

**Amphibians as an experimental model for the study of the evolution of  
spatial cognition and its neural bases.**

---

Rubén N. Muzio

M. Florencia Daneri

María Inés Sotelo

VERSIÓN PRE-PRINT

## **Los anfibios como modelo experimental para el estudio de la evolución de la cognición espacial y sus bases neurales.**

Cómo citar este artículo: Muzio,R.,Daneri,M.F. & Sotelo,M.I.(2018).Los anfibios como modelo experimental para el estudio de la evolución de la cognición espacial y sus bases neurales. . *Revista Tesis Psicológica*, 13(2), 1-27.

Recibido: enero 09 de 2018  
Revisado: mayo 08 de 2019  
Aprobado: noviembre 27 de 2018

### **Resumen**

Los anfibios constituyen un grupo filogenéticamente muy antiguo que se caracteriza por ser los representantes de la transición del medio acuático al terrestre, con todas las implicancias que esto pudo tener en la organización de su sistema nervioso. El uso de este modelo animal para estudiar la evolución de la cognición espacial, brinda la ventaja adicional, al no poseer neocorteza, de poder indagar acerca de los circuitos cerebrales básicos que subyacen a este tipo de conducta. En este trabajo se describen los distintos procedimientos y dispositivos experimentales que se utilizan para el estudio de las habilidades de orientación y navegación espacial en anfibios y sus bases neurales. Teniendo en cuenta toda la información acumulada hasta el momento en este modelo experimental se concluye que las propiedades de esta habilidad cognitiva han sido mayormente conservadas a lo largo de la evolución.

**Palabras clave:** Anfibios, Cognición espacial, Bases neurales, Evolución.

### **Abstract**

Amphibians are a phylogenetically very old group that is characterized by being the representatives of the transition from the aquatic to terrestrial environment, with all the implications that this could have on the organization of its nervous system. The use of this animal model to study the evolution of spatial cognition, offers the additional advantage, by not having neocortex, of being able to inquire about the basic brain circuits that underlie this kind of behavior. This paper describes the several procedures and experimental devices that are used for the study of spatial navigational and orientation abilities in amphibians and its neural bases. Taking into account all the information accumulated so far in this experimental model, it is concluded that the properties of this cognitive ability have been largely conserved throughout evolution.

**Keywords:** Amphibians, Spatial Cognition, Neural basis, Evolution.

## Introducción

Los anfibios conforman un grupo filogenéticamente muy antiguo, crucial dentro de los vertebrados ya que sus ancestros sobrellevaron la transición del medio acuático al terrestre, y todas las implicancias que esto pudo haber tenido en la organización de su sistema nervioso. Es sorprendente entonces lo poco que se ha estudiado hasta el momento la organización cerebral de los anfibios, y en particular la formación hipocampal, en relación a la conducta de orientación y navegación espacial (Bingman & Muzio, 2017; Daneri & Muzio, 2013; Muzio, 2013; Muzio, Daneri & Sotelo, 2018; Sotelo & Muzio, 2015).

El uso de este modelo animal para indagar acerca de la evolución de la cognición espacial brinda la ventaja adicional, dado que su cerebro no posee neocorteza, de poder indagar acerca de los circuitos neurales básicos que subyacen a este tipo de conducta (Muzio, 2013).

En este trabajo se describirán los distintos procedimientos y dispositivos experimentales que se utilizan para el estudio de las habilidades espaciales en anfibios y sus bases neurales. En particular, se destacará como modelo

experimental al sapo terrestre *Rhinella arenarum* como representante anuro de este grupo, siendo hasta el momento la especie más estudiada en relación a los mecanismos cerebrales asociados a la cognición espacial en esta clase de vertebrados (Daneri, Casanave & Muzio, 2011; Muzio et al., 2018; Sotelo, Bingman & Muzio, 2015; Sotelo, Daneri, Bingman & Muzio, 2016).

## Uso de dispositivos experimentales en el estudio del aprendizaje espacial en anfibios

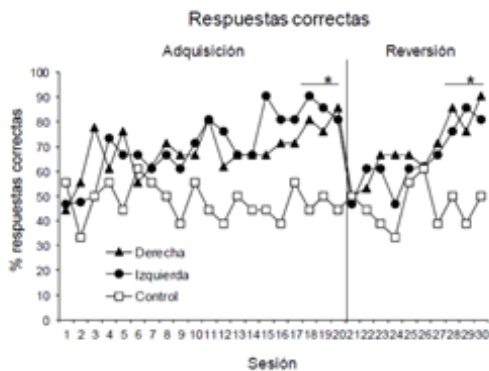
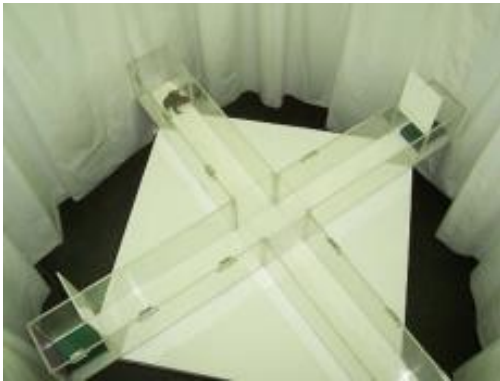
Los dispositivos experimentales que se utilizan para el estudio de las habilidades espaciales en laboratorio son los laberintos. Los laberintos han sido diseñados con variadas formas y tamaños, desde el campo abierto (*open field*) (circulares, rectangulares, etc.) o el laberinto de agua (*water maze* o laberinto de Morris) donde la exploración no está restringida, hasta los de camino predeterminado como el laberinto radial (*radial maze*), el laberinto en cruz (*plus maze*) o el laberinto en T (*T-maze*) (Daneri & Muzio, 2013).

### *Orientación espacial mediante el uso de estrategias egocéntricas*

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 espacial basado en estrategias denominadas egocéntricas (la fuente de información espacial está puesta en relación al propio animal y no en correlaciones espaciales entre los elementos que lo rodean). A este aprendizaje taxonómico normalmente se lo divide en dos tipos: orientación y aprendizaje de guía (Daneri & Muzio, 2013).

Poco es lo que se encuentra en la bibliografía referente a estudios de aprendizaje utilizando laberintos con anfibios. Dentro de las escasas publicaciones cabe destacar el trabajo de Greding (1971) quien 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 de un estímulo aversivo eléctrico (el brazo derecho era el único seguro, sin descarga eléctrica). Allí 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 evaluada 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. En nuestro laboratorio, usando el sapo terrestre *Rhinella arenarum* se ha observado que los sujetos son capaces de aprender una tarea de orientación en un laberinto en cruz (con un arreglo espacial en T) empleando agua como recompensa, a la cual se accedía ejecutando siempre la misma respuesta de giro (a la derecha o a la izquierda, según el grupo experimental) (Daneri et al., 2011). Una vez llegados a criterio de aprendizaje (más del 75% de respuestas correctas) los animales eran capaces de revertir esa respuesta y aplicar la regla a la situación inversa, cuando se cambiaba el sentido de giro para llegar a la recompensa en el brazo opuesto (ver Figura 1).



**Figura 1.** Izq: Vista superior del laberinto en cruz (rodeado de una cortina blanca para evitar referencias visuales externas). Der: Porcentaje de respuestas correctas para los animales de los grupos Giro (recompensa siempre a Derecha o Izquierda) y Control (ambos brazos recompensados 50% en forma azarosa). El asterisco indica diferencias significativas entre condiciones (\*:  $p < 0.05$ ). [Adaptado de Daneri, Casanave & Muzio, 2011].

