

Análisis comparado del aprendizaje aversivo en anfibios

Puddington, Martín M.^{a,b,c} y Muzio, Rubén N.^{*a,b,c}

^a Grupo de Aprendizaje y Cognición Comparada, Laboratorio de Biología del Comportamiento, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Argentina

^b Cátedra de Biología del Comportamiento e Instituto de Investigaciones, Facultad de Psicología, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

^c Facultad de Psicología, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina.

Artículo de Revisión

Resumen

El presente artículo desarrolla con un enfoque comparado una revisión completa y actualizada de los estudios de aprendizaje aversivo en anfibios. La mayoría de ellos utilizaron como estímulo aversivo descargas eléctricas, obteniéndose resultados inconsistentes o negativos. Las investigaciones más recientes mostraron que otra clase de estímulos (soluciones salinas de alta concentración, o aumento de la temperatura del agua) han resultado ser más eficientes para producir modificaciones estables en el comportamiento. Se analizan también algunos aspectos neurofisiológicos relacionados con el aprendizaje aversivo y los miedos aprendidos. Si bien se cuenta con datos comparativos de estudios neurofisiológicos en peces, aún no existen referencias con información funcional sobre las bases neurales del aprendizaje aversivo en anfibios. Sin embargo, sí se conoce en anfibios las regiones cerebrales homólogas a las estructuras que en mamíferos mostraron estar implicadas con dicho aprendizaje (especialmente la amígdala), abriendo así el camino para abordar en el futuro el estudio de esta cuestión.

Palabras claves:

Aprendizaje Aversivo; Miedo; Anfibios; Soluciones Salinas Altamente Hipertónicas; Striatum; Amígdala; Análisis Comparado del Aprendizaje.

Recibido el 2 de Julio de 2013; Recibida la revisión el 1 de Noviembre de 2013; Aceptado el 5 de Noviembre de 2013.

Abstract

Comparative analysis of aversive learning in amphibians: This article develops with a comparative approach a comprehensive and updated review of studies of aversive learning in amphibians. Most of them used electric shock as aversive stimulus, resulting in inconsistent or negative results. Recent research showed that another class of stimuli (saline solutions highly concentrated or warm water) has been more efficient to produce steady changes in behavior. Some neurophysiological aspects of aversive and fear learning are also discussed. While comparative data from neurophysiological studies in fish is available, there are no references on functional information on the neural basis of aversive learning in amphibians. However, it is known in amphibian homologous brain areas to the mammalian structures shown to be involved with such learning (especially the amygdala), opening the way to address the study of this question in the future.

Key Words:

Aversive Learning; Fear; Amphibians; Highly Hypertonic Saline Solutions; Striatum; Amygdala; Comparative Analysis of Learning.

1. Introducción

La psicología comparada se encarga de estudiar la evolución y el desarrollo de la conducta. La idea principal que rige esta disciplina es que al comparar el comportamiento de distintas especies, se pueden identificar los aspectos comunes y divergentes del comportamiento en general (Papini, 2009). De esta manera sería posible reconstruir el pasado ancestral de un linaje observando las especies actuales. El enfoque comparado del comportamiento ya estaba presente en

las ideas planteadas por Darwin en el siglo XIX, quien sugirió que al igual que con los rasgos morfológicos, se pueden encontrar patrones comportamentales en líneas colaterales de descendencia (Darwin, 1859). La concepción de la naturaleza que existía antes de la aceptación de la teoría de la evolución se derivaba del pensamiento del filósofo griego Aristóteles. Según este pensador, los seres vivos formaban una *escala naturae* (o escalera natural) cuyos primeros peldaños

* Enviar correspondencia a: Muzio, R.N.
E-mail: rnmuzio@gmail.com

correspondían a las plantas y las esponjas y en los últimos escalones se encontraban los mamíferos, poniendo al hombre por encima de todos los demás seres vivos. Parte de este pensamiento sobrevive hasta el día de hoy en concepciones erradas de la teoría de la evolución. Frecuentemente escuchamos decir, por ejemplo, que los seres humanos somos *más evolucionados* que otros mamíferos actuales, o que *descendemos del mono*, o que *los peces son nuestros antepasados*. Estas afirmaciones suponen que la evolución camina siempre hacia la complejidad, el desarrollo del cerebro y la inteligencia. Tal pensamiento es contrario a las teorías evolucionistas modernas, que discuten esta idea errónea aristotélica de una *escala natural* que va de animales simples a animales complejos. Asumir una idea como ésta implica pensar que la evolución siempre camina hacia niveles de complejidad mayor, lo cual es incorrecto (Kaas, 2009). Los animales simples no son antepasados nuestros, pero muchas veces comparten características con algunos de nuestros antepasados. Un ejemplo de ello son los anfibios.

El estudio del grupo de los anfibios es clave para entender nuestra propia historia evolutiva, ya que constituyen un modelo vivo de los primeros vertebrados terrestres (tetrápodos) ya extinguidos. Los tetrápodos aparecieron hace alrededor de 400 millones de años durante el período Devónico, en el cual existían ciertas presiones selectivas que favorecieron la colonización de la tierra. En principio, en la tierra no había grandes predadores, ya que estaba poblada exclusivamente por plantas primitivas y artrópodos. Además, la tierra ofrecía una mayor cantidad de oxígeno que el agua y, por otro lado, los vertebrados que se adaptaban a la vida fuera del agua tenían mayores probabilidades de sobrevivir a los períodos de sequía que aquellos que vivían en charcas y pantanos (los cuales se podían secar). Estos primeros vertebrados terrestres compartían muchas características con los actuales anfibios y, más genéricamente, son el antepasado común de todos los tetrápodos actuales (Figura 1): anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Wells, 2007).

Los anfibios constituyen la clase Amphibia, dividiéndose los anfibios actuales en tres órdenes: Anura (ranas y sapos), Urodela o Caudata (salamandras y tritones) y Gymnophiona o Apoda (cecilias). Todos los grupos de anfibios comparten ciertas características. En primer lugar, la ausencia de escamas y una piel altamente permeable que permite el intercambio de gases y de fluidos con el medio (cabe destacar aquí que esta característica es muy relevante a la hora de diseñar los protocolos actuales de condicionamiento en el

laboratorio). Además, son animales ectodermos (es decir, sin regulación interna de su temperatura corporal), con un metabolismo bajo y que dependen necesariamente de fuentes de agua dulce para la reproducción. Finalmente, todos los anfibios comienzan su ciclo vital como larvas acuáticas y, eventualmente, sobreviene la metamorfosis donde cambian branquias por pulmones (Pough, Janis & Heiser, 1999).

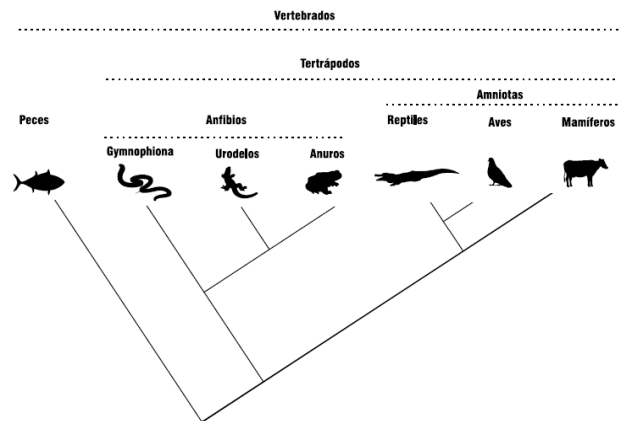


Figura 1. Posición relativa de la clase Amphibia (anfibios) en el clado de los vertebrados, incluyendo sus tres órdenes actuales: Anuros, Urodelos y Gymnophiona (o Apoda). (Figura: Juan Pablo Mario y Martín M. Puddington).

