

Tesis Doctoral

Variación del intercambio hidrosalino en el sapo *Rhinella arenarum* modulado por distintos mecanismos fisiológicos y su relación con el aprendizaje instrumental

Iurman, Mariana Gabriela

2013-08-28

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

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

Cita tipo APA:

Iurman, Mariana Gabriela. (2013-08-28). Variación del intercambio hidrosalino en el sapo *Rhinella arenarum* modulado por distintos mecanismos fisiológicos y su relación con el aprendizaje instrumental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Iurman, Mariana Gabriela. "Variación del intercambio hidrosalino en el sapo *Rhinella arenarum* modulado por distintos mecanismos fisiológicos y su relación con el aprendizaje instrumental". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-08-28.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Variación del intercambio hidrosalino en el sapo *Rhinella arenarum* modulado por distintos mecanismos fisiológicos y su relación con el aprendizaje instrumental

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

Mariana Gabriela Iurman

Director de tesis: Dr. Rubén Néstor Muzio

Consejero de Estudios: Dr. Juan Carlos Rebores

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

Buenos Aires, Agosto 2013



Ejemplar adulto de Rhinella (=Bufo) arenarum

Agradecimientos

La realización de esta tesis ha sido un camino largo y complicado, hubo risas, llantos, enojos, alegrías, peleas y todos los sentimientos imaginables e inimaginables, en el cual muchas personas estuvieron involucradas y a las cuales les quiero agradecer:

- A Rubén Muzio, por abrirme las puertas de su laboratorio, por hacerme científicamente independiente, por bancarme el “todo a último momento” y permitirme cambiar el rumbo cuando lo necesitaba.

- A Martín Puddington por ser el mejor compañero de laboratorio que pude tener y mi amigo, su apoyo en el día a día y claridad para mostrarme cuando estaba equivocada, por recorrer este camino en el cual crecimos juntos y por todos los viajes a buscar sapos que hicimos, encontrando en Chascomus el mejor lugar.

- A Esteban Cynowiec, por guiarme ayudarme y aguantarme durante todo este proceso. por creer siempre en que lo lograría. Por estar a mi lado.

- A Claudia Marro, por brindarme tus consejos y amistad cuando más lo necesitaba, por ser el refugio y por ayudarme siempre.

- A Florencia Daneri, por ser mi amiga desde el primer día que entré al laboratorio, por su paciencia al enseñarme como funcionaba todo en el laboratorio y por estar presente aun estando lejos.

- Al Dr. Enrique Segura, *in memoriam*, por la frase que marco mi doctorado “Los sapos no colaboran”, por las charlas y por enseñarme a reconocer al pasado para entender quienes somos.

- A Silvano Zanutto, por ayudarme y escucharme cuando lo necesité, por tratar de integrarnos y por promover las mejores fiestas de fin de año.

- A todos mis compañeros de laboratorio, los que todavía están y los que se fueron, porque de cada uno aprendí algo.

- A Ezio (mi papá), Cristina (mi mamá) y a Maximiliano (mi hermano) por su apoyo incondicional, por guiarme en la vida y por enseñarme con su ejemplo.

- A Natalia Caporale, Ana María Vazquez y Nicolás Caporale, por apoyarme en todo momento.

- A mis amigos del cuarto piso, porque me mostraron que mis sentimientos por el doctorado, en mayor o menor medida, eran compartidos.

- A CONICET, por financiar esta tesis de doctorado.

- Al IByME y todo su personal por darme el lugar para realizar mi tesis y hacerme sentir parte.

- A la FCEN - UBA por darme accesos a una educación pública, gratuita y de alta calidad.

- A Otsuka Pharmaceutical por su donación del antagonista de AVT - OPC 31260 -

GRACIAS A TODOS POR HACERME UNA MEJOR PERSONA

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
Aprendizaje en anfibios	3
Biología de los anfibios	6
Los anfibios y su relación con el agua	6
Mecanismos reguladores del balance hidrosalino	7
Estudios sobre la biología y las relaciones con el agua de <i>Rhinella arenarum</i>	8
OBJETIVOS	10
SERIE EXPERIMENTAL 1	10
Estudio del comportamiento de discriminación de refuerzos	10
Experimento 1: Discriminación de posición utilizando un refuerzo apetitivo	11
Experimento 2: Estudio de discriminación utilizando como estímulo diferentes soluciones salinas	18
SERIE EXPERIMENTAL 2	25
Estudio de los mecanismos de membrana reguladores del intercambio iónico	25
Experimento 3: Efectos de la exposición aguda a amilorida sobre la captación de agua a diferentes niveles de hidratación en el sapo común en una solución isosmótica	26
Experimento 4: Efectos de la exposición aguda a amilorida sobre la captación de agua a diferentes niveles de hidratación del sapo común en una solución levemente hiperosmótica	29
Experimento 5: Efectos de la exposición aguda a benzamil sobre la captación de agua a diferentes niveles de hidratación del sapo común en una solución isosmótica	33

SERIE EXPERIMENTAL 3	35
Estudio de los mecanismos hormonales reguladores del intercambio iónico	35
Experimento 6: Efecto de la administración de un antagonista de AVT –OPC31260- sobre la captación de agua a diferentes niveles de deshidratación en una solución isosmótica	37
Experimento 7: Efecto de la administración de un antagonista de AVT -OPC31260- sobre el intercambio hidrosalino a diferentes niveles de deshidratación en una solución levemente hiperosmótica	39
Experimento 8: Efecto de la administración crónica de un antagonista de AVT -OPC31260- sobre la captación de agua en un estado de deshidratación elevado en una solución isosmótica	41
SERIE EXPERIMENTAL 4	43
Estudio de los mecanismos nerviosos reguladores del intercambio iónico y acuoso	43
Experimento 9: Efectos de la administración de Atropina (anticolinérgico) sobre la captación de agua a diferentes niveles de hidratación en una solución isosmótica	44
Experimento 10: Efectos de la administración de Atropina sobre la captación de agua a diferentes niveles de hidratación del sapo común en una solución levemente hipertónica	47
DISCUSIÓN GENERAL	49
Aprendizaje y Comportamiento	49
Fisiología de la variación de peso	51
CONCLUSIONES GENERALES	53
BIBLIOGRAFÍA	55

Publicación surgida a partir de datos incluidos en esta Tesis Doctoral:

Muzio, R. N., Pistone Creydt, V., **Iurman, M. G.**, Rinaldi, M. Sirani, B., y Papini, M. R. (2011). Incentive or Habit Learning in Amphibians? PLoS One 6(11): e25798. DOI: 10.1371/journal.pone.0025798.

En preparación:

Iurman, M. G. & Muzio, R. N. Adaptive control of the water economy in the toad, *Rhinella arenarum*. Effects of skin Na⁺ channel blockage and V2 AVT-receptor blockage in toads exposed to several dehydration levels and cutaneous osmotic stress.

Iurman, M. G. & Muzio, R. N. A potential new type of reinforcer in the terrestrial toad *Rhinella arenarum* using anticholinergic agents with NaCl hyperosmotic external solutions.

Variación del intercambio hidrosalino en el sapo *Rhinella arenarum* modulado por distintos mecanismos fisiológicos y su relación con el aprendizaje instrumental

Mariana Gabriela Iurman

RESUMEN

En el desarrollo de esta tesis se estudió la manipulación de diferentes mecanismos fisiológicos implicados en la captación o pérdida de agua del sapo común *Rhinella arenarum* con el fin de encontrar diferentes reforzadores que pudieran ser aplicados en protocolos de aprendizaje instrumental. En primer lugar, se verificó que los sapos aprenden a encontrar agua deionizada (reforzador apetitivo) localizada en una posición fija con respecto a su cuerpo (a la derecha o a la izquierda) y que dependiendo de la osmolaridad externa de la solución ésta puede ser aversiva (pierden peso), neutra (no ganan ni pierden peso) o apetitiva (ganan peso) produciendo cambios en el comportamiento de animales parcialmente deshidratados (alejamiento, cuando están expuestos a una solución aversiva, y acercamiento, cuando está presente una solución apetitiva). Luego, se comenzó con el estudio de los mecanismos de transporte de membrana (canales de sodio sensibles a amilorida), hormonales (arginina- vasotocina -AVT-) y nerviosos (vías colinérgicas) que podrían estar involucrados en la variación de peso de los individuos. El bloqueo de los canales de sodio, mediante amilorida, produjo una disminución de la captación de agua y de la permeabilidad de la piel. En contraste, el bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos, mediante atropina, aumentó la captación de agua y la permeabilidad de la piel. Este último efecto se contrapone con el efecto encontrado cuando se bloquean los receptores β adrenérgicos, sobre la base de estudios previos obtenidos en nuestro laboratorio. De esta manera, se describe por primera vez, in vivo, en esta situación la participación de las vías colinérgicas y su antagonismo con las vías adrenérgicas en anfibios. No se encontró efecto de AVT sobre la variación de peso. Es más, ninguna de las drogas utilizadas produce cambios en la permeabilidad o en la pérdida de agua cuando los individuos están expuestos a una solución neutra de 300mM de cloruro de sodio. Esto último indicaría que los mecanismos involucrados en la captación de agua son diferentes a los de preservación de la misma. Globalmente, los resultados de esta tesis nos permiten ahora estar en condiciones de encarar a futuro experimentos de aprendizaje (considerando la situación estándar de los protocolos de entrenamiento en sapos) utilizando soluciones salinas y manipulando los mecanismos colinérgicos asociados de intercambio hidrosalino. De esta forma, la utilización de estos nuevos conocimientos ampliarán las posibilidades de entender la dinámica del balance hidrosalino en anfibios en situaciones de aprendizaje.