El aprendizaje por orientación observado en los anfibios es fundamental para su supervivencia, ya que brinda la capacidad de movilizarse en el espacio de manera rápida aún en condiciones donde no se disponga de

otro tipo de claves ambientales (por ejemplo en la oscuridad, donde no hay acceso a claves visuales). Dado el valor evolutivo de esta conducta no es sorprendente que esté presente en una gran variedad de clases zoológicas, con distintas especies representantes como abejas, hormigas, lombrices, ratas, ratones, palomas y peces, entre otros organismos, incluyendo también algunas especies de anuros (Daneri & Muzio, 2013; Greding, 1971; Ingle & Sahagian, 1973; Muzio, 2013; Sotelo & Muzio, 2015).

*El sonido como estímulo de orientación espacial.* Existen datos que demuestran que los anfibios son capaces de utilizar la información auditiva como referencia para orientarse y hallar una pareja o una fuente de agua (Wells, 1977, Wilczynski & Capranica, 1984; Wilczynski et al., 1984). Sin embargo, estos datos provienen mayormente de estudios de campo, donde las variables no están completamente aisladas unas de otras y es más difícil hacer determinaciones precisas. Valiéndonos del laberinto en cruz en el laboratorio (utilizado en una disposición en T), agua como reforzador y colocando dos parlantes en el extremo de los brazos opuestos, entrenamos sapos para que pudieran encontrar una recompensa

cercana o lejana (según el caso) usando una fuente de sonido (un canto de sapo macho) que se activaba de manera azarosa en alguno de los brazos (Sotelo, Bingman & Muzio, en preparación). Los animales debían salir del brazo de partida y luego girar hacia el brazo izquierdo o derecho, en cuyos extremos había un recipiente que podía contener agua como recompensa (sólo uno se hallaba reforzado). La localización de la recompensa (brazo izquierdo o derecho) era azarosa, pudiendo predecirla únicamente a través de la detección de la fuente de sonido que provenía de alguno de los brazos. La mitad de los animales encontraban la recompensa en el brazo opuesto del que provenía el canto y la otra mitad hacia el mismo lado. Los resultados generales indican que en estas condiciones experimentales los sapos fueron capaces de navegar exitosamente hacia la recompensa valiéndose únicamente de la información auditiva proporcionada.

### ***Orientación espacial utilizando información geométrica del entorno***

La información de tipo geométrica (dada por formas, contornos, relaciones espaciales entre referencias; Cheng, 1986) está siempre presente en el ambiente. Esta fuente de información

geométrica es ampliamente utilizada por los animales para orientarse en sus respectivos entornos (e.g., Sutton, 2009; para una revisión detallada ver Cheng et al., 2013). En un ambiente natural por supuesto abunda en mayor medida la geometría irregular (Sutton, 2009), al contrario de lo que ocurre en las grandes ciudades humanas y los edificios. Sin embargo, el desarrollo de geometrías ambientales regulares (ya sea en laboratorio o en arenas virtuales) es útil para poder estudiar la utilización de propiedades geométricas en la navegación espacial (Cheng et al., 2013; Sotelo et al., 2015) ya que permite simplificar las variables geométricas de estudio (como pueden ser la geometría de contorno *-boundary-*, los ángulos o distancias relativas entre referencias; Lee et al., 2012; Pearce et al., 2004; Spelke et al., 2010). Un ejemplo muy utilizado para abordar la cuestión de la geometría espacial es la arena rectangular (Cheng, 1986; Sotelo & Muzio, 2015). En un estudio mundialmente famoso que introdujo la discusión acerca de este tipo de información, Cheng (1986) entrenó ratas en una arena rectangular con presencia de claves visuales y olfatorias en las paredes para que buscaran una recompensa (comida) oculta bajo la

viruta en un lugar particular de la arena. Sorprendentemente, encontró que aunque por sí solas las claves visuales o las olfatorias bastaban para poder localizar la recompensa, las ratas tendían a cometer errores sistemáticos escurbando con alta frecuencia en un lugar ubicado a 180° (diagonalmente opuesto) de donde se hallaba oculta la recompensa. Cheng atribuyó estos resultados a que en esta situación las ratas confiaban mayormente en la información brindada por la forma rectangular de la arena, más que por las claves visuales y olfatorias presentes. Como la arena rectangular generaba dos esquinas diagonales opuestas geoméricamente iguales, las ratas elegían con cierta frecuencia la esquina equivocada.

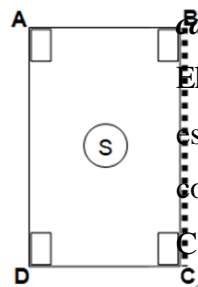
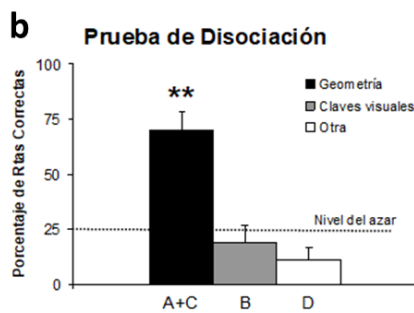
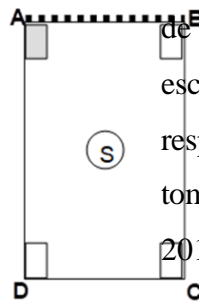
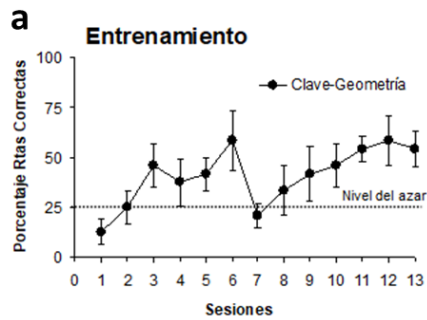
***Geometría y claves visuales en la orientación espacial.*** Luego de los experimentos de Cheng (1986) se sucedieron muchos otros que empezaron a cuestionar la utilización de la geometría para la navegación (para una revisión, ver Cheng & Newcombe, 2005; Cheng et al., 2013) usando distintas especies y entornos. Sin embargo, uno de los dispositivos experimentales más utilizado para estos estudios sigue siendo la arena

rectangular, que se emplea para la adquisición de una respuesta de aprendizaje espacial inicial para luego indagar (como lo hizo Cheng, 1986) con la utilización de otros tipos de claves y ensayos de prueba acerca de cuáles características del ambiente en estas condiciones controlan la conducta aprendida (e.g., Bingman et al., 2006; Sotelo et al., 2015; Sotelo, Bingman & Muzio, 2017; Vargas et al., 2004). En este sentido, en nuestro laboratorio hemos utilizado esta arena rectangular con distintos propósitos vinculados al estudio del uso de la geometría en el sapo *R. arenarum*. En un primer experimento (Sotelo et al., 2015) entrenamos sapos para que ubiquen la recompensa (agua), utilizando la arena rectangular sin claves visuales en sus paredes (grupo Sólo Geometría) o en combinación con un panel con rayas transversales rojas y azules sobre una de las paredes angostas (grupo Clave-Geometría). Así, el primer grupo de sapos debía llegar a la meta usando únicamente información geométrica (por ej., relación entre paredes largas y cortas), mientras que el segundo grupo de sapos también disponía en su entorno de información geométrica y además una clave visual polarizante (dado que sólo uno de las paredes angostas tenía el