Durante mucho tiempo se consideró que los anfibios eran animales con sistemas nerviosos demasiado simples como para exhibir plasticidad en su comportamiento (Tinbergen, 1951). Se los veía además como animales que presentaban inmensas dificultades para su manipulación experimental en el laboratorio. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que esta dificultad reflejaba más una limitación de los investigadores en encontrar estímulos y situaciones motivacionales adecuados a cada especie que un inconveniente real (por ejemplo, ver Muzio, 1999, 2012; Muzio, Segura & Papini, 1992). De hecho, la relativa simpleza del sistema nervioso de los anfibios constituye una gran ventaja de este modelo biológico. El cerebro de los anfibios carece de neocorteza, pero comparte estructuras homólogas que en mamíferos integran el sistema límbico. Sabemos que la neocorteza de los mamíferos cumple funciones regulatorias claves en una serie de procesos cognitivos (como la orientación en el espacio, o la adquisición y la extinción de una conducta, incluyendo la regulación emocional del aprendizaje, como el condicionamiento del miedo). Y también, que podemos observar muchos de estos fenómenos en anfibios, aunque ellos no cuentan con esta estructura cerebral. Por lo tanto, estudiar los aspectos funcionales del sistema nervioso de los

anfibios nos da la posibilidad de conocer más acerca de cuáles son los componentes neurofisiológicos esenciales de la conducta, sin esta modulación neocortical (Muzio, 2012).

En el presente artículo, se presenta una revisión completa y actualizada de las investigaciones llevadas a cabo sobre aprendizaje aversivo en anfibios. Luego se integran estos datos con la información comparativa disponible sobre el procesamiento de los estímulos aversivos en peces y en mamíferos.

2. Definiciones y modelos de condicionamiento aversivo

Los procedimientos que se utilizan para investigar el aprendizaje aversivo en el laboratorio intentan estudiar en situaciones controladas una serie de componentes de la conducta que son claves para la supervivencia de un individuo (LeDoux, 2000). El miedo es la emoción que evoca la estimulación aversiva. En el caso de los roedores, cuando un animal recibe una descarga eléctrica manifiesta una serie de cambios fisiológicos observables que se suelen denominar respuesta de miedo. Las conductas típicamente asociadas con el miedo son el *freezing* (permanecer inmóvil o disminuir significativamente la movilidad), incremento en la intensidad de la respuesta refleja de alarma, analgesia (disminución de la sensibilidad cutánea), vocalizaciones agudas (ultrasónicas) y alteraciones del sistema nervioso autónomo (como aumento en la presión sanguínea, la frecuencia cardíaca o la tasa respiratoria). La respuesta de miedo en sí misma constituye un mecanismo de defensa. La posibilidad de establecer asociaciones entre un estímulo anticipatorio y el estímulo que provoca miedo, da a los individuos la posibilidad de predecir el evento y responder de manera anticipada (Kim & Jung, 2006). Este tipo de fenómenos permite evitar situaciones que fueron percibidas como peligrosas en el pasado y así mejorar sus oportunidades de sobrevivir. Es por esta razón que se asume que debieron haber aparecido tempranamente en la evolución y, por lo tanto, es esperable que este tipo de comportamientos se encuentre en especies filogenéticamente alejadas del ser humano.

En los manuales de psicología del aprendizaje se diferencian dos grandes grupos de aprendizaje asociativo: el condicionamiento clásico o pavloviano (en el que los sujetos asocian pasivamente un estímulo incondicionado con uno condicionado) y el condicionamiento operante o instrumental (donde los sujetos asocian una respuesta con una consecuencia). La estimulación aversiva se ha aplicado en ambos tipos

de aprendizaje, siendo las descargas eléctricas el estímulo aversivo mayormente utilizado, ya que es un estímulo fácil de administrar y de controlar. Aunque en menor medida, se han utilizado también muchos otros ejemplos de estímulos alternativos, como el uso de un soplo de aire dirigido a un ojo, soluciones con sabor desagradable, ruidos intensos o drogas que producen malestar físico. El experimento típico para estudiar el condicionamiento clásico aversivo, consiste en administrar a un animal un estímulo aversivo (o estímulo incondicionado, EI) junto con un estímulo inicialmente neutro (estímulo condicionado, EC) y registrar una respuesta (respuesta incondicionada, RI). Con las sucesivas repeticiones la sola aparición del estímulo condicionado evocará por sí mismo la respuesta (respuesta condicionada, RC) sin necesidad de la presencia del estímulo aversivo (Mackintosh, 1974).

Quizás el experimento más célebre que utilizó este paradigma sea el que llevaron a cabo Watson y Rayner (1920) empleando un bebé como sujeto experimental, un conejo como EC, un sonido fuerte como EI y el llanto del niño como respuesta. Este experimento (que ya tiene más de 90 años) fue una demostración de que aquellos fenómenos descritos en animales podían ser generalizados a nuestra especie, y sentó las bases de los primeros tratamientos psicológicos para las fobias (Gray, 1993).

En el condicionamiento instrumental aversivo, la estimulación aversiva puede emplearse tanto para disminuir la frecuencia de una conducta como para incrementarla. En el primer caso, se utilizan situaciones donde una conducta de alta frecuencia de aparición se hace contingente a un estímulo aversivo inescapable. Con los sucesivos ensayos, la conducta se vuelve entonces menos frecuente. Un ejemplo claro de este tipo de procedimiento es el aprendizaje de evitación pasiva (el cual se detallará más adelante). En el segundo caso, por el contrario, los animales tienen la posibilidad de evitar activamente un estímulo aversivo produciendo una determinada conducta (en lugar de inhibirla). Se suele presentar un estímulo neutro previo a la administración del estímulo aversivo, que funciona como una advertencia o señalización anticipatoria. Luego, pueden ocurrir tres alternativas: que el animal responda tempranamente (en cuyo caso habrá evitado el estímulo aversivo), que responda tardíamente (en cuyo caso habrá recibido la estimulación aversiva y luego escapado) o que nunca responda (en este caso recibirá la estimulación aversiva durante todo el ensayo). El ejemplo típico de este procedimiento es el aprendizaje de escape y evitación (Mackintosh, 1974).

El estudio y desarrollo de distintos paradigmas de aprendizaje aversivo ha permitido avanzar en la comprensión del comportamiento y entender los sustratos fisiológicos de estos fenómenos.

3. Estudios iniciales del aprendizaje aversivo en anfibios: Uso de descargas eléctricas

Tradicionalmente, los primeros estudios sobre aprendizaje aversivo en anfibios se han concentrado en el paradigma de escape y evitación. Y el estímulo aversivo utilizado más frecuentemente para estudiar la conducta de escape y evitación fue la descarga eléctrica. Como estímulo posee la clara ventaja de ser fácilmente manipulable, ya que se puede ajustar su duración e intensidad. Sin embargo, la utilización de descargas eléctricas en la experimentación con anfibios terrestres ha probado ser relativamente inefectiva, dando pobres resultados (Muzio, 1999, 2012; Suboski, 1992). Este hecho se debe fundamentalmente a la poca validez ecológica que tienen los estudios que emplean descargas eléctricas como estímulos aversivos incondicionados. Así, el primer registro de un intento de condicionamiento aversivo en anfibios usando descargas eléctricas se transformó en una demostración particularmente sorprendente de este fracaso. McGill (1960) expuso a siete ranas leopardo (*Rana pipiens*) a descargas eléctricas en una caja de salto, esperando observar aprendizaje de la respuesta de escape. Muy por el contrario, no sólo encontró que los animales aumentaron la latencia de escape (en lugar de disminuirla), sino también que todas las ranas murieron ya sea en el transcurso del experimento o poco tiempo después de que se había suspendido. Más tarde, Crawford y Longdon (1966) utilizaron un protocolo similar y consiguieron observar disminución de la latencia de respuesta. En este caso, administraban sesiones diarias de 20 ensayos, observando dichos cambios a lo largo de los ensayos, pero no entre sesiones (es decir, que los animales no retenían el nivel de respuesta adquirido el día anterior). En otro estudio (Boice, 1970) se utilizaron 4 especies distintas de anuros que variaban en su nivel de actividad basal. Por sus hábitos, dos de ellas se describieron como mayormente pasivas (*Rana pipiens* y *Scaphiopus hammondi*) y las otras dos como activas (*Bufo woodhousei* y *Rana clamitans*). Nuevamente se utilizó un protocolo de escape y evitación y como estímulo aversivo descargas eléctricas. Se empleó como control un grupo encadenado (*yoked*) que recibía la misma cantidad de descargas que el grupo experimental independientemente de su comportamiento. En este caso, los resultados obtenidos sólo permitieron mostrar