Palabras Clave: *Rhinella arenarum*, aprendizaje instrumental, AVT, amilorida, atropina, permeabilidad de la piel

Variation of the exchange of water and ions in the toad *Rhinella arenarum* modulated by different physiological mechanisms and their relationship to instrumental learning

Mariana Gabriela Iurman

ABSTRACT

In this thesis we manipulated different physiological mechanisms involved in the uptake or loss of water in the common toad *Rhinella arenarum* to identify reinforcers that could be used in instrumental learning protocols. First, we verified that toads could learn to find deionized water (appetitive reinforcer) located at a fixed position with respect to their body (right or left). Depending on osmolarity, this solution was found to be behaviorally aversive (they lose weight), neutral (they neither gain nor lose weight) or appetitive (they gain weight) to the partially dehydrated animal. Specifically, animals moved away from the aversive solution and moved towards the appetitive solution. Second, we studied the membrane transport (amiloride-sensitive sodium channels), hormonal (arginine vasotocin -AVT-) and neural mechanism (cholinergic) that could be involved in the variation in weight of the individual. The blockade of sodium channels with amiloride resulted in decreased water uptake and permeability of the skin. In contrast, blockade of muscarinic cholinergic receptors increased water uptake and permeability of the skin. This latter effect contrasts with the results previously seen in our lab when blocking beta adrenergic receptors. Thus, the work presented in this thesis is the first description, in amphibians, of the participation of the cholinergic pathways in this behavior and their antagonism with the adrenergic pathways. There was no effect of AVT on weight change. Moreover, none of the drugs used produced changes in the permeability or water loss when individuals were exposed to a solution of 300 mM sodium chloride. The latter suggest that the mechanisms involved in the uptake of water are different from those involved in its preservation. Overall, the results of this thesis allow us to now be able to address future learning experiments (considering the state standard training protocols in toads) using salt solutions and manipulating cholinergic mechanisms associated with water and ions exchange. Thus, the use of this new knowledge expands the possibilities of understanding the dynamics of the water balance in amphibians learning situations.

Keywords: *Rhinella arenarum*, instrumental learning, AVT, amiloride, atropine, skin permeability

INTRODUCCIÓN GENERAL

Aprendizaje en anfibios

En general, las capacidades cognitivas de los anfibios, en particular el aprendizaje y las bases neurológicas y fisiológicas que lo modulan, han sido pobremente estudiadas en comparación con otras clases de vertebrados (peces, aves y mamíferos).

Desde hace más de 30 años en nuestro laboratorio se han desarrollado diferentes metodologías con el fin de evaluar comportamentalmente y fisiológicamente los mecanismos por los cuales los sapos *Rhinella arenarum* (= *Bufo arenarum*) adquieren, procesan, guardan y actúan de acuerdo a la información ambiental, es decir estudiando la su cognición (Shettleworth 2001). Esto incluye la percepción, la memoria, la toma de decisiones y el aprendizaje (Segura *et al.* 1967, Segura 1969, Schmajuk y Segura 1982, Muzio *et al.* 1992, Daneri *et al.* 2007).

Específicamente en relación al aprendizaje, las situaciones experimentales desarrolladas para su estudio, podrían considerarse como arreglos particulares de contingencias entre eventos. A los animales se los expone a una combinación particular de contingencias y se observan

los cambios en su comportamiento; si estos cambios ocurren y pueden ser atribuidos a la exposición a la contingencia entonces se puede inferir que aprendieron (Mackintosh 1974).

Los primeros registros de aprendizaje instrumental en sapo común fueron publicados por Schmajuk y colaboradores en 1980. En dicho experimento los animales parcialmente deshidratados (78% de su peso) debían recorrer un corredor recto, para encontrar en el compartimento, meta del mismo unas gotas de agua destilada (reforzador apetitivo). Con el paso de los ensayos, los sapos realizaban la tarea más rápidamente, mostrando de esta manera su capacidad de aprendizaje. Al finalizar esta etapa, se omitía el refuerzo comenzando con la etapa de extinción del comportamiento. Al cabo de dos días, los animales mostraban un tiempo de recorrido similar a cuando no habían aprendido, mostrando de esta manera la extinción del mismo.

Este procedimiento luego fue mejorado introduciendo en el compartimento meta un recipiente con agua, donde los animales podían sumergir parcialmente el cuerpo. Además, se ampliaron los parámetros estudiados: desempeño en el primer ensayo de cada sesión, desempeño a lo largo de los ensayos dentro de cada sesión (tanto durante la adquisición como durante la extinción) y la captación de agua durante la adquisición. A partir del registro de la captación de agua se pudo analizar el consumo en cada sesión y a lo largo del entrenamiento. Los datos mostraron que durante la adquisición

estos animales (deshidratados al 80% de su peso estándar) consumían entre 1 y 2 % de su peso por ensayo, y desarrollarían una tendencia al aumento de la captación de agua a medida que transcurrían los ensayos (Muzio *et al.* 1992). Mediante este mismo procedimiento, también se estudió el efecto de la lesión del *pallium medial* (región homóloga al hipocampo de mamíferos) sobre el aprendizaje. Los resultados mostraron que la adquisición y la captación de agua no fueron afectadas, pero sí hubo un retraso en la extinción del aprendizaje, sugiriendo que dicha área estaría involucrada en el aprendizaje de nuevas situaciones (Muzio *et al.* 1993).

Con estos antecedentes se comenzó el estudio sistemático de los fenómenos del aprendizaje basados en la adaptación de los animales frente a cambios en las condiciones de refuerzo. En líneas generales, estas situaciones implican evaluar el efecto de diferentes magnitudes y programas de refuerzo durante: (i) la adquisición, (ii) la resistencia a la extinción, (iii) la adaptación a cambios en la magnitud o calidad del refuerzo (Amsel y Stanton 1980).

Dentro de los fenómenos del aprendizaje, el efecto del reforzamiento parcial en la extinción, (mayor resistencia a la extinción luego de un reforzamiento parcial que después de uno continuo) fue estudiado sistemáticamente en individuos parcialmente deshidratados (80% del peso estándar) variando los siguientes parámetros:

1) Tipo de reforzamiento parcial: 50% de los ensayos no reforzados, o reforzados

con soluciones neutras (300mM de cloruro de sodio (NaCl)) o aversivas (800mM de NaCl) y el 50% de los ensayos restantes siempre con refuerzo positivo de agua deionizada;

2) Tiempo entre ensayos: se utilizó 24hs, 24hs vs 48hs y 15s vs 300s en 5 ensayos por día;

3) Tiempo de refuerzo: 20s, 80s, 300s, 320s, 600s y 1280s. (Muzio *et al.* 1992, 1994, 2006, 2011)

Los resultados generales mostraron que los animales reforzados parcialmente tienen durante la adquisición un menor desempeño que aquellos que son reforzados continuamente. Además, no se encontraron diferencias en la extinción entre los grupos o una extinción más rápida en el grupo parcialmente reforzado. En cuanto a la variación en la captación de agua se encontró que no hay diferencias entre los grupos y que ésta aumenta a través de la adquisición. Es importante señalar que el reforzador apetitivo utilizado en todos estos experimentos fue agua deionizada, con excepción de un experimento donde el reforzamiento parcial fue realizado con soluciones salinas (Muzio *et al.* 2011).