panel; Figura 2a derecha). Una vez adquirida la respuesta, en ambos grupos se desarrollaron ensayos de prueba (tests): (i) para el grupo Sólo Geometría el único test consistía en romper la geometría rectangular colocando en la arena dos paneles adicionales que generaban una nueva geometría cuadrada, la cual no aportaba información precisa sobre la localización de la recompensa; (ii) para el grupo Clave-Geometría se realizaron tres tests: a) un Test de geometría, donde el panel visual se retiraba de la pared y sólo quedaba la información aportada por la geometría rectangular para localizar la recompensa, b) un Test de clave, donde la arena rectangular se transformaba a una arena cuadrada (como en el grupo Sólo Geometría) pero manteniendo la presencia del panel rayado sobre una de las paredes, y c) un Test de disociación/conflicto, donde se retiraba el panel de la pared corta y se colocaba un nuevo panel rayado similar en una de las paredes anchas de la arena (Figura 2b derecha). De esta forma, el objetivo de estos últimos tests era establecer si los animales eran capaces de encontrar la recompensa utilizando (a) información geométrica únicamente, (b) información de clave únicamente, (c) información preferencial, ya sea de

geometría o clave visual, en el caso de presentarse las fuentes de información en conflicto (determinando así cuál era la preferencia de los animales en esta situación). Los antecedentes provenientes de estudios en otros vertebrados utilizando entornos muy similares demuestran que ratas, palomas y peces (Bingman et al., 2006; Cheng, 1986; Vargas et al., 2004) son capaces de utilizar tanto información geométrica como de clave visual para orientarse en el espacio. Pero mientras palomas y ratas preferían guiarse por medio de la geometría en el test de conflicto, los peces preferían guiarse por la información de clave visual (Vargas et al., 2004). Nuestros resultados mostraron que los sapos pueden aprender a ubicar una meta utilizando tanto información de geometría y de claves visuales, pero en una situación de conflicto entre las fuentes de información espacial, los animales prefirieron para guiarse la información geométrica (Figura 2).





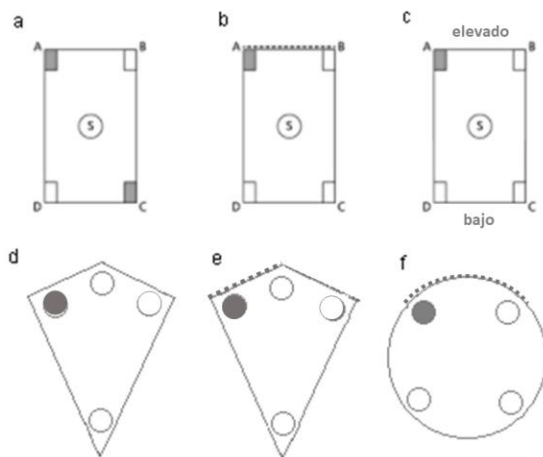
**Figura 2.** Resumen de resultados del aprendizaje de geometría y claves visuales. **a.** Porcentaje de respuestas correctas del grupo Clave-Geometría durante el entrenamiento (izquierda). Durante el entrenamiento, los animales usaron para orientarse la información del contorno geométrico de la arena rectangular y la clave visual polarizante (derecha). **b.** Porcentaje de respuestas correctas durante la prueba de disociación, donde los sapos prefirieron la geometría para ubicar la meta (izquierda) cuando las dos fuentes de información estuvieron en conflicto (derecha). Los asteriscos indican diferencias significativas entre condiciones (\*\*:  $p < 0.01$ ). [Adaptado de Sotelo, Bingman & Muzio, 2015].

Así, a través del análisis comparado con estas otras especies de vertebrados, se comprobó que los sapos se comportaban como sus pares amniotas. A nivel evolutivo, esto podría estar reflejando

una estrategia de respuesta característica de tetrápodos terrestres, aunque dada la escasa información disponible al respecto, estas conclusiones deben ser tomadas con cautela (Sotelo et al., 2015).

### ¿Geometría de contorno o características geométricas aisladas?

El mismo procedimiento empleado en el estudio anterior en la arena rectangular, con las condiciones Sólo Geometría y Clave-Geometría (Figura 3a,b), fue repetido en otro experimento para analizar mediante un nuevo test la transferencia de información desde el contorno de geometría rectangular a otro contexto de geometría romboidal (Sotelo, Bingman & Muzio, enviado para su publicación). Este cambio generaba la inversión de la disposición alternada de las paredes cortas y largas de la arena rectangular, generando un romboide con dos paredes cortas y dos largas sucesivas (manteniendo tanto la longitud de las paredes cortas como la de las largas, además de conservar la presencia de dos esquinas de  $90^\circ$  entre una pared corta y una larga contiguas; Figura 3d-e).



**Figura 3.** Diagramas de las arenas utilizadas en las tareas de aprendizaje espacial con geometría. **a.** Arena rectangular de Sólo Geometría. **b.** Arena rectangular de Clave-Geometría (con panel rayado). **c.** Arena rectangular de Geometría y Pendiente (con un lado elevado y otro bajo). **d.** Arena romboidal con Geometría sola. **e.** Arena romboidal con Geometría y Clave (panel rayado). **f.** Arena circular. Las piletas grises representan un ejemplo de los lugares recompensados para un animal.

Experimentos similares fueron desarrollados en ratas por Pearce y colaboradores (2004, 2006) en una arena rectangular y otra romboidal que contenían agua turbia para esconder una plataforma sumergida. El objetivo era testear si como Cheng (1986) había predicho, las ratas estaban utilizando la *geometría general* de la arena rectangular, o simplemente se guiaban con las propiedades geométricas de la esquina recompensada en particular, generada por la unión de una pared

corta y otra larga en un ángulo de 90°. Esta diferencia sería esencial para determinar si la geometría como tipo de información es clave para la navegación, o sencillamente puede resumirse en propiedades o variables más simples del ambiente (Cheng et al., 2013). Si las ratas estuvieran utilizando todo el contorno de la arena como información, la transformación de rectángulo a romboide debería impedir que encuentren el refuerzo (en este caso, la plataforma sumergida); mientras que si sólo se guiaban por la presencia de una pared corta y otra larga consecutivas, podrían igualmente ubicar la esquina correcta por más que la geometría general cambiara. Esto último fue lo que sucedió en este estudio (Pearce et al., 2004, 2006), ya que las ratas fueron capaces de ubicar la plataforma escondida aun cuando la geometría general se había transformado. En nuestro caso, a diferencia de lo ocurrido en ratas, la respuesta de los sapos bajo la condición Sólo Geometría indicó que cuando los animales fueron cambiados de la arena rectangular (Figura 3a) a la arena romboidal (Figura 3d), se basaron principalmente en la forma general o geometría del entorno para codificar la ubicación de la meta, ya que estos

animales no pudieron transferir exitosamente la información aprendida para ubicar la meta. En tanto que para la condición Clave-Geometría, cuando los animales fueron cambiados de la arena rectangular con clave visual (Figura 3b) a la arena romboidal -también con clave visual- (Figura 3e), los sapos parecían elegir preferentemente una esquina que, en términos generales, era correcta en relación con clave visual experimentada durante el entrenamiento. En conjunto, los resultados de este estudio sugieren que los sapos y las ratas difieren en las estrategias que emplean para representar la información espacial disponible en una arena rectangular. Esto podría implicar que anfibios y mamíferos hayan desarrollado diferentes mecanismos neurales, tal vez relacionados con diferentes presiones de selección evolutiva, para la representación de la geometría ambiental utilizada para la navegación. Pero para responder a esta hipótesis debemos realizar a futuro más estudios funcionales sobre los mecanismos cerebrales asociados.