conductas de evitación en los animales activos, que apenas alcanzaron un porcentaje de eficacia del 10 % en *R. clamitans* y del 50 % en *B. woodhousei* luego de 200 ensayos. Más tarde, utilizando también descargas eléctricas, Schmajuk y colaboradores (1980) hicieron estudios de aprendizaje aversivo en el sapo *Rhinella arenarum* (= *Bufo arenarum*) en los que para conseguir un incremento significativo de la respuesta de escape debieron emplear 50 sesiones de entrenamiento. Recientemente, Dicke, Heidorn y Roth (2011) usaron descargas eléctricas para inhibir la conducta de captura de presas en el sapo vientre de fuego (*Bombina orientalis*). El experimento tenía una primera fase en la que todos los animales observaban en una pantalla un video de sombras de grillos, siendo reforzados con grillos verdaderos cuando impactaban sus lenguas contra la pantalla 10 veces seguidas. Los animales tuvieron 15 sesiones de condicionamiento, cada una con un único ensayo de 2 minutos diarios. A continuación, un grupo pasaba a una fase de extinción (i.e., omisión de la recompensa) y otro grupo recibía descargas eléctricas apareadas a la respuesta de lengüetazo. El grupo sin recompensa continuó manteniendo su respuesta a lo largo de los 15 ensayos siguientes. Por el contrario, el otro grupo (que recibía descargas eléctricas), sólo mostró al cabo de 15 ensayos una inhibición parcial de la conducta en el 50% de los sujetos (quienes apenas redujeron en promedio de 10 a 7 respuestas en los 2 minutos de registro). Los autores atribuyeron las diferencias observadas entre los individuos del grupo que recibía descargas eléctricas a disparidades en la motivación por la comida, o a la habilidad propia de cada sujeto para aprender y formar memorias, sin considerar en ningún momento el hecho de que las descargas mismas podrían ser percibidas de manera diferencial por los sujetos (esta ausencia de una consideración acerca de potenciales diferencias en la percepción sensorial de los anfibios a las descargas eléctricas constituye una cuestión llamativa y se desarrollará más adelante). En este mismo experimento se utilizaron además otros tres grupos de sapos que tenían una fase de adquisición idéntica a los ya mencionados, pero durante la fase siguiente se les cambiaba el estímulo: en lugar de observar sombras de grillos veían gusanos. En esta condición, a fin de extinguir la respuesta, se entrenó un grupo sin recompensa, otro grupo con descargas contingentes a la respuesta de captura y un tercer grupo con descargas no apareadas. Los resultados mostraron que los tres grupos disminuían su nivel de respuesta pero, paradójicamente, los sujetos que mostraron mayor inhibición fueron los que recibían las descargas no apareadas (hecho que no

permite arribar a una conclusión definitiva al respecto).

A pesar de este cúmulo de resultados negativos o inconsistentes, las descargas eléctricas podrían ser útiles en el entrenamiento de anfibios acuáticos, dado que por sus características físicas se transmite más eficientemente en ese medio. En un estudio realizado en *Xenopus laevis*, una especie de anfibio totalmente acuático, se utilizaron descargas eléctricas en un condicionamiento de evitación pasiva (Karplus, Algom & Samuel, 1981). Los animales eran colocados en un tanque de agua que tenía un área oscura y un área iluminada. Podían nadar alrededor del tanque, pero cuando ingresaban en la zona oscura (conducta que estos animales realizan normalmente para buscar un refugio donde protegerse) recibían una serie de descargas eléctricas que se interrumpía sólo si regresaban al lado iluminado, contradiciendo esa tendencia natural. Cada animal recibió dos sesiones diarias de seis ensayos de 10 minutos, y se contabilizó el tiempo que los animales pasaban en el compartimiento oscuro. En este caso, se observó que los animales aprendieron esta situación durante el transcurso de una sesión y también que retenían la respuesta 24 horas más tarde. Este artículo resulta particularmente interesante, ya que *X. laevis* es un animal ampliamente utilizado para estudios de reproducción y de genética por lo que su genoma es bien conocido, lo cual facilita el empleo de técnicas de biología molecular (Beer, Wagner, Grishkevich, Peshkin & Yanai, 2012). Lamentablemente, hasta el momento existe este único trabajo en la especie.

4. Desarrollo de un modelo efectivo de estimulación aversiva en anfibios: Uso de soluciones salinas altamente hipertónicas

Una razón por la cual las descargas eléctricas podrían ser ineficaces como estímulos aversivos en anfibios puede deberse a las características específicas del tegumento externo de estos animales. En particular, se sabe que los anuros rara vez se hidratan por vía oral, como lo hacen los mamíferos (Bentley & Yorio, 1979). En lugar de ello tienen una piel semipermeable y húmeda que posee receptores sensibles a electrolitos en solución y permite el pasaje de líquidos. Las distintas capas que constituyen el tegumento epidérmico forman una estructura que, dependiendo de su grosor y grado de humedad, puede variar su capacidad de transmisión de una descarga eléctrica. De esta manera, no siempre el nivel de descarga administrado a un animal es efectivamente transmitido a los receptores nerviosos epidérmicos, siendo entonces variable el grado de percepción de este tipo de estímulo, generando

consecuentemente inconsistencias cuando se quiere correlacionar la intensidad del estímulo administrado con la respuesta conductual.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, que muestran en general una pobre respuesta de condicionamiento en anfibios utilizando descargas eléctricas, hemos desarrollado en nuestro laboratorio protocolos de entrenamiento en el sapo terrestre *Rhinella arenarum* que incluyen otro tipo de estímulo aversivo, más acorde a las particularidades de la clase Amphibia (en especial, a las características biológicas de su piel): soluciones salinas hipertónicas (ver por ejemplo Loza Coll, 1998; Loza Coll & Muzio, 2013; Muzio et al., 2011). La concentración del medio interno de los sapos es aproximadamente de 245 mOsm/kg, lo cual es isotónico a una solución salina 115 mM de NaCl (Ferreira & Jesus, 1973; Reborada, Muzio, Viñas & Segura, 1991). En consecuencia, los animales que entran en contacto con soluciones menores a esta concentración incorporarán agua sin ningún gasto de energía, ya que la diferencia en el gradiente lo favorece. Para estudiar en sapos los efectos de la exposición a distintas soluciones salinas hipertónicas (i.e., con concentraciones mayores a 115 mM) sobre la captación de agua, se colocaron animales deshidratados al 80% en soluciones que variaban entre 115 mM y 1000 mM NaCl (Loza Coll, 1998). Se observó que los animales eran capaces de rehidratarse captando agua contra gradiente hasta una concentración de la solución externa que no superara los 300 mM NaCl, generando conductas de aproximación (denominándolas de esta manera soluciones apetitivas). Concentraciones mayores producían el efecto contrario: los animales se deshidrataban aún más, e intentaban escapar. Se concluyó entonces que las soluciones salinas de alta concentración (altamente hipertónicas), podían ser utilizadas como estímulos aversivos (motivo por el cual fueron denominadas soluciones aversivas). El uso de dichas soluciones hipertónicas tiene además la ventaja de ser una clase de estímulo con alto valor ecológico ya que, como vimos, estos animales tienen receptores cutáneos sensibles a electrolitos en solución. Adicionalmente, se observó que los animales expuestos durante el experimento a una solución de concentración intermedia de 300 mM de NaCl no conseguían captar agua, pero tampoco se deshidrataban, razón por la cual se la denominó solución neutra (Loza Coll & Muzio, 2013).

A partir de estos estudios preliminares, utilizando una caja que podía ser inundada con distintas soluciones salinas, se llevó a cabo un experimento para condicionar la respuesta cardiovascular en el sapo

terrestre *Rhinella arenarum* (Daneri, Papini & Muzio, 2007; Figura 2). Los animales fueron canulados en la aorta dorsal para permitir el registro de la frecuencia cardíaca mediante un sensor de presión. Los sapos recibieron 4 sesiones de un ensayo diario de entrenamiento en un aparato experimental que consistía en un solo compartimiento individual. Se entrenaron tres grupos de sapos. El grupo Apareado, permanecía 120 segundos iniciales de aclimatación en el aparato. Después se inundaba la caja por otros 120 segundos con una solución 300 mM NaCl (solución neutra), se desagotaba la solución y finalmente se volvía a inundar con una solución 800 mM NaCl (solución aversiva) también por 120 segundos, vaciándose luego la caja para concluir el ensayo. Los sapos no tenían la posibilidad de escapar del compartimiento de estimulación, de manera que la solución neutra funcionaba como estímulo condicionado (EC) y la solución aversiva como estímulo incondicionado (EI). Se utilizaron dos grupos controles siguiendo el protocolo general. En uno de ellos, grupo EC solo, los animales eran expuestos en los dos períodos a la solución neutra y nunca recibían la solución aversiva. En el otro, grupo No apareado, la solución neutra y la aversiva eran presentadas con cinco minutos de intervalo entre ellas para dificultar la asociación. Al cabo de 4 sesiones se observó que los animales del primer grupo aumentaban la tasa cardíaca cuando se presentaba la solución neutra (EC), aún antes de recibir la solución aversiva, situación que no ocurría en ninguno de los dos grupos controles. En un segundo experimento, otro grupo de sapos fue colocado en una caja de salto, recibiendo una solución 300 mM (neutra), y luego una 800 mM (aversiva). En esta ocasión, los animales tenían la posibilidad de escapar o evitar el contacto con la segunda solución aversiva, saltando a un compartimiento seco vecino. En este caso, se pudo observar por primera vez en anfibios respuestas consistentes de evitación. Los animales del grupo experimental saltaban al compartimiento seco ya a partir del segundo ensayo, cuando se presentaba la solución neutra (antes de que llegara la solución aversiva, evitando así la misma). Estos experimentos pudieron demostrar definitivamente que estos animales son capaces de predecir la aparición de un evento aversivo señalado por un estímulo condicionado y desplegar una conducta para, primero, escapar del estímulo aversivo, y luego, evitarlo.