Otra serie de experimentos realizados involucraron el cambio en la magnitud del refuerzo, ya sea a fin de estudiar el *efecto de contraste negativo sucesivo* (menor desempeño luego del cambio de un refuerzo grande a uno pequeño, comparado con un grupo que siempre recibe refuerzo pequeño) o el *efecto de la magnitud del refuerzo en la extinción* (extinción más rápida después de un entrenamiento con

un refuerzo grande que con uno pequeño) (Muzio *et al.* 1992, Papini *et al.* 1995).

En términos generales, la magnitud del reforzador fue cambiada mediante la cantidad de agua destilada que se les proporcionaba para consumir (1 ml o 4 gotas de agua destilada) o el tiempo de exposición a agua deionizada (20s, 80s, 300s, 320s, 600s, o 1280s). Globalmente, los resultados indican que los animales que reciben un refuerzo mayor (los cuales captan mayor cantidad de agua) tienen un mejor desempeño en comparación con los animales que reciben menor refuerzo. No se encontraron los efectos de contraste negativo ni diferencias en la extinción entre los grupos en los sapos. (Schmajuk *et al.* 1981, Muzio *et al.* 1992, Papini *et al.* 1995).

El efecto de contraste negativo sucesivo también fue estudiado cambiando la calidad del refuerzo en vez de cambiar la magnitud del mismo. La modificación de la calidad del refuerzo se llevó a cabo mediante el cambio en la osmolaridad de las soluciones externas a las cuales se exponía a los individuos. En estudios previos mostraron que la concentración plasmática de los sapos es 245 mOsm/Kg, la cuál es isotónica con una solución externa de 115 mM de cloruro de sodio (Reboreda *et al.* 1991). La variación de peso que experimentan los anfibios cuando se varia la osmolaridad externa desde 0 (agua deionizada) a 1000mM de NaCl fue estudiada en individuos parcialmente deshidratados, dando como resultado que los animales expuestos a concentraciones iguales o mayores a 400 mM pierden peso,

o sea, se deshidratan. Entre 0 y 200 mM ganan peso, mientras que entre 250 mM y 350 mM no ganan ni pierden peso (Loza Coll y Muzio, en preparación). Teniendo en cuenta estos datos fisiológicos y con el objetivo de estudiar el efecto de contraste negativo sucesivo consumatorio, los animales fueron asignados a un grupo Experimental, que recibía un refuerzo de mayor calidad (agua deionizada) y luego se cambiaba a un refuerzo de menor calidad (225, 212 o 200 mM de NaCl), o a un grupo Control que siempre recibía una menor calidad de refuerzo (225, 212 o 200 mM de NaCl, según corresponda). Los resultados indicaron que los individuos que recibieron una menor calidad de refuerzo comienzan no ganando ni perdiendo peso, aunque a medida que transcurren las sesiones empiezan a captar agua. Sin embargo, no se pudo evidenciar contraste negativo sucesivo (Muzio *et al.* 2011).

Una posible explicación por la cual no se encontró contraste sucesivo negativo en sapos podría ser consecuencia de no haber encontrado aún los parámetros correctos para revelarlo. En vista de esta interpretación y con el fin de continuar con el estudio sistemático del aprendizaje instrumental y los efectos de cambios en las condiciones de refuerzo, durante el presente trabajo de tesis se estudió la modificación de los mecanismos fisiológicos involucrados en la variación de peso de los anfibios. Así, mediante la manipulación de los mecanismos de regulación del intercambio hidrosalino, se podría producir una variación en la percepción de la calidad de los reforzadores

para ser usados luego en una situación de aprendizaje instrumental.

Biología de los anfibios

Los anfibios y su relación con el agua

Los Anfibios están representados por 6.771 especies diferentes que se agrupan en 3 ordenes taxonómicos: Anura (5.966 especies), Caudata (619 especies) y Gymnophiona (186 especies) (Frost 2013). Su distribución abarca todos los continentes con la excepción de la Antártida, extendiéndose desde el Círculo Polar Ártico hasta la Patagonia Argentina. Se han adaptado a un amplio rango de hábitats y de condiciones climáticas; se los encuentra en desiertos áridos y en profundos lagos de agua dulce, su estilo de vida puede variar desde una vida fosorial a vivir en el dosel de un bosque tropical, incluso se han registrado especies que pueden sobrevivir a períodos de congelamiento (Schmid 1982).

La disponibilidad de agua y de ambientes húmedos afecta a casi todos los aspectos de la vida de los anfibios (reproducción, osmoregulación, etc), por lo cuál es uno de los mayores determinantes de la distribución geográfica y la distribución local de las especies (Rodríguez *et al.* 2005). Numerosos estudios se han llevado a cabo a fin de estudiar la capacidad de los anfibios a adaptarse a la variación en la disponibilidad de agua dentro de un amplio rango de condiciones ambientales (Katz 1989, Geise y Linsenmair 1986, Ferreira y Jesus 1973).

Los primeros estudios sobre las relaciones de los anfibios con el agua datan de más de doscientos años. Robert Townson, en 1795,

estableció las características principales de la conservación del agua de los anfibios terrestres: alta tasa de evapotranspiración en un ambiente seco, rehidratación (“beber”) mediante la absorción de agua a través de la piel abdominal presionado contra sustratos húmedos, y el uso de la vejiga urinaria como un depósito de agua, la cuál puede ser reabsorbida cuando vuelven a la tierra (Joergensen 1997). Posteriormente se realizaron diversas investigaciones que confirmaron la importancia de la piel en el intercambio de agua con el ambiente (Overton 1904, Maxwell 1913, Adolph 1925, 1932, 1933), así como también que los anfibios pueden tolerar niveles inusualmente altos de pérdida de agua en comparación con otros vertebrados (Hall 1922).

En la naturaleza, los anfibios terrestres deben enfrentar períodos de deshidratación que pueden ser muy variables temporalmente. Diversos mecanismos fisiológicos, morfológicos y comportamentales fueron descritos que posibilitarían la disminución de la tasa de deshidratación, como por ejemplo: formación de capullos de piel, resguardarse en madrigueras, esparcirse por la piel secreciones lipídicas, posturas que reducen la superficie expuesta, etc. (Ruibal y Shoemaker 1984, Navas *et al.* 2002, Schmid y Barden 1965, Pough *et al.* 1983). Si bien estos mecanismos disminuyen la tasa de deshidratación no la evitan totalmente, y en caso de no encontrar fuentes de hidratación, en ambientes secos, pueden morir al cabo de algunas horas. El primer registro de experimentos en los cuales se evaluaba la deshidratación de *Rana temporaria* cuando eran expuestas al aire a temperatura ambiente mostraron que después de una

pérdida por encima de 30-32% de la masa corporal los animales no se recuperaban cuando se los transfería al agua (Overton 1904 en Joergensen 1997). Experimentos que incluyeron 10 especies de ranas y sapos, que van desde las especies xerófilas como *Scaphiopus spp.* a las acuáticas como *Rana grylio*, mostraron una clara correlación entre el hábitat y la pérdida de agua corporal que pueden tolerar, que van desde un 60% de agua corporal en *Scaphiopus spp.* al 43% en la *Rana aurora* (semi-acuática) y alrededor del 40% en *R. grylio* (Thorson y Svihla 1943).

Todos los anfibios se rehidratan rápidamente en el agua dulce, ya sea que estén completamente sumergidos o que sólo tengan la piel ventral en contacto con ella, pero hay diferencias inter-específicas en las tasas de rehidratación. En general, los anfibios terrestres absorben agua más rápidamente que las especies acuáticas o semiacuáticas (Warburg 1965; Mullen y Alvarado 1976; Shoemaker y Nagy 1977). La tasa de absorción de agua también se ve influenciada por la condición del animal. Los anfibios deshidratados toman agua más rápidamente que los individuos totalmente hidratados, y pueden absorber el agua de los suelos más secos (Spight 1967, Ruibal *et al.* 1969, Walker y Whitford 1970, Geise y Linsenmair 1988).

La piel de los anfibios es la interface entre el organismo y el ambiente que lo rodea. Es el principal órgano involucrado tanto en la pérdida como en la captación de agua, así como también está involucrado en funciones tan diversas como intercambio gaseoso e iónico, secreción de sustancias que son utilizadas para la comunicación, reconocimiento

sexual, antimicótico y antibiótico, provee de protección mecánica contra lesiones y contra depredadores (Duellman y Trueb 1986). Morfológicamente, se pueden distinguir dos capas: exteriormente la epidermis y debajo de la misma la dermis. La epidermis consta de cuatro estratos: corneo (el más externo), granuloso, espinoso y basal o germinativo (productor de las células de reemplazo). Por debajo de éste se encuentra la dermis, la cuál está compuesta de un estrato laxo (entre sus principales componentes contiene a las células pigmentarias, los vasos sanguíneos y las glándulas exócrinas) y un estrato compacto (Duellman y Trueb 1986, Fox 1986).