Por último, se realizó otro experimento similar a los anteriores, con sapos en la condición Clave-Geometría (Figura 3b; con la arena rectangular y el panel rayado), pero agregando otro grupo de

sapos entrenados en paralelo con un panel rayado similar pero en una arena circular (Figura 3f). Un vez que los animales adquirían la respuesta, pasaron a la etapa de ensayos de prueba donde fueron cambiados de un tipo de arena a la otra (e.g., los entrenados en la arena rectangular pasaron a ser testeados en la arena circular, y viceversa). La idea en este caso era testear cómo se utilizaba la información adquirida en primer término luego del cambio de contexto; es decir, al cambiar de un ambiente entrenado con una clave y cierta geometría particular, a otro ambiente en apariencia similar pero donde la información geométrica había cambiado por completo (Sotelo, Bingman & Muzio, en preparación). En este sentido, en base a antecedentes registrados en otras especies de vertebrados, se considera que la geometría circular no es muy útil como clave navegacional dado que es completamente homogénea. Por ejemplo, estudios previos en ratones y peces indican que animales criados en ambientes circulares versus animales criados en ambientes rectangulares, muestran diferencias en las preferencias para orientarse al ser cambiados de entorno: los criados en un ambiente circular muestran una menor habilidad para localizar una meta en una arena

rectangular respecto de aquellos criados en un ambiente rectangular (Brown et al., 2007; Twyman et al., 2012). Los resultados que obtuvimos en sapos coinciden con esta visión general, ya que sólo existía una transferencia exitosa de la información adquirida cuando se pasaba de la arena rectangular a la arena circular (pero no a la inversa). De esta forma, parecería que esta es una característica conservada a nivel evolutivo.

***La pendiente del entorno como fuente de información para la orientación espacial.***

Estudios previos muestran que humanos, ratas, palomas y peces (Grobéty & Schenk, 1992; Holbrook & Burt de Perera, 2009; Holmes et al., 2015; Nardi & Bingman, 2009; Nardi et al., 2009) son capaces de navegar en un ambiente que posee una inclinación dada. Actualmente este paradigma es muy estudiado, dado que se ha identificado que todos los desplazamientos que realizamos en el ambiente la mayoría de los animales es tridimensional y, por lo tanto, es esencial analizar la codificación de información espacial tanto en el eje horizontal como en el vertical (Hayman et al., 2011). Algunos de los mencionados estudios de utilización de

pendiente comparan también el uso de este tipo de información con la información de geometría. Por ejemplo, en el caso de las palomas (Nardi & Bingman, 2009), se ha observado que son capaces de navegar utilizando ambos tipos de información, pero en presencia de un conflicto entre las mismas prefieren la información dada por la pendiente (es ese estudio, de 20° de inclinación). Para analizar esta cuestión en anfibios, en nuestro laboratorio utilizamos la arena rectangular sin presencia de claves visuales, pero con una pendiente de 5° de inclinación generada por la colocación de un suplemento base debajo de uno de los lados angostos de la arena experimental (Figura 3c; Sotelo et al., 2017). En esta condición de entorno rectangular inclinado entrenamos a los sapos para ubicar una recompensa. Luego de alcanzar la asíntota de adquisición de respuesta, se realizaron ensayos de prueba para testear cuál información (geometría o pendiente) preferían los animales ante una situación de conflicto. Los resultados indican que los sapos (a diferencia de las palomas) utilizaron preferentemente la geometría del contorno de la arena experimental cuando la información geométrica y de

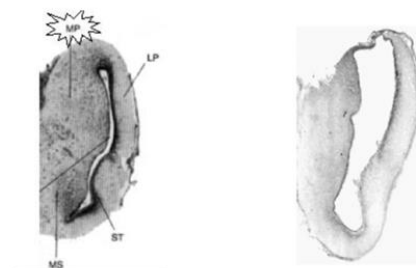
pendiente fue puesta en conflicto. Sin embargo, es importante destacar que la pendiente utilizada en el caso de los sapos fue menor a la que se usó en palomas (5° versus 20°), de manera que esta preferencia de los animales por la geometría podría deberse al bajo grado de inclinación administrado. Serán necesarios más experimentos futuros en sapos en una situación de mayor pendiente para dilucidar esta cuestión.

### **Bases neurales del Aprendizaje Espacial; Pallium Medial, la Formación Hipocampal de los Anfibios**

Una de las áreas cerebrales tradicionalmente asociada a la codificación de información espacial es el hipocampo (Bingman et al., 2017; O'Keefe & Nadel, 1978). En los distintos grupos de vertebrados las habilidades de aprendizaje espacial parecen estar asentadas en sustratos neurales homólogos: el *hipocampo* en aves y mamíferos, la *corteza medial* en reptiles y, de manera similar, el *pallium lateral* de peces -el presunto homólogo del hipocampo de amniotas- (Bingman & Muzio, 2017; González et al., 2017; López et al., 1999; Muzio, 1999, 2013; Salas et al., 2003).

Respecto de los anfibios, existe una hipótesis muy aceptada de que el *pallium medial* es homólogo a la formación hipocampal de otros tetrápodos, basado en la posición topográfica (cuadrante dorsomedial del telencéfalo), sus interconexiones neurales y en la información inmunoneurohistoquímica (ver por ejemplo, Northcutt & Ronan, 1992).

Para determinar la implicancia del *pallium medial* en el aprendizaje de tareas de orientación y navegación espacial se han realizado en nuestro laboratorio varios experimentos, aplicando tanto procedimientos de lesión como de medición de la actividad neural en esta área (Daneri, Casanave & Muzio, en preparación; Sotelo et al., 2016). En primer lugar, se llevó adelante un estudio donde se evaluaron los efectos de la lesión del *pallium medial* (Figura 4).

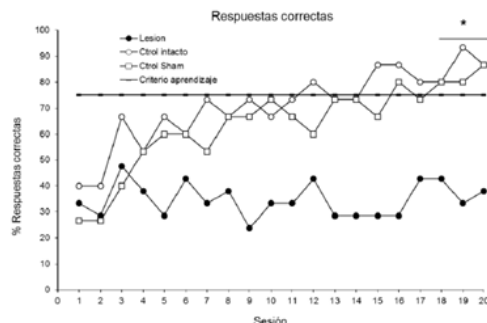


Fotografía de un corte del hemisferio izquierdo de encéfalo intacto de *Bufo arenarum* (Grupo Control) (x50) MP (pallium medial), LP (pallium lateral), ST (striatum) y MS (septum medial).

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.

**Figura 4.** Imágenes de una sección del hemisferio cerebral izquierdo a nivel medio del telencéfalo, intacto (izquierda) y lesionado por microaspiración en la zona del pallium medial (derecha).

En este caso, la tarea espacial consistió en el aprendizaje de una regla de orientación en un laberinto en cruz, donde los animales debían ubicar una pileta con agua localizada sólo en uno de los brazos del laberinto (Daneri, Casanave & Muzio, en preparación). Los resultados revelaron que los animales lesionados tenían una deficiencia en la adquisición del aprendizaje, ya que no lograron orientarse espacialmente como los animales de los grupos controles (intactos y sham –con operación simulada-). Es más, su desempeño no mejoró con el entrenamiento y se mantuvo en niveles azarosos (Figura 5).



**Figura 5.** Porcentaje de respuestas correctas. Los grupos Intacto y Sham se diferencian significativamente del grupo Lesión al

finalizar el entrenamiento de 20 sesiones. El asterisco indica diferencias significativas entre condiciones (\*:  $p < 0.05$ ).