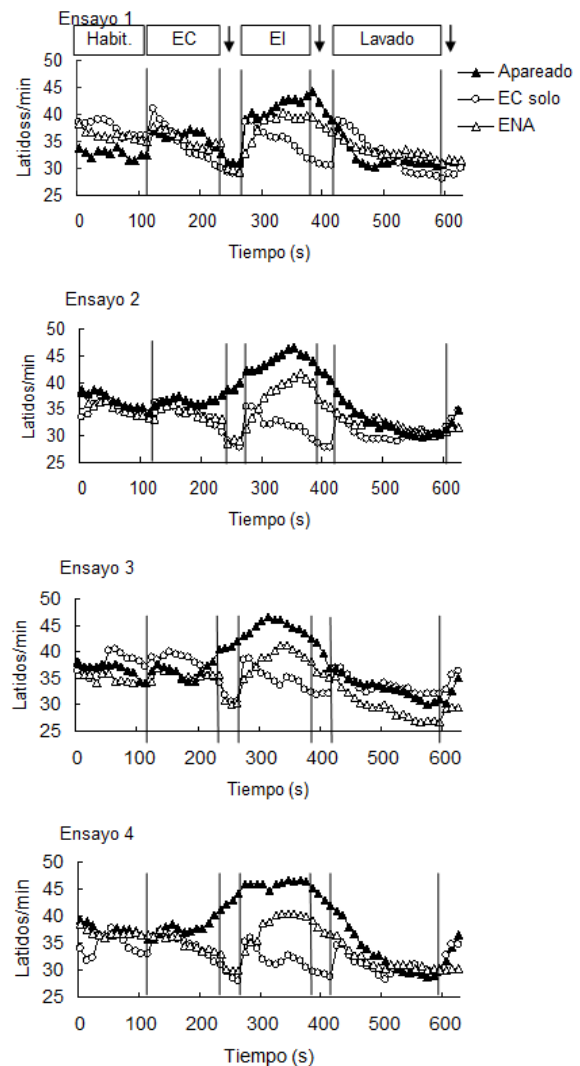


Figura 2. Respuesta cardíaca promedio (latidos por minuto) durante los ensayos 1-4, desde arriba hacia abajo. Los dos primeros minutos del ensayo servían para que los animales alcancen el nivel de la tasa cardíaca basal antes de la exposición a las soluciones estímulo. Habit: habituación; EC: estímulo condicionado (solución 300 mM de NaCl); EI: estímulo incondicionado (solución 800 mM de NaCl); ENA: Grupo Explícitamente no apareado; Lavado: drenaje de la solución salina y su reemplazo con agua deionizada; flechas: período de 30 segundos durante los cuales la solución salina era descargada del dispositivo experimental; un asterisco indica la interpolación de 180 segundos entre EC y EI para el Grupo ENA. (Adaptado de Daneri, Papini & Muzio, 2007).

Otros dos experimentos probaron la efectividad de las soluciones salinas altamente hipertónicas como estímulos aversivos utilizando un corredor recto (Muzio et al., 2011). Este dispositivo experimental tiene una caja de partida y una caja meta separadas por un pasillo largo. Se registra el tiempo que tardan los animales en desplazarse desde el compartimiento de partida hasta la

meta, en la cual se encuentra la recompensa. En el primero de los experimentos (Figura 3A) se entrenaron 3 grupos de sapos utilizando como refuerzo agua deionizada, solución neutra (300 mM NaCl) o solución aversiva (800 mM NaCl). Al cabo de 15 sesiones de entrenamiento de un ensayo por día sólo se observó adquisición (disminución del tiempo de recorrido) en el grupo que recibía agua deionizada en el compartimiento meta. El grupo que recibía solución neutra conservó los mismos tiempos de recorrido a lo largo de todo el experimento y el grupo que recibía solución aversiva dejó de desplazarse hacia el compartimiento meta después del primer ensayo. En otro experimento de esta misma serie (Muzio et al., 2011), se utilizó un procedimiento similar al empleado en ratas (Brown & Wagner, 1964), donde se había observado que los animales que recibían una recompensa continua pero asociada en un 50% de los ensayos con un estímulo aversivo (una descarga eléctrica) extinguían su respuesta instrumental más lentamente (es decir, exhibían mayor resistencia a la extinción). En este caso, se utilizó el mismo dispositivo para entrenar 3 grupos de sapos durante una primera fase de adquisición con un ensayo por día (Figura 3B). Un grupo recibió siempre agua deionizada. Otro grupo recibió aleatoriamente agua deionizada o solución neutra (300 mM), y el tercero agua deionizada o solución aversiva (800 mM). Luego de la adquisición, se pasó a una fase de extinción donde se eliminaba el reforzamiento en la caja meta para todos los grupos.

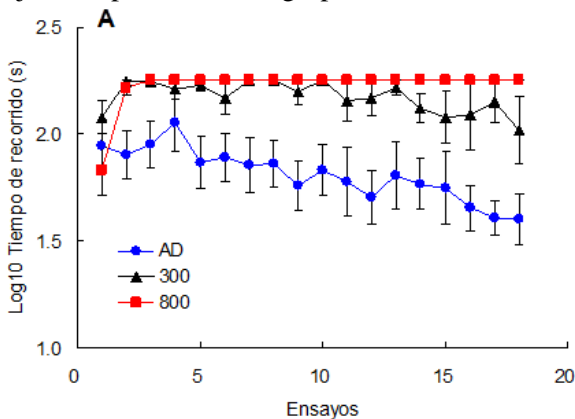


Figura 3. A: Desempeño en un corredor recto de tres grupos de sapos que recibieron como reforzadores agua deionizada (AD), una solución 300 mM de NaCl (300) o una solución 800 mM de NaCl (800).

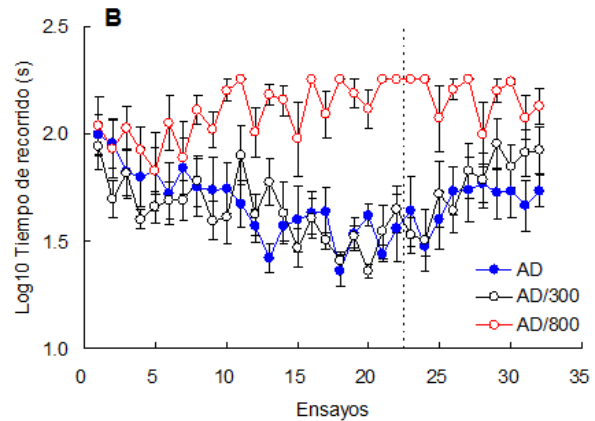


Figura 3. B: Desempeño en un corredor recto de tres grupos de sapos durante la adquisición (22 ensayos) y la extinción (10 ensayos). Cada grupo recibió en la adquisición los siguientes reforzadores en forma aleatoria: agua deionizada y una solución 300 mM de NaCl (AD/300), agua deionizada y una solución 800 mM de NaCl (AD/800), o sólo agua deionizada (AD). En ambos casos se grafican las Medias \pm error estándar ($\alpha = 0.05$). (Adaptado de Muzio et al., 2011).

Los resultados mostraron que los animales del grupo que recibía aleatoriamente agua deionizada o solución aversiva no adquirieron la respuesta de recorrido (a pesar de recibir refuerzo apetitivo en el 50% de los ensayos); por lo tanto, nunca pudieron extinguir esta respuesta. La tasa de adquisición para los otros dos grupos fue la misma, aunque una vez en extinción, el grupo que siempre recibió agua deionizada se mostró más persistente en su desempeño (es decir, más resistente a la extinción).