En cuanto a la permeabilidad de la piel se ha encontrado que el flujo osmótico a través de la zona ventral generalmente es mayor que a través de la zona dorsal. A su vez, la zona pélvica (llamada *parche pélvico*) exhibe mayor permeabilidad comparada con las zonas pectorales (McClanahan y Baldwin 1969; Baldwin 1974; Yorio y Bentley 1977). Además de las diferencias en la permeabilidad, el parche pélvico también posee una mayor vascularización y mayor respuesta a la hormona arginina vasotocina (AVT) en comparación con el resto de las áreas (Bentley 1966; Yorio y Bentley 1977).

Mecanismos reguladores del balance hidrosalino

Mediante la absorción/pérdida de agua por la piel y la excreción/reabsorción de los riñones y la vejiga se regula el balance hidrosalino en los anfibios. Se han descrito mecanismos de transporte de agua e iones regulado por el sistema hormonal, el sistema

nervioso y canales y transportadores de membrana. En cuanto al sistema hormonal, diversos estudios establecieron a la hormona arginina vasotocina (AVT) como un factor importante en la regulación del balance hídrico de anfibios. Esta hormona presenta una alta conservación a nivel evolutivo, mostrando la misma estructura en agnatos, anfibios, reptiles y aves. Por otro lado, la estructura de la hormona antidiurética de mamíferos, arginina vasopresina (AVP), es distinta pero tiene efectos fisiológicos análogos (Acher *et al.* 1997). Muchos anfibios también son sensibles a la AVP, la cual ha sido ampliamente utilizada para investigar el balance acuoso (Heller y Bentley 1965).

El flujo osmótico de agua, usando piel aislada de *Rana temporaria*, aumentó aproximadamente al doble cuando ésta fue tratada con hormona antidiurética, pero el flujo isotópico sólo aumentó un 10% (Koefoed-Johnsen y Ussing 1953). La diferencia fue atribuida a cambios en los mecanismos de transporte de membrana. Estudios recientes mostraron que estos cambios se podrían deber a la inserción de acuaporinas (proteína de transmembrana involucrada en el transporte transcelular de agua) en membrana mediada por AVT (Suzuki y Tanaka 2009).

La tasa de consumo de agua a través de la piel de la *Rana pipiens* aumenta cuando se lesiona el cerebro medio o la médula oblonga (Adolph 1934); éste fue el primer registro de la existencia de regulación nerviosa sobre la captación de agua, dicho aumento fue irreversible y conducía a la muerte del individuo. Estudios *in vitro* en

Rana esculenta y en *Bufo bufo*, mostraron que la introducción externa de atropina, un antagonista colinérgico, así como también la de un agonista de receptores β -adrenérgicos aumenta la permeabilidad de la piel de los anfibios (Kirschner 1953, Nielsen y Larsen 2007).

Por último, los canales de sodio que se encuentran en la membrana apical de las células del estrato granuloso de la piel, son la vía de absorción de sodio desde el ambiente o desde un compartimento de fluido transcelular como orina, sudor, saliva, etc. El bloqueo de dichos canales mediante amilorida provoca la reducción de la introducción de sodio a las células y la subsecuente reducción en la captación de agua (in vitro, Koefoed-Johnsen y Ussing 1958; in vivo, Hillyard y Larsen 2001).

Estudios sobre la biología y las relaciones con el agua de *Rhinella arenarum*

Recientemente se realizó una revisión taxonómica del género *Bufo* y en base a características morfológicas y genéticas se incluyó a la especie *Bufo arenarum* en el género *Rhinella* (Hensel 1867) (Pramuk *et al.* 2008). En base a que la mayoría de los trabajos mencionados son previos al cambio de género hemos decidido usar indistintamente los dos géneros pero sin desconocer su nueva clasificación taxonómica.

Se ha registrado la presencia de *B. arenarum* desde el sur de Brasil hasta el sur de la Patagonia Argentina. Esta especie se encuentra en una gran variedad de nichos ecológicos dentro de sus áreas de

distribución, hasta la fecha no hay registros de su presencia en las altas cumbres de la cordillera pero sí a 1000 metros sobre el nivel del mar. Predominantemente se los suele encontrar cerca de charcas y lagunas de aguas dulces permanentes y son muy comunes alrededor de las construcciones urbanas (Ceí 1959, Ruibal 1962).

Los primeros estudios sobre la resistencia de los sapos comunes a las condiciones ambientales extremas de distintas regiones de la Argentina fueron realizados por Ceí (1959) y registraron la pérdida de agua y la variación de peso en condiciones rigurosas de alimentación, temperatura (entre 23 y 26°C) y humedad (disminuida artificialmente mediante cloruro de calcio). En dichas condiciones, en 11 meses el 50% de los animales que sobrevivieron fueron de la provincia de Mendoza, siendo los más resistentes. También demostró que el tamaño de los individuos se encuentra inversamente correlacionado con la tasa de deshidratación de los mismos (Ceí 1959).

En la década de los ochenta en nuestro laboratorio se estudió el papel del sistema nervioso central en el control del balance acuoso en *B. arenarum* (Segura *et al.* 1982, 1982b). La lesión de distintas áreas del cerebro, así como la anestesia, la manipulación de los animales, el estado de coma reversible y la participación del control β -adrenérgico fueron manipulados a fin de determinar su participación en el balance acuoso. El mismo fue estimado como la diferencia entre la captación de agua y la producción de orina en animales totalmente hidratados y con las vejigas vacías, luego de haber estado expuestos

durante tres horas a agua corriente. Los resultados mostraron que lesiones en el área tegmental del meséncéfalo y la destrucción de la médula espinal aumentan la captación de agua, contrariamente a lo observado en los animales hipofisectomizados que no registraron cambios en la captación con respecto a los animales con operación simulada. El balance acuoso fue negativo en todos los animales lesionados menos en los que se le lesionó la médula espinal, los cuales presentaron una mayor captación de agua con respecto a la producción de orina. La eliminación completa del sistema de secreción de la hormona antidiurética, arginina vasotocina, no produce cambios en la absorción de agua pero sí una poliuria y una extrema pérdida de peso. En cuanto a la participación de las catecolaminas en la captación de agua se estudiaron diferentes drogas inyectadas subcutáneamente: se utilizaron agonistas (Metaraminol e Isoprenalina) y antagonistas (Fenoxibenzamina y Propanolol) de los receptores alfa y beta adrenérgicos, así como también, Guanidina (antihipertensivo que reduce la liberación de catecolaminas) y Atropina (anticolinérgico). Los antagonistas de los receptores adrenérgicos y la Guanidina aumentaron la captación de agua, aunque en diferentes magnitudes. Los agonistas de los receptores adrenérgicos mostraron una disminución de la captación. Estos resultados confirmarían el control adrenérgico de la captación de agua. La inyección de atropina no produjo efecto sobre la captación de agua (Segura *et al.* 1982, 1982b).

Otros estudios desarrollados también en nuestro laboratorio analizaron el efecto

de la deshidratación (rango de 0% a 40%) sobre el comportamiento de rehidratación de los animales. En este caso se observó que a mayor deshidratación mayor es el tiempo de permanencia en el agua, mayor es el peso final luego de 24 hs en agua, así como también mayor es la velocidad con la cual recorren un laberinto recto (Schmajuk y Segura 1982). La permeabilidad de la piel de los sapos durante la rehidratación correlaciona positivamente con el grado de deshidratación que presentan los animales (Reboreda *et al.* 1991). Estos resultados mostraron que la deshidratación modificaría no sólo parámetros comportamentales sino también fisiológicos relacionados con la absorción de agua a través de la piel en *Bufo arenarum*.

Reboreda y colaboradores (1987) estudiaron el efecto de la variación sorpresiva de la osmolaridad de las soluciones externas sobre la captación y la permeabilidad al agua de la piel de animales hidratados (con sus vejigas vacías) intactos o hipofisectomizados. El cambio en las condiciones externas (agua deionizada por una solución de 115 mM de cloruro de sodio) no produjo efectos sobre la captación de agua en intactos o hipofisectomizados. Si a la solución 115 mM de cloruro de sodio se le adicionaba clorhidrato de amilorida (250 mM) se observó una disminución de la captación en ambos grupos, así como también un incremento en el coeficiente osmótico de permeabilidad de la piel. De esta manera se demostró la participación de canales de sodio sensibles a amilorida en la regulación de la permeabilidad de la piel y de la captación de agua en sapos totalmente hidratados.