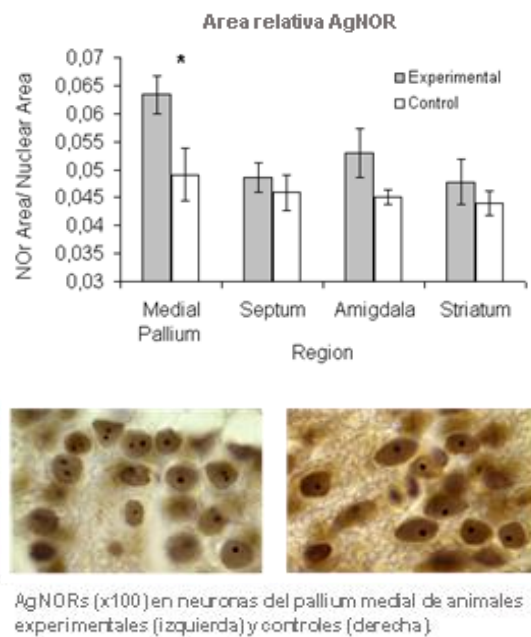
De esta manera, los resultados obtenidos aplicando la técnica de lesión cerebral sugieren que los animales sin un pallium medial funcional pierden la capacidad de orientarse en el espacio mediante una estrategia de giro y, por lo tanto, de anticipar la presencia de la recompensa en una determinada ubicación del espacio. Estudios comparativos en ratas con lesión hipocámpal han mostrado que estos animales siguen conservando la habilidad de orientarse por una respuesta de giro. En este caso, la repuesta de giro parecería ser independiente de la integridad del hipocampo (Kesner, Bolland & Davis, 1993; Packard & McGaugh, 1996). Así, a diferencia de lo que ocurre con el hipocampo de los mamíferos, nuestros resultados en anfibios indican que el pallium medial participa en la regulación de esta estrategia básica de orientación en el espacio. En conjunto, 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.

### **Técnicas de medición de actividad neural y estructuras cerebrales implicadas en la navegación espacial**

**Tinción histoquímica de AgNOR.** El aprendizaje espacial y el establecimiento de nuevas memorias generan cambios morfológicos en la región organizadora de los nucleolos (en inglés *NOR*) de las neuronas telencefálicas. Los nucleolos son estructuras que se encuentran dentro del núcleo de cada célula, encargados principalmente del ensamblado de ribosomas. Cuando una célula incrementa la síntesis de proteínas, los nucleolos aumentan su tamaño y pueden multiplicarse. Dado que el aprendizaje requiere una gran cantidad de nuevas proteínas, aquellas áreas cerebrales que han estado activas durante ese proceso de aprendizaje muestran neuronas con nucleolos de mayor tamaño o con doble nucleolo (Puddington & Muzio, 2016). Los componentes nucleolares contienen grupos de proteínas afines a la plata que pueden detectarse utilizando la técnica de tinción histoquímica AgNOR. Luego de la tinción, los NORs pueden ser fácilmente identificables como puntos negros localizados en el área nucleolar (Tere, 2000). La comparación

morfométrica de los nucléolos en distintas áreas cerebrales de animales que recibieron o no entrenamiento permite identificar áreas asociadas a un aprendizaje particular. Esta técnica se ha utilizado con éxito en estudios en peces, mamíferos y actualmente también en anfibios (Daneri, Casanave & Muzio, en preparación; Puddington, Daneri, Papini & Muzio, 2016).

Respecto del análisis de los mecanismos que codifican en anfibios el aprendizaje espacial, en nuestro laboratorio se realizó un estudio entrenando sapos en una arena circular transparente donde los animales tenían acceso a las claves visuales del ambiente y también a claves visuales intralaberinto para orientarse y localizar una recompensa (Daneri, Casanave & Muzio, en preparación). Luego de que alcanzaron el criterio de aprendizaje (75% de respuestas correctas) los animales fueron sacrificados y se evaluó posteriormente la actividad neural de distintas áreas cerebrales empleando la técnica de AgNOR. Los resultados mostraron que hubo una activación diferencial del pallium medial, ya que el área relativa de los NORs era significativamente mayor que en otras áreas cerebrales (Figura 6).



**Figura 6.** Izq: Area relativa de los NORs, aumentada en las neuronas de pallium medial de sapos entrenados en una tarea de orientación espacial. Este efecto no aparece en otras regiones como el septum, la amígdala y el striatum. Der: Neuronas del pallium medial de un animal entrenado (con mayor área relativa de AgNORs) y otro control. El asterisco indica diferencias significativas entre condiciones (\*:  $p < 0.05$ ).

#### ***Técnica inmunohistoquímica de c-Fos.***

Uno de los métodos ampliamente utilizado desde hace tiempo en distintos vertebrados para medir la activación específica de neuronas en distintas áreas cerebrales es la técnica inmunohistoquímica de genes de activación temprana (en inglés *IEG*), que se emplea en particular para revelar la presencia del factor de transcripción c-Fos (Ball & Gentner, 1998; Clayton, 1997; Mayer et al., 2016). Esta técnica

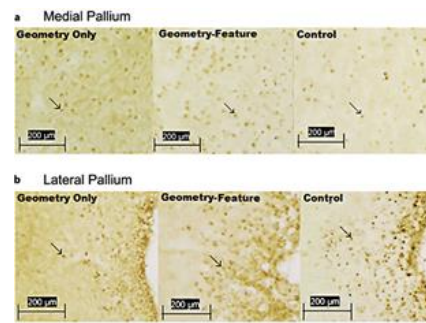
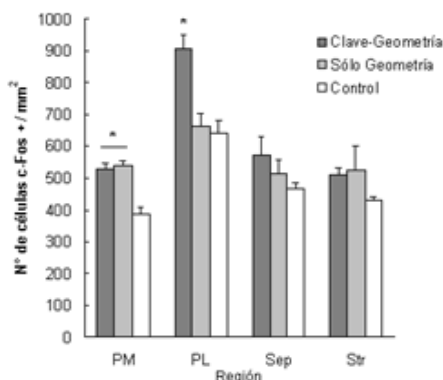
se aplica regularmente luego de tareas comportamentales diversas y se usa como indicador de actividad cerebral reciente debida al aprendizaje (Ball & Gentner, 1998; Clayton, 1997). c-Fos es un gen que codifica para un factor de transcripción (del mismo nombre) que regula la síntesis de proteínas asociada a procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular (Velázquez et al., 2015). En neurociencia se utiliza como indicador de actividad reciente en el tejido nervioso debida a un aumento en la recepción de estímulos asociados a conductas, mayormente aprendidas, y su pico óptimo de síntesis es luego de aproximadamente 90 minutos de ocurrido el evento estimulante o de aprendizaje. Básicamente, para realizar la técnica inmunohistoquímica de c-Fos se sacrifica a los animales, se extraen sus cerebros y se los corta en secciones para luego aplicarles anticuerpos (elaborados en distintas especies animales) que reconocen específicamente la proteína c-Fos. De esta manera se identifica la localización de c-Fos en el tejido nervioso y se procede a su cuantificación.

En nuestro laboratorio hemos puesto a punto esta técnica para poder aplicarla en anfibios (Daneri, Bingman & Muzio,



datos no publicados), utilizándose con éxito en cerebros del sapo terrestre *R. arenarum*. Uno de los primeros análisis efectuados con esta técnica en sapos fue la evaluación de la actividad neural asociada al aprendizaje espacial con información geométrica rectangular y claves visuales (Sotelo et al., 2016), utilizando para ello animales que habían tenido el entrenamiento descrito anteriormente (condiciones experimentales Sólo Geometría y Clave-Geometría).

Los resultados de la medición de neuronas marcadas con c-Fos indicaron que los sapos de ambos grupos entrenados (Sólo Geometría y Clave-Geometría) muestran una activación diferencial en el pallium medial respecto de un grupo control no entrenado (Figura 7).