Luego de analizar en conjunto toda la información referida a las distintas clases de reforzadores aversivos, podemos notar que en el caso de los anfibios terrestres las soluciones salinas altamente hipertónicas constituyen un estímulo aversivo potente, mientras que las descargas eléctricas han resultado siempre inconsistentes. Lamentablemente, la insistencia histórica en la utilización de descargas eléctricas ha retrasado el estudio de este tipo de fenómenos en el grupo de los anfibios, razón por la cual hasta el momento casi no contamos con datos acerca de las bases neurobiológicas de estos fenómenos. La única excepción a esta cuestión es un trabajo de Bilbo, Day y Wilczynski (2000), donde se analizó la participación de las vías colinérgicas en el aprendizaje de un laberinto acuático (*water maze*, laberinto de agua o de Morris) similar al que se usa en roedores, pero con adaptaciones para emplear ranas como sujetos experimentales. El laberinto de agua suele utilizarse para estudiar la memoria espacial en roedores (Rudy, Stadler-Morris &

Albert, 1987). Los animales son colocados en una pileta circular con claves visuales alrededor y tienen que nadar hasta encontrar una plataforma sumergida en el agua (en general no visible, pues el agua tiene disuelta una sustancia no tóxica que la hace opaca). Para una rata, el hecho de estar sumergida en el agua constituye un evento aversivo, pero evidentemente el agua no es aversiva en sí misma para un anfibio. Por eso, en este caso se calentó levemente el agua (a 30 °C) para motivar a las ranas a escapar. Aunque este experimento no tenía como meta el estudio del aprendizaje aversivo en anfibios (en realidad, analizaba el aprendizaje espacial), sí demostró de forma secundaria que la temperatura ligeramente elevada del agua es otro potencial estímulo aversivo para ser usado en

procedimientos de escape y evitación en este grupo. En particular, este estudio tuvo por objetivo analizar el efecto de inyecciones sistémicas de sulfato de atropina, un inhibidor de la acetilcolina, sobre la orientación en el espacio. Los resultados mostraron que los animales que recibían la droga presentaban dificultades en el aprendizaje, mientras que los animales que no recibían la droga aprendían a localizar la plataforma. Sin embargo, los autores atribuyeron este efecto de la droga sólo a la interrupción de la tarea espacial y no a algún efecto sobre el carácter aversivo de la tarea.

La **Tabla 1** resume los principales resultados registrados en la bibliografía sobre aprendizaje aversivo en anfibios.

Tabla 1. Resumen de los principales resultados obtenidos en experimentos de los trabajos publicados sobre aprendizaje aversivo en anfibios.

Autores	Año	Especie	Procedimiento	Estímulo	Resultado
McGill	1960	<i>Rana sphenoccephala</i>	Escape	Descargas eléctricas	No se observó aprendizaje.
Crawford & Longdon	1966	<i>Anaxyrus terrestris</i>	Escape y evitación	Descargas eléctricas	Aprendizaje sólo dentro de la sesión, pero no entre sesiones.
Boice	1970	<i>Rana pipiens</i> , <i>Scaphiopus hammondi</i> , <i>Bufo woodhouse</i> y <i>Rana clamitans</i>	Escape y evitación	Descargas eléctricas	Se observó cierto aprendizaje sólo en especies "activas".
Schmajuk & Segura	1980	<i>Rhinella arenarum</i>	Escape	Descargas eléctricas	Se observaron diferencias sólo después de 50 ensayos.
Karplus, Algom & Samuel	1981	<i>Xenopus</i> (especie acuática)	Evitación pasiva	Descargas eléctricas	Aprendizaje tanto dentro como entre sesiones.
Bilbo, Day & Wilczynski	2000	<i>Rana pipiens</i>	Water Maze (escape - tarea espacial)	Agua a 30 °C	Se observó aprendizaje.
Daneri, Papini & Muzio	2007	<i>Rhinella arenarum</i>	Condicionamiento clásico de respuesta autonómica	Solución salina de alta concentración	Condicionamiento de la respuesta cardiovascular.
Daneri, Papini & Muzio	2007	<i>Rhinella arenarum</i>	Escape y evitación	Solución salina de alta concentración	Aprendizaje de evitación desde la segunda sesión.
Muzio, Pistone, Creydt, Iurman, Rinaldi, Sirani & Papini	2011	<i>Rhinella arenarum</i>	Administración de un refuerzo aversivo en la caja meta de un corredor recto	Solución salina de alta concentración	Inhibición de la respuesta instrumental.
Muzio, Pistone, Creydt, Iurman, Rinaldi, Sirani & Papini	2011	<i>Rhinella arenarum</i>	Alternancia de refuerzo apetitivo y aversivo en la caja meta de un corredor recto	Solución salina de alta concentración	Inhibición de la respuesta instrumental.
Dicke, Heidorn & Roth	2011	<i>Bombina orientalis</i>	Condicionamiento instrumental con estímulo aversivo contingente a la respuesta de lengüetazo	Descargas eléctricas	Cambios mínimos en la respuesta con diferencias muy grandes entre sujetos.

5. Bases neurales del aprendizaje aversivo: El papel central de la amígdala

La amígdala es una estructura subcortical situada en el interior del lóbulo temporal rostral, que forma parte del sistema límbico, un conjunto de ganglios interconectados que regulan las emociones y la motivación (Carlson, 2006). Ya desde la primera mitad del siglo pasado, con los estudios pioneros de Klüver y Bucy (1937) sobre los efectos de la lobotomía temporal en monos Rhesus, se conoce que la amígdala está

involucrada en el aprendizaje y la memoria (McGaugh, McIntyre & Power, 2002). Hoy existe un enorme cúmulo de estudios que identifican a la amígdala como una de las principales estructuras asociadas con el aprendizaje aversivo. Distintos estudios en animales lesionados muestran que la lesión total y bilateral de la amígdala en ratas impide la adquisición de aprendizajes como la evitación pasiva (Swartzwelder, 1981), el aprendizaje de evitación activa (Jellestad & García Cabrera, 1986) y el condicionamiento clásico de la respuesta de miedo (Helmstetter, 1992). Huang, Shyu,

Hsiao, Chen y He (2013) estudiaron la expresión del gen c-fos en distintas estructuras del cerebro de la rata durante distintas fases del aprendizaje de evitación pasiva. Este gen aumenta tempranamente su expresión en neuronas durante procesos de plasticidad sináptica (Matsuoka, Fuyuki, Shoji & Kurihara, 1998). Los resultados mostraron que este gen se encontraba más expresado en la amígdala de sujetos que habían aprendido la tarea de evitación pasiva que en sujetos controles que no habían recibido manipulación. Por otro lado, Berman, Kesner y Partlow (1978) ya habían encontrado que el aprendizaje de evitación pasiva no se consolidaba cuando se inyectaban inhibidores de síntesis de proteínas en la amígdala, mientras que inyecciones de esta misma droga en la corteza frontal no presentaban dicho efecto amnésico.

A su vez, la amígdala está compuesta por distintos núcleos que tienen funciones diferenciadas. Los principales son el núcleo basolateral (BLA) y el núcleo central (CeA) (Moustafa et al., 2013). Estudios funcionales del CeA demuestran que este núcleo dispara la respuesta de miedo. Se ha observado en trabajos con roedores que las respuestas típicas a un estímulo aversivo inescapable son el congelamiento (*freezing*; es decir, quedarse quieto) o la taquicardia. Pero los animales con lesiones en el CeA, no responden a la estimulación aversiva (LeDoux, 1992). El BLA es una región de mucha plasticidad y se conecta directa o indirectamente con el CeA. Las lesiones en el BLA afectan la adquisición de un aprendizaje aversivo (LeDoux, 1993), pero no afectan la respuesta a estímulos aversivos en sí mismos. Se considera que mientras que el núcleo basolateral de la amígdala es el área principal de asociación entre estímulos aversivos y estímulos condicionados, el núcleo central se encarga de la emisión de la respuesta (Phelps & LeDoux, 2005).

