreda, J. C & Segura, E. T. (1984). Electrolyte sensitivity of the skin in the toad, *Bufo arenarum Hensel*. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam*., **34**, 37-43.

Revusky, S. H. (1971). The role of interference in association over delay. En W.K. Honig & P.H.R. James (Eds). *Animal memory*. New York: Academic Press. Pp. 155-213.

Rodrigo, T., Chamizo, V. D., McLaren, I. P. L. & Mackintosh, N. J. (1997). Blocking in the spatila domain. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, **23**, 110-118.

Rodríguez, F.; Durán, E.; Vargas, J. P.; Torres, B. y Salas, C. (1994). Performance of goldfish trained in allocentric and egocentric maze procedures suggests the presence of a cognitive mapping system in fishes. *Animal Learning and Behavior*, **22(4)**, 409-420.

Rodríguez, F., López, J. C., Vargas, J. P. & Salas, C. (1998). *Fundamentos de Psicobiología. Manual de Laboratorio*. Sevilla: Kronos.

Roitblat, H. L. (1987). *Introduction to Comparative Cognition*. W. H. Freeman and Company, New York.

Ruibal, R. (1962). The adaptive value of bladder water in the toad, *Bufo cognatus*. Physiological Zoology, **35**, 218–223.

Salas, C., Broglio, C. & Rodríguez, F. (2003). Evolution of forebrain and spatial cognition in vertebrales: conservation across diversity. *Brain, Behavior and Evolution*, **62**, 72-82.

Salas, C., Broglio, C., Rodríguez, F., López, J. C., Portavella, M., & Torres, B. (1996 a). Telencephalic ablation in golfish impairs performance in a “spatial constancy” problem but not in a cued one. *Behavioral Brain Research,* **79**, 193-200.

Salas, C., Rodríguez, F., Vargas, J. P., Duran, E., & Torres, B. (1996 b). Spatial learning and memory deficits alter telencephalic ablation in goldfish trained in place and turn maze procedures. *Behavioral Neuroscience,* **110**, 965-980.

Sanchez-Moreno, J., Rodrigo, T, Chamizo, V.D. & Mackintosh, N.J. (1999). Overshadowing in the spatial domain. *Animal Learning and Behavior*, **27**, 391-398.

Schmajuk, N. A., Segura, E. T., & Reboreda, J. C. (1980). Appetite conditioning and discriminatory learning in toads. *Behavioral and Neural Biology,* **33 (4)**, 519-523.

Sherry, D. F. & Schacter, D. L. (1987). The evolution of multiple memory systems. *Psychological Reviews,* **194**, 439-454.

Shoemaker, V. H. & Nagy, K. A. (1977). Osmorregulation in amphibians and reptiles. *Annual Review of Phisiology*, **39**, 449-471.

Sinsch, U. (1987). Orientation behaviour of toads (*Bufo bufo*) displaced from the breeding site. *Journal of Comparative Physiology* A, **161**, 715-727.

Sinsch, U. (2006). Orientation and navigation in Amphibia. *Marine and Freshwater Behavior and Physiology,* **39 (1)**, 65-71.

Spetch, M. L. & Wilkie, L (1994). Pigeon's use of landmarks presented in digitalized images. *Learning and Motivation*, **25**, 245-275.

Spetch, M. L. (1995). Overshadowing in landmark learning: Touch-screen studies with pigeon and humans. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, **21**, 166-181.

Spetch, M. L., Cheng, K., & MacDonald, S. E. (1996). Learning the configuration of a landmark array I. *Journal of Comparative Psychology,* **110**, 55-68.

Spetch, M. L., Cheng, K., MacDonald, S. E., Linkenhoker, B. A., Kelly D. M., & Doerkson, S. R. (1997). Learning the configuration of a landmark array in pigeons and humans. II. Generality across search tasks. *Journal of Comparative Psychology,* **111**, 14-24.

Teroni, E., Portenier, V., & Etienne, A. S. (1990). Utilisation par le hamster doré d'indices visuels dans un environnement visuellement symétrique. *Biology of Behaviour*, **15**, 74-92.

Testa, T. J. (1975). Effects of similarity of location and temporal intensity pattern of conditioned and unconditioned stimuli of the acquisition of conditioned suppression in rats. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process*., **1**, 114-21.

Thompson, T. A. & Boice, R. (1975). Attempts to train frogs: Review and experiments. *Journal of Biological Psychology*, **17,** 3-13.

Tunner, H. G. (1992). Locomotory behaviour in water frogs from Neusiedlersee (Austria, Hungary). 15 km migration of *Rana lessonae* and its hybriodogenetic associate *Rana esculenta*. *Proceedings of the 6th Ordinary General Meeting SHE, Budapest*, 449-452.

Williams, J. T. (1967a). A test for dominance of cues in the spectacled caiman. *Psychonomic Science,* **8 (7)**, 280.

Williams, J. T. (1967b). A test for dominance of cues during maze learning by toads. *Psychonomic Science*, **9 (5)**, 259-260.