**Figura 7.** Izq: Número de células c-Fos +/mm<sup>2</sup>, aumentada en las neuronas de pallium medial de los sapos entrenados con Sólo Geometría y Clave-Geometría en una tarea que aprendizaje espacial. También se ve un aumento de neuronas c-Fos + en el pallium lateral, pero sólo en animales del grupo Clave-Geometría. El asterisco indica diferencias significativas entre condiciones (\*:  $p < 0.05$ ). Der: Neuronas de pallium medial (arriba) y de pallium lateral (abajo) de sapos entrenados con Sólo Geometría, Clave-Geometría y Controles (no entrenados). Las flechas señalan núcleos c-Fos +. [Adaptado de Sotelo, Daneri, Bingman & Muzio, 2016].

En la Figura 7 también se puede observar un aumento de neuronas marcadas con c-Fos en el pallium lateral, pero sólo en los animales entrenados con geometría y claves visuales (probablemente asociado al procesamiento visual de esta región, aunque serán necesarios más estudios futuros para confirmar esta hipótesis). Las otras dos regiones analizadas (septum y striatum) no mostraron diferencias entre los grupos.

Finalmente, en la actualidad se están

procesando muestras cerebrales obtenidas en distintos experimentos de aprendizaje de geometría con varios tipos de claves visuales, así como del estudio realizado con claves sonoras en un laberinto en cruz, con el fin de analizar las áreas cerebrales comprometidas en estos tipos de aprendizaje (Sotelo, Bingman & Muzio, en preparación).

### **Conclusiones**

Este trabajo ha reunido el conjunto de procedimientos y dispositivos experimentales que se utilizan para el estudio de las habilidades espaciales en anfibios y sus bases neurales, describiendo algunos de los principales resultados obtenidos en un marco evolutivo.

Los dos principales dispositivos experimentales empleados han sido el laberinto en cruz y la arena rectangular. Esto se ha dado fundamentalmente pues con el primero se ha indagado acerca de los mecanismos que subyacen a estrategias egocéntricas (Daneri et al., 2011; Daneri, Casave & Muzio, 2015), mientras que con el segundo se ha analizado la información aportada por la geometría del entorno en combinación con otras fuentes de referencia para orientarse y navegar en un ambiente

(Sotelo et al., 2015, 2016, 2017).

Por ejemplo, los resultados derivados del uso del laberinto en cruz, han permitido comprender la naturaleza de la respuesta de giro en sapos y las diferencias en sus mecanismos neurales con ratas: los datos obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que en anfibios (a diferencia de los que sucede en mamíferos) la estrategia de giro depende de la existencia de una formación hipocampal funcional, el pallium medial (Daneri et al., 2011, 2015; Daneri, Casanave & Muzio, en preparación).

En cuanto a los resultados obtenidos en experimentos con la arena rectangular, los mismos permitieron asociar la información de la geometría de contorno a distintos tipos de claves ambientales. Entre otras, se utilizaron claves visuales (Sotelo et al., 2015), la pendiente de la arena (Sotelo et al., 2017) o estímulos sonoros (Sotelo, Bingman & Muzio, en preparación). El conjunto de estos estudios muestran en general que los sapos son capaces de utilizar muy variadas claves ambientales para navegar. En todos los escenarios descriptos, los animales fueron capaces de llegar al criterio de aprendizaje y se comprobó en los testeos cómo estaban utilizando las claves disponibles en cada

caso. A través de estos estudios se demostró que los sapos pueden navegar en el espacio usando: sólo geometría (de forma rectangular, como mínimo), una clave polarizante del ambiente (como el panel rayado), claves locales sobre la recompensa (Sotelo et al., 2015; Sotelo, Bingman & Muzio, en preparación; esto también se observó en una arena circular, Daneri et al., 2011), una pendiente de 5° en la arena experimental (Sotelo et al., 2017), el sonido de canto de un conoespecífico (Sotelo, Bingman & Muzio, en preparación).

Asimismo, se comprobó que en muchos casos los sapos codificaban mucha más información espacial de la estrictamente necesaria para localizar la recompensa. Es decir, información *redundante* del ambiente, como se demostró en los experimentos que combinaban geometría con otros tipos de información, o varios tipos de claves visuales simultáneas (Sotelo et al., 2015, 2017; Sotelo, Bingman & Muzio, en preparación). Cuando en los contextos estudiados se evaluaron de preferencias por distintos tipos de información, se observó que en general los sapos preferían guiarse por la información geométrica, aunque esto podría variar al aumentar la saliencia de

otros estímulos (como por ejemplo, de las claves visuales). Esta variación de preferencia también se ha visto en otros vertebrados y siempre parece ser dependiente, entre otros factores, de la saliencia de estímulos (Cheng et al., 2013; Rescorla & Wagner, 1972), las capacidades sensoriales (Sotelo & Muzio, 2015), y la edad o la experiencia previa (Cheng et al., 2013; Twyman et al., 2012).

En cuanto a los resultados obtenidos en los estudios de actividad cerebral asociada al aprendizaje espacial, haciendo la evaluación tanto por la técnica de AgNOR así como mediante la técnica de c-Fos, se ha observado que el Pallium Medial (i.e., la Formación Hipocampal de los anfibios) es la principal área telencefálica comprometida en la navegación espacial (Daneri, Casanave & Muzio, en preparación; Sotelo et al., 2016). Estos resultados no son demasiado sorprendentes, ya que coinciden con las evidencias obtenidas en los otros grupos de vertebrados estudiados (como peces, aves y mamíferos), donde la Formación Hipocampal es la región cerebral que procesa la mayor parte de la información relacionada con la cognición espacial (Bingman et al., 2006; Mayer et al., 2016; Tommasi et

al., 2003, 2012; Vargas et al., 2004, 2006).

Sin embargo, en nuestros estudios en sapos, tanto analizando la información de geometría combinada con distintas claves visuales (conspicuas y/o locales), así como evaluando la información auditiva (Sotelo et al., 2016; Sotelo, Bingman & Muzio, en preparación), obtuvimos algunos patrones diferenciales de activación cerebral entre distintas regiones del telencéfalo. En el primer caso, en la tarea que sólo involucró información de geometría (sin claves visuales) se activó únicamente el Pallium Medial (o Formación Hipocampal), mientras que en la tarea que incluyó geometría y claves visuales se observó la activación de otras áreas del palio (además del Pallium Medial), como ser el Pallium Lateral y, en menor medida, el Pallium Dorsal (Sotelo et al., 2016). Una interpretación de estos resultados, requeriría conocer alguno de los tipos de estímulos que pueden procesar estas regiones cuando en un contexto determinado existe información de una modalidad sensorial específica o combinaciones de varias modalidades. En términos neuroanatómicos, el Pallium Lateral y el Pallium Dorsal de los anfibios están asociados a la corteza olfatoria y

general, respectivamente, de los mamíferos (Moreno & González, 2004; Northcutt & Kicliter, 1980), con lo cual su activación parecería no tener mucha explicación en este contexto. En aves y mamíferos las tareas que involucran el procesamiento de claves visuales suelen activar áreas como el núcleo Estriado, entre otras (Mayer & Bischof, 2012; Packard et al., 1989; Shimizu et al., 2004). Sin embargo, estudios recientes (Ocaña et al., 2017) han encontrado un patrón similar de activación en el palio de Goldfish en una tarea de aprendizaje similar, con lo cual se especula que estas áreas del palio podrían también estar funcionando como cortezas accesorias de procesamiento (tal como la corteza entorrinal de los mamíferos). En el segundo caso, en la tarea que involucró el uso de información auditiva, se encontró también activación del Pallium Medial, pero no de las otras áreas del palio (de manera similar a lo observado en la condición de geometría sola). Y además, en este caso también estaba activado el área Septal (Sotelo, Bingman & Muzio, en preparación). Como se explicó previamente (ver apartado *El sonido como estímulo de orientación espacial*), la fuente de sonido empleada fue el canto de un macho conespecífico (dado que en el

sapo *R. arenarum* sólo cantan los machos). Estos cantos están asociados a la etapa reproductiva, razón por la cual la activación observada en el área Septal podría corresponderse con la presentación de dicho estímulo (relacionado al comportamiento reproductivo o de reconocimiento de un conoespecífico). Esta activación del Septum podría ser factible, ya que esta área recibe información auditiva vía los núcleos talámicos ventromediales y el torus semicircularis (Neary, 1988; Roden et al., 2005; Wilczynski & Endepols, 2007). Sin embargo, para corroborar esta hipótesis se deberían realizar estudios adicionales empleando técnicas de rastreo de vías neuronales.