Investigaciones llevadas a cabo en humanos han permitido indagar el papel de la amígdala en tareas de tipo interpersonal. Por ejemplo, se observaron cambios en la actividad de la amígdala de sujetos a los cuales se les presentaban rostros humanos, tanto con expresiones de miedo como con expresiones de alegría o caras neutras. Lo cual sugiere que la amígdala participa en el reconocimiento y la interpretación de las emociones observadas en otros sujetos (Somerville, Kim, Johnstone, Alexander & Whalen, 2004). Pero la amígdala no sólo procesa información visual, sino todo tipo de señales sensoriales con contenido emocional, como lo demostró otro trabajo en el que se encontró activación de la amígdala en sujetos que escuchaban risas o llantos (Sander & Scheich, 2001). Finalmente, en un estudio de caso único se evaluó la capacidad de

reconocer emociones en una mujer de 30 años que había sufrido la enfermedad de Urbach-Wiethe, una condición que causa destrucción casi total y bilateral de la amígdala pero que no afecta a otras estructuras. Esta mujer no tuvo problemas para reconocer personas. Pero cuando se le mostraron imágenes de caras que expresaban distintas emociones, tuvo dificultades para identificar la intensidad de la emoción que estaba observando, particularmente con las caras que expresaban miedo (Adolphs, Tranel, Damasio & Damasio, 1994).

6. La amígdala en peces y anfibios

Al comparar el sistema nervioso de los distintos grupos de vertebrados, se ha propuesto que ciertas regiones cerebrales serían homólogas entre sí. Se dice que dos estructuras en dos especies distintas son homólogas entre sí, si evolucionaron a partir de una misma estructura en un ancestro común. Desgraciadamente, el ancestro común entre la mayoría de las especies no es conocido, y en el mejor de los casos sólo se dispone de información limitada proveniente de restos fósiles. Dado que el sistema nervioso se descompone fácilmente, es prácticamente imposible conseguir muestras de cerebros de nuestro ancestro común con los anfibios o los peces. Por tal motivo, para establecer las homologías entre estructuras cerebrales de dos especies vivas se debe apelar a la comparación de varios aspectos complementarios: la topografía dentro del sistema nervioso central, la semejanza de sus conexiones aferentes y eferentes con otras regiones cerebrales, los detalles de su citoarquitectura y el tipo de neurotransmisores que utilizan las neuronas del área (Papini, 2009).

Todos los vertebrados comparten una organización general del sistema nervioso. Analizando comparativamente el cerebro en desarrollo durante la gestación, en todos los vertebrados se pueden observar distintas estructuras que se van diferenciando en la parte rostral del tubo neural: prosencéfalo (región anterior), mesencéfalo (región intermedia) y rombencéfalo (región posterior). A su vez, el prosencéfalo se divide en el telencéfalo (región que constituye los hemisferios cerebrales) y el diencefalo (donde se encuentran el tálamo y el hipotálamo) (Rosenzweig & Leiman, 1992). El telencéfalo de los mamíferos contiene la neocorteza, los ganglios de la base y el sistema límbico (siendo la amígdala uno de sus componentes). Debido a que la neocorteza se desarrolló tardíamente en el curso de la evolución, no se encuentra presente en el cerebro de los peces ni de los anfibios. El telencéfalo de los peces y anfibios es una

estructura fácil de detectar, se encuentra en la zona más anterior del sistema nervioso y lo constituyen dos núcleos de forma ovoidal. Si se realiza un corte coronal y se observa uno de los hemisferios, se verá un gran ventrículo en el centro y varias regiones de tejido a su alrededor.

Concentrándonos en el caso de los anfibios, se ha propuesto que la región ventrolateral del telencéfalo, el striatum, es homóloga a la amígdala de los mamíferos (Northcutt, 1974). Esta región recibe una gran cantidad de fibras que aportan distintos tipos de información sensorial. Estudios posteriores subdividieron la región ventrolateral, proponiendo sólo al segmento dorsal como homólogo a la amígdala de los mamíferos y al segmento ventral como homólogo al cuerpo estriado (Moreno & González, 2004). En particular, la amígdala de los sapos recibe información proveniente tanto de centros olfatorios como del tálamo. Este último se encarga de procesar información visual, táctil y auditiva, por lo que la amígdala de los anfibios se encargaría de hacer un procesamiento multisensorial, integrando los sentidos químicos con los no-químicos y atribuyéndole un valor emocional a aquello que se percibe (Moreno & González, 2007). Dentro de la organización general de los tetrápodos, la amígdala es ampliamente reconocida como un centro crítico para el procesamiento de formas básicas de aprendizaje emocional (por ejemplo, miedo condicionado), y el estudio funcional de sus estructuras en anfibios podría sugerir cómo evolucionó esta capacidad (Labege, Mühlenbrock-Lenter, Grunwal & Roth, 2006).

En el caso de los peces, la formación del telencéfalo durante la gestación se produce por un mecanismo de desarrollo embrionario distinto que en el resto de los vertebrados (por eversión, en lugar de por evaginación como en los anfibios y todos los amniotas; ver Papini, Salas y Muzio, 1999), por lo que las estructuras cerebrales presentan una distribución diferente. Así, en los peces, la región homóloga a la amígdala de los mamíferos se encuentra en el área dorsomedial del telencéfalo.

Por otra parte, es importante señalar que dos estructuras de dos especies distintas pueden ser homólogas entre sí, pero ello no significa que deban cumplir la misma función, como lo demuestra el clásico ejemplo de las extremidades superiores de las aves y de los primates. Dicho en otras palabras, la condición de homología no necesariamente lleva asociada una equivalencia funcional. Esto implica que es necesario estudiar la función de la amígdala en peces y anfibios, sin asumir de entrada que será idéntica a la de los mamíferos.

Portavella y colaboradores (2003, 2004a, 2004b) realizaron una serie de experimentos de escape y evitación en peces en los que se incluían animales con lesiones en las regiones homólogas al hipocampo y a la amígdala, así como ablaciones completas del telencéfalo. Se observó que las lesiones de las regiones homólogas a la amígdala y la ablación total del telencéfalo impedían la adquisición de la conducta de evitación. Además, si eran practicadas luego de una fase de adquisición, los animales no mostraban retención de la conducta previamente adquirida. Por el contrario, las lesiones hipocámpales no interferían ni con la adquisición ni con la evocación del aprendizaje de escape y evitación; a excepción de cuando se realizaba una versión del entrenamiento conocida como condicionamiento de huella o traza. En esta última situación, se deja transcurrir un tiempo entre la aparición del estímulo discriminativo de advertencia y el estímulo aversivo. De esta manera, para poder establecer la asociación el animal debe poder estimar el tiempo entre ambos eventos (una función generalmente adjudicada al hipocampo en mamíferos). Por lo tanto, estos primeros datos en peces sugieren que la región homóloga de la amígdala cumpliría un papel equivalente al de la amígdala de los mamíferos.

Por el momento, en nuestro laboratorio contamos con datos preliminares que indicarían que la región homóloga de la amígdala de los anfibios (el striatum) estaría implicada en el aprendizaje de evitación pasiva. Un estudio en el cual se entrenaron animales con lesiones en esta región sugiere que los sujetos del grupo lesionado, mostrarían un déficit en el aprendizaje de evitación pasiva. Lamentablemente, la cantidad de animales entrenados hasta el momento no fue suficiente para permitir la aplicación de un análisis estadístico, por lo que estos datos preliminares deben esperar a que las réplicas correspondientes confirmen la tendencia observada (Puddington y Muzio, 2007). Por otro lado, se está completando otro estudio en el cual se observaría una mayor actividad en la región ventrolateral del telencéfalo de los sapos del grupo experimental, con respecto a los del grupo control (Puddington, Iurman, Papini & Muzio, 2012). Es posible que en los próximos años consigamos recolectar datos suficientes para establecer si esta región homóloga en los anfibios tiene tanta importancia como la amígdala de los mamíferos para el aprendizaje aversivo, y podremos así avanzar sobre los sustratos moleculares de este tipo de fenómenos.

4. Conclusiones

El estudio del aprendizaje aversivo en anfibios

recién está empezando. La investigación de este tipo de aprendizaje con mamíferos comenzó tempranamente y consiguió establecer protocolos de entrenamiento consistentes y replicables. Gracias a ello hoy disponemos de modelos detallados de las bases neurales del condicionamiento aversivo. Y aunque falta mucho aún por descubrir, los avances logrados son asombrosos.