OBJETIVOS

Durante la realización de la presente tesis se conjugaron los resultados previos, obtenidos en nuestro laboratorio, referidos a la regulación del intercambio iónico y acuoso y los estudios de aprendizaje instrumental, con el fin de obtener diferentes reforzadores, mediante la manipulación de los mecanismos involucrados en el intercambio hidrosalino, que puedan ser utilizados en futuros estudios de aprendizaje instrumental en el sapo común *Rhinella arenarum*.

Los objetivos específicos de esta tesis son:

Ampliar el estudio de los parámetros asociados a la discriminación de los refuerzos utilizados en el aprendizaje instrumental en *R. arenarum*.

Estudiar los mecanismos fisiológicos involucrados en la variación de peso de animales de diferentes grados de deshidratación expuestos a soluciones de distinta osmolaridad.

Estudiar la permeabilidad al agua de la piel de los sapos en diferentes grados de deshidratación y expuestos a soluciones isosmóticas (115 mM NaCl) y levemente hiperosmóticas (300 mM de NaCl) con el plasma de animales totalmente hidratados.

SERIE EXPERIMENTAL 1

Estudio del comportamiento de discriminación de refuerzos

Introducción

Se entiende por discriminación a la capacidad que poseen los organismos

de detectar diferencias entre aspectos relevantes de su hábitat (O'Keefe y Nadel 1978). En general, los estudios de discriminación fueron realizados con el interés de estudiar las habilidades que tienen los animales para diferenciar entre claves y entre lugares dentro de su ambiente. Además, se han desarrollado con el fin de estudiar los límites del sistema perceptual/sensorial y del aprendizaje basado en la habilidad de formar categorías (Ikeno 2004; Hempel de Ibarra y Giurfa 2003; Zayan y Vauclair 1998; O'Keefe y Nadel 1978). Los animales utilizan una amplia variedad de claves a fin de resolver las diferentes tareas que deben realizar en su ambiente (Rodríguez *et al.* 1994).

En un procedimiento de aprendizaje instrumental, la discriminación ocurre cuando un estímulo condicionado (clave) es reforzado y otro cercano no lo es. Aunque inicialmente el segundo estímulo produce una respuesta ésta se extingue por no ser reforzada, mientras que la respuesta condicionada del estímulo reforzado continuamente se mantiene en el tiempo. Discriminación, por lo tanto, es considerada como el resultado de combinar la adquisición y la extinción de diferentes respuestas ante estímulos o claves (Mackintosh 1974). Se puede distinguir entre claves externas al animal (como forma, color, olor o tacto) e internas, generadas por los mismos sujetos (como izquierda-derecha) (Day *et al.* 2003). Se han realizado estudios de discriminación con claves internas y externas, siguiendo un procedimiento de aprendizaje instrumental en un laberinto en Y, en un amplio rango de taxas, tanto vertebrados (ratas: O'Keefe y Nadel 1978; anfibios: Schmajuk *et al.*

1980; reptiles: Day *et al.* 2003) como invertebrados (abejas: Giurfa *et al.* 2001; Hempel de Ibarra y Giurfa 2003).

Sin embargo, la información sobre este tipo de aprendizaje para algunos taxas es escasa. Sólo se ha reportado un experimento de aprendizaje de discriminación de claves internas (derecha e izquierda) usando un laberinto en Y en anfibios, realizado en nuestro laboratorio por Schmajuk y colaboradores (1980). Encontrar un refuerzo a la derecha o a la izquierda no sólo proporciona información sobre sus capacidades de discriminación de posición, sino también sobre las capacidades para distinguir la presencia o ausencia del reforzador que se le provee. Cabe aclarar que existen para este grupo taxonómico estudios previos de discriminación usando otro método de entrenamiento (caja de salto o escape, tanque con gradientes de intensidad de descargas eléctricas), utilizando en su mayoría refuerzos aversivos (Muzio 1999; Williams 1967).

Experimento 1: Discriminación de posición utilizando un refuerzo apetitivo

En el primer experimento se estudió el comportamiento de discriminación de posición utilizando agua deionizada como reforzador, ampliando el trabajo previo de Schmajuk y colaboradores (1980). Los cambios más significativos en el procedimiento fueron: la determinación de peso mediante el vaciado de las vejigas (Ruibal 1962), la ampliación del intervalo de permanencia en el compartimento meta, la incorporación de un grupo control reforzado azarosamente y el registro de la

variación de peso que experimentaron los animales durante el período de adquisición.

Materiales y Métodos

Sujetos: Se utilizaron 12 sapos machos adultos de la especie *Rhinella arenarum* de la Provincia de Buenos Aires.

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

1. Pupilas: comprobar la simetría y reactividad a la luz.

2. Reflejo vestibulo-ocular: constatar la tendencia del globo ocular a permanecer en la misma posición relativa ante un movimiento de la cabeza en el sentido inferior-superior.

3. Reflejo vestibulo-cefálico: observar la tendencia de la cabeza a permanecer en la misma posición relativa ante un movimiento en sentido inferior-superior.

4. Abrazo sexual: constatar su existencia y su liberación.

5. Enderezamiento: observar que el animal se endereza inmediatamente al ser colocado en posición cúbito-dorsal.

6. Constatar la presencia de las siguientes respuestas de defensa:

a. Respuesta de defensa catatónica: inmovilidad de animal al oprimir el esternón.

b. Respuesta de defensa cefálico “unken”: el animal empuja hacia adelante al poner un elemento en contacto con la trompa.

c. Respuesta de defensa “kicking”: el animal da una patada al estimularse los flancos.

7. Marcha a saltos: observar que la marcha del animal sea sin tropiezos.

8. Reflejo de esfínteres: observar liberación de orina durante la manipulación.

9. Canto: verificar su existencia al tomar al animal por sus flancos.

10. Morfología: observar la presencia de simetría general.

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

Dispositivo experimental: Se utilizó un laberinto en Y de Plexiglas con piso verde, paredes negras y tapas superiores transparentes. Cada brazo de 40 cm de longitud x 12 cm de ancho x 20 cm de alto. El punto de decisión triangular separa los brazos 120 grados entre ellos. El compartimento de partida y los compartimentos meta estaban delimitados por una puerta guillotina accionada por

el experimentador. Solo en uno de los compartimentos meta se encontraba un recipiente (pileta) lleno de agua deionizada que funcionaba como reforzador, en el otro compartimento la pileta poseía agua, pero fuera del alcance del animal (una rejilla evitaba en contacto del animal con el líquido dentro del contenedor). Este procedimiento posee la finalidad de evitar que los animales se guíen hacia la pileta correcta utilizando un gradiente de humedad. El laberinto se encuentra iluminado uniformemente mediante luces de 15 W ubicadas en el centro de cada brazo y en el punto de decisión. Durante el entrenamiento el cuarto se encontraba con las luces generales apagadas y el experimentador posicionado en el centro del compartimento de salida registrando los movimientos del animal a través de un espejo ubicado al frente. El cuarto experimental poseía temperatura ($23 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) y humedad ($50\% \pm 5\%$) constante y se encontraba aislado acústicamente mediante un parlante conectado a un generador de ruido blanco (frecuencias entre 20-30.000Hz).

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

Para el registro se utilizó una balanza digital Moretti Moretti NJW-1500 (rango 0-1500g.; precisión 0.05 g.) y los valores variaron entre 83 y 129 g de PS.

Procedimiento experimental: Los 12 animales seleccionados previamente fueron

divididos en dos grupos, no registrándose diferencias entre los PSs de los mismos ($F_{(1,10)} = 0.004$, $p = 0.94$) Los grupos fueron los siguientes:

Experimental (n=6): los animales encontraban la pileta reforzada al final del pasillo de la derecha o a la izquierda. A fin de evitar la tendencia natural de los animales por girar hacia un lado, luego del pre-entrenamiento se asignaba el lado contrario de la tendencia. Seguir una estrategia de giro fija era necesario para resolver con éxito la consigna.