**Comentarios finales.** El conjunto de estudios sobre orientación y aprendizaje espacial realizados en nuestro laboratorio con el sapo terrestre *Rhinella arenarum* demuestra que estos animales son capaces de codificar variados tipos de información sensorial proveniente de distintas fuentes

ambientales, y luego utilizarla diferencialmente según su necesidad o preferencia. Nuestros resultados sugieren además que estos animales tienen complejos comportamientos de navegación, compartidos en gran medida con otros grupos de vertebrados (en general, dentro de los tetrápodos terrestres). Los datos funcionales presentados sobre la cognición espacial en sapos sugiere la presencia de un mecanismo cerebral basado principalmente en la activación de regiones telencefálicas del pallium medial (la Formación Hipocampal de los anfibios).

Finalmente, teniendo en cuenta toda la información acumulada hasta el momento en el modelo experimental de los anfibios, podemos concluir que, aunque con algunos detalles, los mecanismos que subyacen a la cognición espacial en los vertebrados tetrápodos en términos generales han sido conservados a lo largo de la evolución.

## Referencias

- Ball, G. F., & Gentner, T. Q. (1998). They're playing our song: gene expression and birdsong perception. *Neuron*, 21, 271-274.
- Bingman, V. P., & Muzio, R. N. (2017). Reflections on the Structural-Functional Evolution of the Hippocampus: What is the Big Deal about a Dentate Gyrus?

*Brain, Behavior and Evolution*, 90, 53-61.

- Bingman, V. P., Erichsen, J. T., Anderson, J. D., Good, M. A., & Pearce, J. M. (2006). Spared feature-structure discrimination but diminished salience of environmental geometry in hippocampal lesioned homing pigeons (*Columba livia*). *Behavioral Neuroscience*, 120, 835-841.
- Bingman, V. P., Rodríguez, F., & Salas, C. (2017). The hippocampus in nonmammalian vertebrates. En: Kaas J (ed). *Evolution of Nervous Systems*. Oxford, Academic Press, pp 479-489.
- Brattstrom, B. H. (1990). Maze learning in the fire-bellied toad, *Bombina orientalis*. *Journal of Herpetology*, 24 (1), 44-47.
- Brown, A. A., Spetch, M. L., & Hurd, P. L. (2007). Growing in circles: Rearing environment alters spatial navigation in fish. *Psychological Science*, 18, 569-573.
- Cheng, K. (1986). A purely geometric module in the rat's spatial representation. *Cognition*, 23, 149-178.
- Cheng, K., & Newcombe, N. S. (2005). Is there a geometric module for spatial orientation? Squaring theory and evidence. *Psychonomic Bulletin & Review*, 12, 1-23.
- Cheng, K., Huttenlocher, J., & Newcombe, N. S. (2013). 25 years on research on the use of geometry in spatial orientation: a current theoretical perspective. *Psychonomic Bulletin and Review*, 20, 1033-1054.
- Clayton, D. F. (1997). Role of gene regulation in song circuit development and song learning. *Journal of Neurobiology*, 33, 549-571.
- Daneri, M. F., & Muzio, R. N. (2013). El aprendizaje espacial y su relevancia en anfibios. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 5(3), 38-49.
- Daneri, M. F., Casanave, E. B., & Muzio, R. N. (2011). Control of spatial orientation in terrestrial toads (*Rhinella arenarum*). *Journal of Comparative Psychology*, 125(3), 296-307.
- Daneri, M. F., Casanave, E. B., & Muzio, R. N. (2015). Use of local visual landmarks for spatial orientation in toads (*Rhinella arenarum*): The role of distance to a goal. *Journal of Comparative Psychology*, 129(3), 247-255.
- González, A., López, J. M., Morona, R., & Moreno, N. (2017). The organization of the amphibian central nervous system. En; *Evolution of the nervous systems*. 2nd Ed. Elsevier.

- Greding, E. J. (1971). Comparative rates of learning in frogs (Ranidae) and toads (Bufonidae). *Caribbean Journal of Science*, 11 (3-4), 203-208.
- Grobéty, M. C., & Schenk, F. (1992). Spatial learning in a three-dimensional maze. *Animal Behaviour*, 43, 1011-1020.
- Hayman, R., Verriotis, M. A., Jovalekic, A., Fenton, A. A., & Jeffery, K. J. (2011). Anisotropic encoding of three-dimensional space by place cells and grid cells. *Nature Neuroscience*, 14, 1182-1188.
- Holbrook, R., & Burt de Perera, T. (2009). Separate encoding of vertical and horizontal components of space during orientation in fish. *Animal Behaviour*, 78, 241-245.
- Holmes, C. A., Nardi, D., Newcombe, N. S., & Weisberg, S. M. (2015). Children's use of slope to guide navigation: Sex differences relate to spontaneous slope perception. *Spatial Cognition and Computation*, 15, 170-185.
- Ingle, D., & Sahagian, D. (1973). Solution of a spatial constancy problem by goldfish. *Physiological Psychology*, 1, 83-84.
- Kesner, R. P., Bolland, B. L., & Davis, M. (1993). Memory of spatial location, motor responses and objects: Triple dissociation among the hippocampus, caudate nucleus and extrastriate visual cortex. *Experimental Brain Research*, 93, 462-470.
- Lee, S. A., Sovrano, V. A., & Spelke, E. S. (2012). Navigation as a source of geometric knowledge: Young children's use of length, angle, distance, and direction in a reorientation task. *Cognition*, 123, 144-161.
- López, J. C., Broglio, C., Rodríguez, F., Thinus-Blanc, C., & Salas, C. (1999). Multiple spatial learning strategies in goldfish (*Carassius auratus*). *Animal Cognition*, 2, 109-120.
- Mayer, U., & Bischof, H. J. (2012). Brain activation pattern depends on the strategy chosen by zebra finches to solve an orientation task. *Journal of Experimental Biology*, 215, 426-434.
- Mayer, U., Pecchia, T., Bingman, V. P., Flore, M., & Vallortigara, G. (2016). Hippocampus and medial striatum dissociation during goal navigation by geometry or features in the domestic chick: an immediate early gene study. *Hippocampus*, 26, 27-40.
- Moreno, N., & González, A. (2004). Localization and Connectivity of the Lateral Amygdala in Anuran Amphibians. *The Journal of Comparative Neurology*, 479, 130-148.