Como vimos, el establecimiento de los parámetros adecuados para observar el aprendizaje aversivo en anfibios fue más dificultoso. Sólo en el último tiempo se han conseguido avances significativos y, por lo tanto, se trata de un fenómeno que aún no está totalmente caracterizado. Existen estructuras cerebrales en anfibios que presentan homología con estructuras bien conocidas del cerebro de los mamíferos. Sin embargo, como ya vimos, dos estructuras homólogas no tienen por qué cumplir la misma función. Mientras que sólo disponemos de datos preliminares acerca de la función del área cerebral de los anfibios homóloga a la amígdala de los mamíferos, los estudios sobre la región homóloga al hipocampo (el pallium medial) se encuentran más avanzados. Se ha visto que al igual que ocurre en mamíferos, lesiones en dicha región afectan tanto a la inhibición de un aprendizaje previo (Muzio, Segura & Papini, 1993; Papini, Muzio & Segura, 1995), como a la habilidad para adquirir una tarea espacial (Daneri, 2010; Daneri, Casanave & Muzio, en preparación; Daneri y Muzio, 2013). Sorprendentemente, a pesar de la distancia evolutiva, el pallium medial y el hipocampo son regiones homólogas entre sí que conservan funciones comunes. Sería potencialmente esperable encontrar que en anfibios la función de la región homóloga a la amígdala de los mamíferos también esté conservada, más aún si consideramos que el aprendizaje de eventos aversivos tiene una gran importancia en la supervivencia de un animal.

Los procedimientos de escape y evitación y de condicionamiento clásico de la respuesta del miedo han sido propuestos frecuentemente como modelos de fobia y estrés post-traumático, respectivamente (Dębiec, Doyère, Nader & LeDoux, 2006; Pérez-Acosta, 2005). Se ha postulado que las personas que padecen una fobia realizan conductas de evitación que son las que impiden que el individuo experimente la inocuidad del evento temido, de la misma manera que lo haría un animal que se encuentra en la fase de extinción de un procedimiento de escape y evitación (Pérez-Acosta, 2005). Es evidente que los modelos no humanos de fobias son versiones simplificadas que no cuentan con el aspecto semántico del comportamiento humano. Sin embargo, han sido sumamente útiles tanto en el avance

de las técnicas de análisis y modificación de la conducta, como en el desarrollo de medicamentos. Por otra parte, en los últimos años se ha puesto un especial énfasis en el fenómeno de la reconsolidación de la memoria (Sweatt, 2010). Estudios sobre la memoria traumática en relación con la plasticidad neuronal mostraron que la combinación de un antagonista del receptor NMDA de glutamato (MK-801) con un procedimiento conductual específico, permitiría borrar una traza de memoria de condicionamiento de miedo en ratas (Lee, Milton & Everitt, 2006). Dejando de lado los posibles debates éticos que esto pudiera generar, hay que destacar que estos estudios en animales pueden ser el inicio de una próxima generación de tratamientos completamente distintos de los que hoy están disponibles.

El modelo anfibio es una versión aún más simplificada que los roedores, ya que además de no contar con el componente lingüístico, tampoco posee modulación cortical. En los humanos, la información sensorial llega a la amígdala por medio de dos caminos: una vía rápida, que pasa por el tálamo, y una vía más lenta que pasa por la corteza cerebral. Es decir, que la información que primero se procesa es la que viene del tálamo (Li, Stutzmann & LeDoux, 1996). Los anfibios constituyen un modelo de este circuito. Entender las diferencias entre estas dos vías de procesamiento de la información, es uno de los grandes enigmas del campo de los miedos aprendidos (Sigurdsson, Doyère, Cain & LeDoux, 2007). Esperamos entonces que el estudio de grupos filogenéticamente antiguos como los anfibios contribuya a encontrar estas respuestas.

La perspectiva evolutiva puede parecer reduccionista, lejana y poco relevante a quienes desean comprender el comportamiento humano. Sin embargo, como señala Edelman (2004), el cerebro humano no surgió a partir de un diseñador inteligente que optimiza cada una de las funciones que debe realizar, sino que es producto de la evolución, que posee una lógica distinta. Una parte de nuestro comportamiento refleja aspectos de nuestro pasado filogenético, y resulta difícil entender nuestra conducta sin tenerlo en cuenta. Quizás tengamos que decir, parafraseando a Dobzhansky (1964): “nada tiene sentido en psicología, si no es a la luz de la evolución”.

Agradecimiento

Este trabajo se realizó gracias a la financiación del subsidio UBACYT-P052 de la Universidad de Buenos Aires, del subsidio PIP 3196 del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) y del subsidio PICT 2243 del FONCYT-ANPCYT

(Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) Argentina, dirigidos por Rubén N. Muzio.

Referencias

- Adolphs, R., Tranel, D., Damasio, H. & Damasio, A. (1994). Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature*, 372, 669-672.
- Beer, R., Wagner, F., Grishkevich, V., Peshkin, L. & Yanai, I. (2012). Toward an unbiased evolutionary platform for unraveling *Xenopus* developmental gene networks. *Genesis*, 50 (3), 186-191.
- Bentley, J. & Yorio, T. (1979). Do frogs drink? *Journal of Experimental Biology*, 79, 41-46.
- Berman, R. F., Kesner, R. P. & Partlow, L. M. (1978). Passive avoidance impairment in rats following cycloheximide injection into the amygdala. *Brain Research*, 158, 171-188.
- Bilbo, S. D., Day, L. B. & Wilczynski, W. (2000). Anticholinergic effects in frogs in a Morris water maze analog. *Physiology and Behavior*, 69, 351-357.
- Boice, R. (1970). Avoidance learning in active and passive frogs and toads. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 70, 154-156.
- Brown, R. T. & Wagner, A. R. (1964). Resistance to punishment and extinction following training with shock or nonreinforcement. *Journal of Experimental Psychology*, 68, 503-507.
- Carlson, N. R. (2006). *Fisiología de la conducta*. 8va. Edición. Madrid: Pearson Education.
- Crawford, F. T. & Longdon, J. W. (1966). Escape and avoidance responding in the toad. *Psychonomic Science*, 6, 115-116.
- Daneri, M. F. (2010). *Aprendizaje espacial en el anfibio anuro Bufo arenarum. Estrategias, fenómenos y bases neurales*. Disertación doctoral no publicada. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Daneri, M. F. y Muzio, R. N. (2013). El aprendizaje espacial y su relevancia en anfibios. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento (RACC)*. En prensa.
- Daneri, M. F., Papini, M. R. & Muzio, R. N. (2007). Common toads (*Bufo arenarum*) learn to anticipate and avoid hypertonic saline solutions. *Journal of Comparative Psychology*, 121, 419-427.
- Darwin, C. R. (1859). *On the origin of species*. London: John Murray.
- Débiec, J., Doyère, V., Nader, K. & LeDoux, J. E. (2006). Directly reactivated, but not indirectly reactivated, memories undergo reconsolidation in the amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 3428-3433.
- Dicke, U., Heidorn, A. & Roth, G. (2011). Aversive and non-reward learning in the fire-bellied toad using familiar and unfamiliar prey stimuli. *Current Zoology*, 57, 709-716.
- Dobzhansky, T. (1964). Biology, Molecular and Organismic. *American Zoologist*, 4, 443-452.
- Edelman, G. M. (2004). *Wider than the sky: The phenomenal gift of consciousness*. New Haven, CT: Yale University Press.
- Ferreira, H. G. & Jesus, C. H. (1973). Salt adaptation in *Bufo bufo*. *The Journal of Physiology*, 228, 583-600.
- Gray, J. A. (1993). *La psicología del miedo y el estrés*. Barcelona: Labor Universitaria.
- Helmstetter, F. J. (1992). Contribution of the amygdala to learning and performance of conditional fear. *Physiology and Behavior*, 51, 1271-1276.
- Huang, A. C. W., Shyu, B.-C., Hsiao, S., Chen, T.-C. & He, A. B.-H. (2013). Neural substrates of fear conditioning, extinction, and spontaneous recovery in passive avoidance learning: A c-fos study in rats. *Behavioural Brain Research*, 237, 23-31.
- Jellestad, F. K. & García Cabrera, I. (1986). Exploration and avoidance learning after ibotenic acid and radio frequency lesions in the rat amygdala. *Behavioral and Neural Biology*, 46, 196-215.
- Kaas, J. H. (2009). *Evolutionary Neuroscience*. Oxford, UK: Academic Press.
- Karplus, I., Algom, D. & Samuel, D. (1981). Acquisition and retention of dark avoidance by the toad, *Xenopus laevis* (Daudin). *Animal Learning & Behavior*, 9, 45-49.
- Kim, J. J. & Jung, M. W. (2006). Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30, 188-202. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.06.005.
- Klüver, H. & Bucy, P. C. (1937). "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *American Journal of Physiology*, 119, 352-353.
- Laberge, F., Mühlbrock-Lenter, S., Grunwal, W. & Roth, G. (2006). Evolution of the amygdala: new insights from studies in amphibians. *Brain, Behavior and Evolution*, 67, 177-187.
- LeDoux, J. E. (1992). Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Current Opinion in Neurobiology*, 2, 191-197.
- LeDoux, J. E. (1993). Emotional memory systems in the brain. *Behavioural Brain Research*, 58, 69-79.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 155-184.
- Lee, J. L. C., Milton, A. L. & Everitt, B. J. (2006). Reconsolidation and extinction of conditioned fear: Inhibition and potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 26, 10051-10056.
- Li, X. F., Stutzmann, G. E. & LeDoux, J. E. (1996). Convergent but temporally separated inputs to lateral amygdala neurons from the auditory thalamus and auditory cortex use different postsynaptic receptors: in vivo intracellular and extracellular recordings in fear conditioning pathways. *Learning and Memory*, 3, 229-242.
- Loza Coll, M. A. (1998). *Comportamiento del anfibio anuro Bufo arenarum (sapo común) frente a soluciones*