Control (n=6): los animales de este encontraban la pileta reforzada en el brazo de la derecha o de la izquierda, de manera pseudoazarosa (no más de dos veces en el mismo lado)

Los animales de ambos grupos tuvieron 2 sesiones de pre-entrenamiento (1 ensayo cada sesión) y 12 sesiones de entrenamiento (adquisición). Los animales comenzaron los ensayos al 80 % de su peso estándar. Esto se logró mediante un proceso de deshidratación diario en jaulas, a fin de aumentar la motivación de los individuos en la búsqueda de agua. Este protocolo de deshidratación es usualmente utilizado en anfibios y ha demostrado ser no demasiado estresante, e incluso motivante (Brattstrom 1990). Antes y después de cada sesión se registró el peso del animal, calculándose así la variación de peso. Los entrenamientos se realizaron de manera diaria entre las 13:00 y las 19:00hs. Los animales fueron mantenidos en contenedores plásticos individuales durante todo el período experimental.

Pre-entrenamiento: Todos los sujetos fueron sometidos a dos días de pre-entrenamiento con el fin de habituarlos a las condiciones experimentales. Durante las sesiones de pre-entrenamiento los animales podían desplazarse libremente dentro del dispositivo experimental. La duración de cada sesión de pre-entrenamiento fue de 10 minutos.

1. Primera sesión: Se colocó una gota de agua deionizada a la salida del compartimento de partida, otra en el punto de decisión y otra antes de cada una de las piletas.

2. Segunda sesión: se colocaron gotas de agua en el punto de decisión y antes de cada piletas.

Al finalizar los 10 minutos, si el animal no había accedido a ninguna piletas, se lo subió a la más cercana y se lo dejó allí 5 minutos. Durante estas sesiones se observó la tendencia de giro natural del animal, la cual fue contrapuesta durante el entrenamiento (colocando al sujeto en el grupo de giro contrario).

Entrenamiento: Al día siguiente del último pre-entrenamiento se inició la fase de entrenamiento diario que consto de 12 sesiones de 3 ensayos cada una. Cada ensayo se iniciaba pesando al animal y colocándolo suavemente en el compartimento de partida con la puerta guillotina cerrada. Luego de 30 segundos se abría la puerta guillotina. Cuando el animal abandonaba el compartimento de salida se contabilizaba la latencia de partida (tiempo máximo de 3 minutos). Se observaba el comportamiento del animal en el laberinto y se registraba

el Tiempo de Recorrido (hasta que se subía a una piletas o un tiempo máximo de 2 minutos) y el Tipo de Respuesta (Correcta: si accedió a la piletas reforzada, Incorrecta: no accedió a la piletas reforzada). Una vez que accedía a alguna de las piletas se cerraba la puerta guillotina de ese compartimento y se le daba entonces al animal un tiempo de 2 minutos de acceso a la piletas, concluyéndose el ensayo. El intervalo entre ensayos fue de 2 minutos (donde el animal permanecía en su contenedor individual). Una vez finalizada la sesión (3 ensayos) el animal era retirado del laberinto, pesado y devuelto finalmente a su recipiente hasta el día siguiente.

En caso de ensayo erróneo, luego del ensayo no reforzado se procedía a realizar un ensayo forzado. En este ensayo forzado se anula el brazo incorrecto con lo cual el animal sólo puede ir hacia la piletas reforzada, donde permanecía 2 minutos.

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

Se estableció un Criterio de Aprendizaje: este criterio fue de un mínimo del 75% de respuestas correctas en 3 sesiones consecutivas (7 de 9 ensayos correctos).

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

- 1. Latencia de partida:** tiempo que tarda el animal en salir con sus cuatro miembros del compartimento de salida.
- 2. Tiempo de recorrido:** tiempo que tarda el animal desde que sale del compartimento de partida hasta que ingresa a alguno de los dos compartimentos meta.
- 3. Tipo de respuesta:** correcta (elección del compartimento con piletta reforzada) o incorrecta (elección del compartimento con piletta sin refuerzo). Esta variable se expresó como % de Respuestas correctas por sesión.
- 4. Peso pre y post sesión:** peso del animal al iniciar y al finalizar cada sesión. Con estos datos se obtuvo la variación absoluta de peso (peso post sesión - peso pre sesión). Esta diferencia de peso fue luego dividida por el peso estándar del animal y multiplicada por 100. Esto brinda

una medida relativa de la variación de peso, o sea, de la captación de agua por parte del animal.

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

Resultados

Los animales del grupo que poseían el refuerzo en la posición fija (derecha o izquierda) alcanzaron el criterio de aprendizaje luego de 12 días de entrenamiento. El análisis mostró diferencias entre los grupos ($F_{(1,10)}=13.4$ $p<0,05$), aunque no se encontraron a lo largo de las sesiones ($F_{(11,110)}=1.32$ $p=0.22$) y no hubo interacción entre los factores ($F_{(11,110)}=1.65$ $p=0.09$). Los individuos del

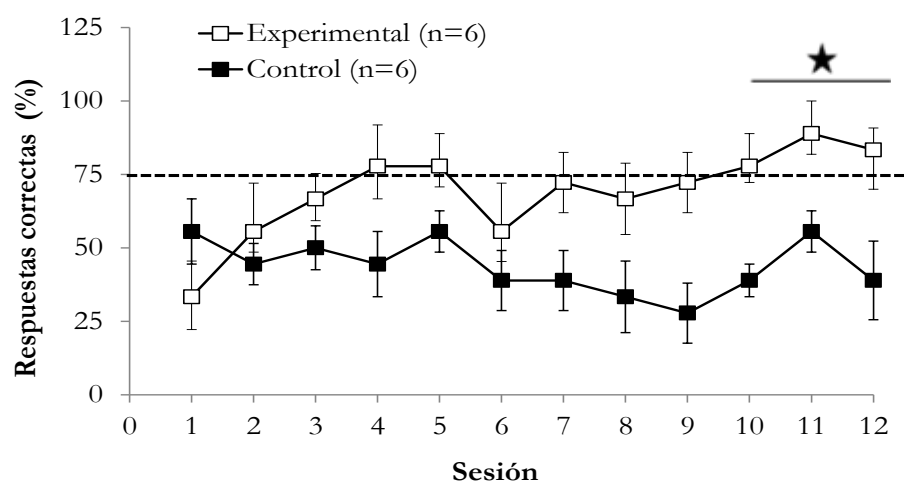


Fig. 1: Porcentaje de respuestas correctas por sesión. La línea punteada señala el criterio de aprendizaje. La estrella indica diferencias significativas entre los grupos en las sesiones indicadas y las barras el error estándar.

grupo experimental en las últimas tres sesiones de entrenamiento presentaron un mayor porcentaje de respuestas correctas que los del grupo control ($F_{(1,10)}=12.25$ $p<0,05$). Contrariamente a las primeras tres sesiones que no se hallaron diferencias entre los grupos ($F_{(1,10)}=0,028$ $p>0,05$). Durante estos dos períodos de tres sesiones no se encontraron diferencias de porcentaje de respuestas correctas durante las sesiones (primeras tres sesiones $F_{(2,20)}=0,52$ $p>0,05$, últimas tres $F_{(2,20)}=0,58$ $p>0,05$) ni se encontró interacción (primeras tres sesiones $F_{(2,20)}=1,19$ $p>0,05$ y últimas tres $F_{(2,20)}=0,08$ $p>0,05$). Los datos se muestran en la Figura 1 donde se presenta el % de respuestas correctas por sesión de entrenamiento para cada grupo. Cada punto en el gráfico es el promedio de los datos recolectados para todos los animales del grupo correspondiente.

La latencia de partida (datos no mostrados) no manifestó diferencias entre los grupos ($F_{(1,10)}=3.44$ $p=0.09$), pero sí a lo largo de las sesiones ($F_{(11,110)}=2.57$ $p<0.05$). Tampoco hubo interacción entre los factores ($F_{(11,110)}=1.12$ $p=0.37$). En las últimas tres sesiones de adquisición, la latencia de partida fue menor en el grupo experimental que en el grupo control ($F_{(1,10)}=5.07$ $p<0.05$). En contraste, en las primeras tres sesiones esta diferencia no fue observada ($F_{(1,10)}=0,72$ $p>0,05$). En dichos períodos de sesiones no se observaron diferencias entre las sesiones (sesiones 1-3,

$F_{(2,20)}=0,34$ $p>0,05$ y sesiones 10-12, $F_{(2,20)}=1,98$ $p>0,05$) ni la existencia de interacción (sesiones 1-3, $F_{(2,20)}=1,38$ $p>0,05$ y sesiones 10-12, $F_{(2,20)}=1,43$ $p>0,05$).