- Muzio, R. N. (1999). Aprendizaje instrumental en anfibios. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 31(1), 35-47.
- Muzio, R. N. (2013). Aprendizaje en anfibios, el eslabón perdido: Un modelo simple cerebral en el estudio de conductas complejas. *Cuadernos de Herpetología*, 27(2), 87-100.
- Muzio, R. N., Daneri, M. F., & Sotelo, M. I. (2018). Aprendizaje y Memoria Espacial en Anfibios. En; *Estudios en Cognición Comparada* (Cap. 4). Ed. Quartuppi, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. En prensa.
- Nardi, D., & Bingman, V. P. (2009). Pigeon (*Columba livia*) encoding of a goal location: The relative importance of shape geometry and slope information. *Journal of Comparative Psychology*, 123, 204-216.
- Nardi, D., Funk, A. Y., Newcombe, N. S., & Shipley, T. F. (2009). Reorientation by slope cues in humans. *Cognitive Processing*, 10, 260-262.
- Neary, T. J. (1988). Forebrain auditory pathways in ranid frogs. En: Fritsch B, Ryan MJ, Wilczynski W, Hetherington TE, and Walkowiak W (eds). *The Evolution of the Amphibian Auditory System*. New York: Wiley, pp. 233-252.
- Northcutt, R. G., & Ronan, M. (1992). Afferent and efferent connections of the bullfrog medial pallium. *Brain, Behavior and Evolution*, 40, 1-16.
- Northcutt, R. G., & Kicliter, E. (1980). Organization of the amphibian telencephalon. En: *Comparative neurology of the telencephalon* (S. O. E. Ebbesson, ed.), pp. 203-255. Plenum: New York.
- Ocaña, F. M., Uceda, S., & Rodríguez, F. (2017). Dynamics of Goldfish subregional Hippocampal Pallium activity throughout spatial memory formation. *Brain, Behavior and Evolution*, 90, 154-170.
- O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive map*. Clarendon Press: Oxford.
- Packard, M. G., & McGaugh, J. L. (1996). Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65, 65-72.
- Packard, M. G., Hirsh, R., & White, N. M. (1989). Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *Journal of Neuroscience*, 9, 1465-1472.



- Pearce, J. M., Good, M. A., Jones, P. M., & McGregor, A. (2004). Transfer of spatial behavior between different environments: Implications for theories of spatial learning and for the role of the hippocampus in spatial learning. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *30*(2), 135-147.
- Pearce, J. M., Graham, M., Good, M. A., Jones, P. M., & McGregor, A. (2006). Potentiation, overshadowing, and blocking of spatial learning based on the shape of the environment. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *32*(3), 201-214.
- Puddington, M. M., & Muzio, R. N. (2016). Relación entre conducta y activación de áreas cerebrales. Empleo de la técnica de AgNOR en psicología comparada. *Interdisciplinaria*, *33*(1), 1-13.
- Puddington, M. M., Daneri, M. F., Papini, M. R., & Muzio, R. N. (2016). Telencephalic Neural activation after passive avoidance learning in the terrestrial toad *Rhinella arenarum*. *Behavioural Brain Research*, *315*, 75-82.
- Rescorla, R. A., & Wagner, A. R. (1972). A theory of pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. En: A. H. Black & W. F. Prokasy (Eds.). *Classical conditioning II: Current theory and research* (pp. 64-99). New York: Appleton-Century-Crofts.
- Roden, K., Endepols, H., & Walkowiak, W. (2005). Hodological characterization of the septum in anuran amphibians: I. Afferent connections. *Journal of Comparative Neurology*, *483*, 415-436.
- Salas, C., Broglio, C., & Rodríguez, F. (2003). Evolution of forebrain and spatial cognition in vertebrates: Conservation across diversity. *Brain, Behavior and Evolution*, *62*, 72-82.
- Shimizu, T., Bowers, A. N., Budzynski, C. A., Kahn, M.C., & Bingman, V. P. (2004). What does a pigeon (*Columba livia*) brain look like during homing? Selective examination of ZENK expression. *Behavioral Neuroscience*, *118*, 845-851.
- Sotelo, M. I., & Muzio, R. N. (2015). Aprendizaje Espacial y Geometría. Los Anfibios en la Evolución de los Sistemas Cognitivos Cerebrales. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, *7*(3), 64-78.
- Sotelo, M. I., Bingman, V. P., & Muzio, R. N. (2015). Goal orientation by geometric and feature cues: spatial learning in the terrestrial toad *Rhinella arenarum*. *Animal Cognition*, *18*(1), 315-323.

- Sotelo, M. I., Bingman, V. P., & Muzio, R. N. (2017). Slope-based and geometric encoding of a goal location by the terrestrial toad (*Rhinella arenarum*). *Journal of Comparative Psychology*, 131(4), 362-369.
- Sotelo, M. I., Bingman, V. P., & Muzio, R. N. Transfer of spatial learning between geometrically different shaped environments in the terrestrial toad, *Rhinella arenarum*. Enviado para su publicación en el *Journal of Experimental Psychology: Animal Learning and Cognition*.
- Sotelo, M. I., Daneri, M. F., Bingman, V. P., & Muzio, R. N. (2016). Telencephalic neuronal activation associated with spatial memory in the terrestrial toad, *Rhinella arenarum*: Participation of the medial pallium in navigation by geometry. *Brain, Behavior and Evolution*, 88, 149-160.
- Spelke, E. S., Lee, S. A., & Izard, V. (2010). Beyond core knowledge: Natural geometry. *Cognitive Science*, 34, 863-884.
- Sutton, J. E. (2009). What is geometric information and how do animals use it? *Behavioural Processes*, 80, 339-343.
- Tommasi, L., Chiandetti, C., Pecchia, T., Sovrano, V. A., & Vallortigara, G. (2012). From natural geometry to spatial cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 799-824.
- Tommasi, L., Gagliardo, A., Andrew, R. J., & Vallortigara, G. (2003). Separate processing mechanisms for encoding of geometric and landmark information in the avian hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 17, 1695-1702.
- Trere, D. (2000). AgNOR staining and quantification. *Micron*, 31(2), 127-131.
- Twyman, A. D., Newcombe, N. S., & Gould, T. G. (2012). Malleability in the development of spatial reorientation. *Developmental Psychobiology*, 3, 243-255.
- Vargas, J. P., Bingman, V. P., Portavella, M., & López, J. C. (2006). Telencephalon and geometric space in goldfish. *European Journal of Neuroscience*, 24, 2870-2878.
- Vargas, J. P., López, J. C., Salas, C., & Thinus-Blanc, C. (2004). Encoding of geometrical and featural spatial information by goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Comparative Psychology*, 118, 206-216.
- Velázquez, F. N., Prucca, C. G., Etienne, O., D'Astolfo, D. S., Silvestre, D. C., Boussin, F. D., & Caputto, B. L. (2015). Brain development is impaired in c-Fos -/- mice. *Oncotarget*, 6, 16883-16901.
- Wells, K. D. (1977). The social behavior of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, 25,

666-693.

Wilczynski, W. W., & Capranica, R. R. (1984). The auditory system of anuran amphibians. *Progress in Neurobiology*, 22, 1-38

Wilczynski W., & Endepols H. (2007). Central Auditory Pathways in Anuran Amphibians: The Anatomical Basis of Hearing and Sound Communication. En: Narins P.M., Feng A.S., Fay R.R., Popper A.N. (eds). *Hearing and Sound Communication in Amphibians*. Springer Handbook of Auditory Research, vol 28. Springer, New York, NY.

Wilczynski, W. W., Zakon, H. H., & Brenowitz, E. A. (1984). Acoustic communication in spring peepers. Call characteristics and neurophysiological aspects. *Journal of Comparative Physiology A*, 155, 577-584.

VERSIÓN PRE-PRINT