- externas de diferente osmolaridad*. Tesis de Licenciatura no publicada. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Loza Coll, M. A. & Muzio, R. N. (2013). Hyperosmotic NaCl solutions as aversive stimuli in the terrestrial toad *Rhinella arenarum*. Enviado para su publicación al *Journal of Experimental Biology*.
- Mackintosh, N. J. (1974). *The Psychology of Learning*. London: Academic Press.
- Matsuoka, I., Fuyuki, K., Shoji, T. & Kurihara, K. (1998). Identification of *c-fos* related genes and their induction by neural activation in rainbow trout brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *1395* (2), 220-227.
- McGaugh, J. L., McIntyre, C. K. & Power, A. E. (2002). Amygdala modulation of memory consolidation: Interaction with other brain systems. *Neurobiology of Learning and Memory*, *78*, 539-552.
- McGill, T. E. (1960). Response of the leopard frog to electric shock in an escape-learning situation. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *53*, 443-445.
- Moreno, N. & González A. (2004). Localization and connectivity of the lateral amygdala in anuran amphibians. *The Journal of Comparative Neurology*, *479*, 130-148.
- Moreno, N. & González, A. (2007). Evolution of the amygdaloid complex in vertebrates, with special reference to the anamnio-amniotic transition. *Journal of Anatomy*, *211*, 151-163.
- Moustafa, A., Gilbertson, M., Orr, S., Herzallah, M., Servatius, R. & Myers, C. (2013). A model of amygdala-hippocampal-prefrontal interaction in fear conditioning and extinction in animals. *Brain and Cognition*, *81*, 29-43.
- Muzio, R. N. (1999). Aprendizaje instrumental en anfibios. *Revista Latinoamericana de Psicología*, *31*, 35-47.
- Muzio, R. N. (2012). Aprendizaje en anfibios, el eslabón perdido: Un modelo simple cerebral en el estudio de conductas complejas. *Cuadernos de Herpetología*, *27*(2), 87-100.
- Muzio, R. N., Pistone Creydt, V., Iurman, M., Rinaldi, M., Sirani, B., & Papini, M. R. (2011). Incentive or Habit Learning in Amphibians? *PLoS One*, *6*(11): e25798. DOI: 10.1371/journal.pone.0025798.
- Muzio, R. N., Segura, E. T. & Papini, M. R. (1992). Effect of schedule and magnitude of reinforcement on instrumental acquisition and extinction in the toad, *Bufo arenarum*. *Learning and Motivation*, *23*, 406-429.
- Muzio, R. N., Segura, E. T. & Papini, M. R. (1993). Effects of lesions in the medial pallium on instrumental learning in the toad *Bufo arenarum*. *Physiology and Behavior*, *54*, 185-188.
- Northcutt, R. G. (1974). Some histochemical observations on the telencephalon of the bullfrog, *Rana catesbiana* Shaw. *Journal of Comparative Neurology*, *157*, 379-390.
- Papini, M. R. (2009). *Psicología comparada. Evolucion y desarrollo del comportamiento*. Bogotá: Manual Moderno.
- Papini, M. R., Muzio, R. N. & Segura, E. T. (1995). Instrumental learning in toads (*Bufo arenarum*): Reinforcer magnitude and the medial pallium. *Brain, Behavior and Evolution*, *46*, 61-71.
- Papini, M. R., Salas, C. y Muzio, R. N. (1999). Análisis comparativo del aprendizaje en vertebrados. *Revista Latinoamericana de Psicología*, *31*, 15-34.
- Pérez-Acosta, A. M. (2005). Fundamentos de las terapias de exposición contra las fobias: Una propuesta teórica integradora de la conducta de evitación. *Terapia Psicológica*, *23*, 25-35.
- Phelps, E. A. & LeDoux, J. E. (2005). Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron*, *48*, 175-187.
- Portavella, M., Salas, C., Vargas, J. P. & Papini, M. R. (2003). Involvement of the telencephalon in spaced-trial avoidance learning in the goldfish (*Carassius auratus*). *Physiology and Behavior*, *80*, 49-56.
- Portavella, M., Torres, B. & Salas, C. (2004a). Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *The Journal of Neuroscience*, *24*, 2335-2342.
- Portavella, M., Torres, B., Salas, C. & Papini, M. R. (2004b). Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). *Neuroscience Letters*, *362*, 75-78.
- Pough, H., Janis, C. M. & Heiser, J. B. (1999). *Vertebrate Life*. 5th Edition. New Jersey: Prentice Hall International.
- Puddington, M. M., Iurman, M. G., Papini, M. R. & Muzio, R. N. (2012). Neural activation during passive avoidance learning in the terrestrial toad, *Rhinella arenarum*. 120th APA Convention (American Psychological Association). Behavioral Neuroscience and Comparative Psychology. Orlando (FL), USA. August 1-5, 2012.
- Puddington, M. M. y Muzio, R. N. (2007). Aprendizaje de una tarea de evitación pasiva en el anfibio anuro *Bufo arenarum*. Efecto de lesiones en la amígdala. XI Reunión de la Asociación Argentina de Ciencias del Comportamiento. Mendoza, Argentina. Septiembre 6-8, 2007.
- Reboreda, J. C., Muzio, R. N., Viñas, M. C. & 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.
- Rosenzweig, M. R. & Leiman, A. I. (1992). *Psicología Fisiológica*. 2da. Ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España.
- Rudy, J. W., Stadler-Morris, S. & Albert, P. (1987). Ontogeny of spatial navigation behaviors in the rat: dissociation of "proximal"- and "distal"-cue-based

- behaviors. *Behavioral Neuroscience*, 101, 62-73.
- Sander, K. & Scheich, H. (2001). Auditory perception of laughing and crying activates human amygdala regardless of attentional state. *Cognitive Brain Research*, 12, 181-198.
- Schmajuk, N. A., Segura, E. T. & Rebores, J. C. (1980). Appetitive conditioning and discriminatory learning in toads. *Behavioral and Neural Biology*, 28, 392-397.
- Sigurdsson, T., Doyère, V., Cain, C. K. & LeDoux, J. E. (2007). Long-term potentiation in the amygdala: A cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology*, 52, 215-227.
- Somerville, L. H., Kim, H., Johnstone, T., Alexander, A. L. & Whalen, P. J. (2004). Human amygdala responses during presentation of happy and neutral faces: Correlations with state anxiety. *Biological Psychiatry*, 55, 897-903.
- Suboski, M. D. (1992). Releaser-induced recognition learning by amphibians and reptiles. *Animal Learning and Behavior*, 20, 63-82.
- Swartzwelder, S. (1981). Deficits in passive avoidance and fear behavior following bilateral and unilateral amygdala lesions in mice. *Physiology and behavior*, 26, 323-326.
- Sweatt, J. D. (2010). *Mechanisms of memory*. 2nd Ed. London: Academic Press.
- Tinbergen, N. (1951). *The study of instinct*. New York: Clarendon Press/Oxford University Press.
- Watson, J. B. & Rayner, R. (1920). Conditioned emotional reactions. *Journal of Experimental Psychology*, 3, 10-14.
- Wells, K. D. (2007). *The ecology and behavior of amphibians*. Chicago and London: The University of Chicago Press.