Tampoco se observaron diferencias entre los grupos en el tiempo de recorrido promedio (datos no mostrados) a lo largo de las sesiones ($F_{(1,10)}=0,92$, $p>0,05$), pero sí se encontró una disminución del mismo en el tiempo ($F_{(11,110)}=1,38$, $p<0,05$), en tanto que no hubo interacción entre los factores ($F_{(11,110)}=0,26$, $p>0,05$).

En cuanto a la variación de peso se encontró una mayor captación en el grupo experimental con respecto al control

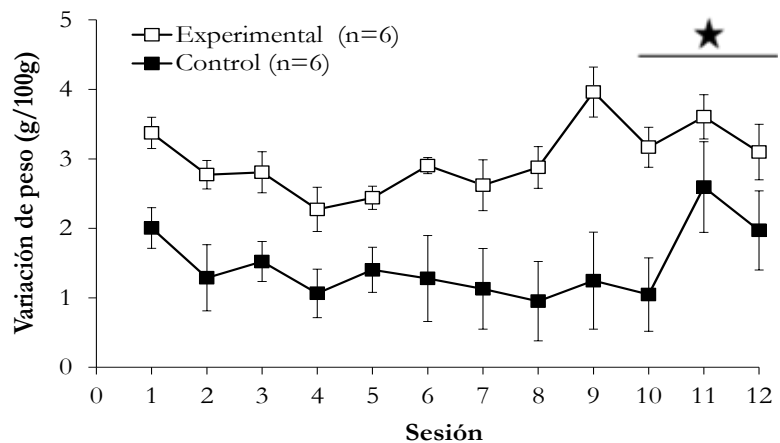


Fig. 2: Variación de peso de los animales durante la sesión. Los puntos indican el promedio de la variación de peso de los individuos del grupo correspondiente. La estrella indica diferencias significativas entre los grupos en las sesiones indicadas y las barras el error estándar.

($F_{(1,10)}=12.43$, $p>0.05$), así como también diferencias en el tiempo ($F_{(11,110)}=3,94$, $p<0,05$). No hubo interacción entre los factores ($F_{(11,110)}=0,76$, $p>0,05$) (Figura 2).

En este caso se consideró la captación durante toda la sesión, sin tener en cuenta la cantidad de ensayos reforzados.

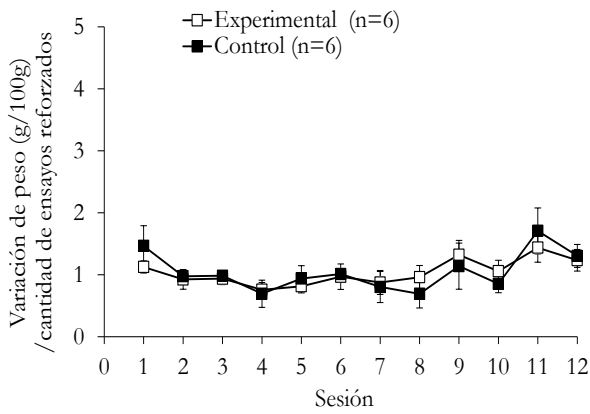


Fig.3: Variación de peso de los animales durante la sesión relativizado a la cantidad de ensayos reforzados durante la misma. Los puntos indican el promedio de la variación de peso de los individuos del grupo correspondiente y las barras el error estándar.

Cuando se relativiza la variación de peso de los animales durante la sesión según el número de ensayos reforzados (Figura 3) no se encontraron diferencias entre los grupos a lo largo de las sesiones ($F_{(1,10)} = 0,005, p > 0.05$). Por lo tanto, las diferencias mostradas en la Figura 2 podrían explicarse por diferencias en la cantidad de ensayos reforzados por sesión.

Finalmente, se realizó un análisis variación de peso relativizada a la cantidad de ensayos reforzados registrada en la

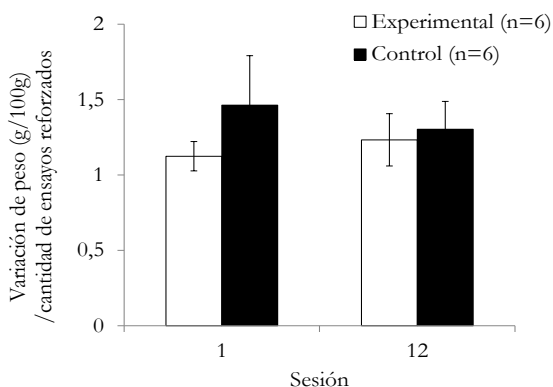


Fig.4: Variación de peso de los animales durante la sesión relativizado a la cantidad de ensayos reforzados por grupo durante la sesión 1 y 12. Las barras indican el error estándar.

primera sesión con respecto a la última sesión entre los grupos. El análisis mostró que no hay diferencia entre la primera sesión y la última ($F_{(1,10)} = 0.03, p > 0.05$), ni entre los grupos para esas dos condiciones ($F_{(1,10)} = 0.58, p > 0.05$), así como tampoco interacción entre los factores ($F_{(1,10)} = 0.93, p > 0.05$) (Figura 4).

Discusión

Los resultados mostraron que los sapos parcialmente deshidratados pueden aprender a encontrar agua cuando ésta se encuentra en una posición fija con respecto a su ubicación (derecha o izquierda). La adquisición de dicho comportamiento requirió de 12 sesiones de tres ensayos por día. El tiempo de adquisición encontrado previamente por Schmajuk y colaboradores (1980) fue de 8 sesiones. Las diferencias pueden ser atribuidas a una mayor cantidad de refuerzos por sesión (5 ensayos por sesión) y/o a una mayor captación por ensayo de los animales (promedio de 1,5 gr por ensayo de agua vs. 1gr por ensayo). Un tiempo mayor de sesiones fueron requeridas para que los sapos realizarán dicha discriminación de claves de posición en un laberinto en cruz con un arreglo espacial en T (Daneri *et al.* 2011). En este caso, la cantidad de ensayos y tiempo de reforzamiento fueron los mismos, pero en ese laberinto los animales debían recorrer el doble de la distancia para acceder al refuerzo (80 cm de cada brazo), lo cuál podría ser el motivo del mayor tiempo de adquisición.

Con respecto a la latencia de partida y al tiempo de recorrido, se observó que los animales del grupo Experimental, coincidentemente con el alcance del criterio

de aprendizaje, salen más rápido del compartimento de salida pero recorren el laberinto en el mismo tiempo que los animales del grupo Control. Con lo cuál la latencia de partida sería un buen indicador del proceso de aprendizaje, al contrario del tiempo de recorrido. Estos resultados indicarían que en un aprendizaje instrumental, en donde los animales tienen que tomar una decisión para obtener un refuerzo, el tiempo en que recorren el laberinto no es un buen indicador de aprendizaje (Daneri 2010, Brattstrom 1990), al contrario de lo que sucede en un aprendizaje instrumental en un corredor recto. Esto se debería a que una vez tomada la decisión de girar a la izquierda o la derecha no hay posibilidad de corrección, por lo cual la ejecución de la respuesta debe ser verificada convenientemente (tomando así más tiempo su procesamiento). Esta situación no se presenta en una respuesta de corredor recto, donde el sujeto no debe optar por vías alternativas de elección, teniendo simplemente que acercarse a la meta a través del corredor para obtener el refuerzo.

El grupo Experimental tuvo mayor captación de agua que el grupo Control, pero dicha diferencia en la variación de peso desaparece cuando se relativiza a la cantidad de ensayos reforzados. A diferencia de otros experimentos de aprendizaje instrumental (Muzio *et al.* 1992), no se encontró una tendencia al aumento de la captación de agua a medida que transcurrían los ensayos.

Experimento 2: Estudio de discriminación utilizando como estímulo diferentes soluciones salinas

Como se mencionó anteriormente, se realizaron estudios previos en los cuales se varió la calidad del refuerzo mediante el cambio en la concentración de cloruro de sodio (NaCl) de la solución usada como reforzador. En dichos experimentos los animales eran testeados en una caja de salto, un grupo recibía una solución de agua deionizada y luego se cambiaba a una solución de osmolaridad mayor (hipertónica), mientras que el otro grupo recibía una solución de osmolaridad mayor desde el comienzo. También se utilizaron soluciones de diferentes salinidades en experimentos de reforzamiento parcial en los cuales el 50% de las veces eran reforzados con agua y el otro 50% de las veces con una solución de NaCl 300mM o 800mM. El resultado más destacado es que la exposición a una solución salina altamente hipertónica (800mM de NaCl) en 50% de los ensayos de adquisición inhibió completamente el comportamiento de recorrer el corredor recto (Muzio *et al.* 2011).

El siguiente experimento tiene como objetivo estudiar el cambio en el comportamiento de animales que son expuestos a soluciones de diferentes concentraciones de NaCl desde el comienzo del entrenamiento y en todos los ensayos. Para este experimento se utilizó un corredor recto, que es un laberinto más sencillo comparado con el laberinto en Y, en el cual los animales no tienen que decidir entre un brazo u el otro para recibir el refuerzo, facilitando así la adquisición del aprendizaje. Los sapos se entrenaron en tres situaciones diferentes: reforzados apetitivamente con agua deionizada (ganan

peso), reforzados en una solución neutra de 300mM NaCl (no ganan ni pierden peso), y reforzados en un solución aversiva de 800mM NaCl (pierden peso).

Materiales y Métodos

Sujetos: Se utilizaron 18 sapos machos adultos de la especie *R. arenarum* de la Provincia de Buenos Aires.

Selección de los sujetos y procedimiento previo general: Se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 1.

Dispositivo experimental: Se utilizó un corredor recto de Plexiglás negro de 100 cm de largo, 12 cm de ancho y 20 cm de alto, posee una tapa transparente que provee aislamiento acústica y permite la visualización de los individuos que es realizada a través de un espejo rectangular colocado por encima del corredor en un ángulo conveniente. El laberinto está dividido en un compartimento de partida (20 cm de largo), un corredor (60 cm de largo) y un compartimento meta (20 cm de largo). Dos puestas guillotinas controlan la entrada al corredor desde el compartimento de partida, y la entrada al compartimento meta desde el corredor. En el compartimento meta se encuentra un recipiente plástico de 13 cm de largo x 10 cm de ancho y 3 cm de alto, en el cual son colocadas las soluciones utilizadas en el experimento. En cada una de las tres secciones hay una luz blanca de 15 W que provee una iluminación uniforme durante todo el recorrido.

Determinación de Peso estándar: El día previo a comenzar con el experimento se determinó el peso estándar (PS) de los animales y se utilizó la misma balanza del

Experimento 1. Los valores variaron entre 97,6 g y 141,7 g.

Procedimiento experimental: Los 18 animales seleccionados previamente fueron divididos en tres grupos, seis en cada uno registrándose diferencias entre los PSs de los mismos ($F_{(1,12)} = 1,94, p > 0.05$). Los grupos fueron los siguientes:

Grupo Agua Deionizada (AD): los animales encuentran agua deionizada en el compartimento meta. (n=6)

Grupo 300: los animales encuentran una solución de 300 mM de NaCl en el compartimento meta. (n=6)

Grupo 800: los animales encuentran una solución de 800 mM de NaCl en el compartimento meta. (n=6)

Los animales de todos los grupos tuvieron 3 sesiones de pre-entrenamiento de 10 minutos cada uno y 18 sesiones de entrenamiento. Cada sesión consta de 1 ensayo diario. Los animales comenzaron los ensayos al 80 % de su peso estándar deshidratados usando el mismo protocolo que el Experimento 1. Antes y después de cada sesión se registró el peso del animal, calculándose así la variación de peso. Los entrenamientos se realizaron de manera diaria entre las 13:00 y las 19:00hs. Los animales fueron mantenidos en contenedores plásticos individuales durante todo el período experimental.

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

podían desplazarse libremente dentro del dispositivo experimental. La duración de cada sesión de pre-entrenamiento fue de 10 minutos.

1. Primera sesión: Se colocó una gota de agua deionizada a la salida del compartimento de partida, otra en la mitad del corredor y la última frente a la piletta en el compartimento meta.

2. Segunda sesión: se colocaron gotas de agua en la mitad del corredor y la última frente a la piletta en el compartimento meta.

3. Tercera sesión: se colocaron gotas de agua al frente a la piletta en el compartimento meta.

Al finalizar los 10 minutos, si el animal no había accedido a la piletta, se lo subió a la misma dejándolos durante 2 minutos.

Entrenamiento: Al día siguiente del último pre-entrenamiento se inició la fase de entrenamiento diario que constó de 18 sesiones de 1 ensayos diario. Cada ensayo se inició pesando al animal y colocándolo suavemente en el compartimento de partida con la puerta guillotina cerrada. Luego de 30 segundos se abría la misma. Cuando el animal abandonaba el compartimento de salida se contabilizaba la latencia de partida (tiempo máximo de 5 minutos). Se observaba el comportamiento del animal en el laberinto y se registraba el Tiempo de Recorrido (hasta que se subía a una piletta o un tiempo máximo de 2 minutos). Una vez que accedía a la piletta se cerraba la puerta guillotina y el animal permanecía 2 minutos en el compartimento meta (tiempo de reforzamiento), de esta manera se daba por concluida la sesión. El animal era retirado del

laberinto, pesado y devuelto finalmente a su recipiente hasta el día siguiente. En caso de que el animal no llegara al compartimento meta dentro de los 2 minutos, el animal era llevado cuidadosamente hasta la piletta donde permanecía 2 minutos.

En el compartimento de llegada, una vez que el animal entraba con sus cuatro patas y se cerraba la puerta guillotina, se registraban los movimientos de los mismos mediante una cámara de video digital Sony Handycam DCR-SR47. Nota: Durante el desarrollo de este experimento, luego de la sesión 11, sufrimos el hurto de la cámara de video en el laboratorio. Dado que la respuesta en el tiempo de recorrido al momento de la sesión 11 mostraba una buena adquisición, decidimos incluir entonces todas las variables videoregistradas hasta esa sesión.

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

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

1. **Latencia de Partida:** tiempo que tarda el animal en salir con sus cuatro miembros del compartimento de salida.

2. **Tiempo de recorrido:** tiempo que tarda el animal desde que sale del compartimento de partida hasta que ingresa a alguno de los dos compartimentos meta.

3. **Peso pre y post sesión:** peso del animal al iniciar y al finalizar cada sesión.

Con estos datos se obtuvo la variación absoluta de peso (peso post sesión - peso pre sesión). Esta diferencia de peso fue luego dividida por el peso estándar del animal y multiplicada por 100. Esto brinda una medida relativa de la variación de peso, o sea, de la captación de agua por parte del animal.

Las variables que se registraron en el compartimento de llegada fueron:

Tiempo de permanencia en pileta (seg): tiempo en el cual el animal se encontraba con sus cuatro extremidades sobre la pileta.

Desplazamientos: cantidad de veces que el animal modifica la posición del parche pélvico dentro de la pileta mientras este se encuentra en el tiempo de permanencia en pileta.

Frotaciones: cantidad de veces durante el tiempo de permanencia en pileta en la que el animal realiza movimientos laterales rítmicos y estereotipados de su cintura pélvica extendiendo sus extremidades posteriores, conducta que permite frotar su parche pélvico contra el sustrato de un modo fácilmente apreciable.

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

Para las variables desplazamiento y frotaciones se transformaron a tasa de desplazamientos (cantidad de desplazamientos/ \log_{10} de tiempo de permanencia en pileta) y tasa de frotaciones (cantidad de frotaciones/ \log_{10} de tiempo de permanencia en pileta) para su posterior análisis.

Resultados

Los animales del grupo AD disminuyen el tiempo de recorrido del laberinto a lo largo de los ensayos (Figura 5). El Grupo 300 y el grupo 800 al segundo ensayo registraron el tiempo máximo de recorrido no llegando al compartimento meta. Al final del entrenamiento el grupo 300 presenta una tendencia a disminuir el tiempo de recorrido, mientras que el grupo 800 permanece sin llegar al compartimento meta. Un ANOVA de una vía para la última sesión mostró diferencias entre los grupos $F_{(2,15)}=8,6$ $p<0,05$; el análisis post hoc indica que el grupo AD tiene un menor tiempo de recorrido que el resto de los grupos, mientras que los grupos 300-800 no tienen diferencias. En base a esto sólo se analizaron las latencias de recorrido de los grupo AD y 300, mostrando que el grupo AD presenta un menor tiempo de recorrido comparado con el grupo 300 (ANOVA de medidas repetidas: grupo por ensayo 1-18; $F_{(1,10)} = 9,36$, $p<0,02$) y un efecto a lo largo de los ensayos ($F_{(17,170)} = 3,57$, $p < 0,001$). No se encontró interacción entre los grupos ($F_{(17,170)} = 1.25$, $p>0.23$).

Las tres soluciones produjeron los cambios esperados en peso (Figura 6), los individuos reforzados con agua deionizada aumentaron de peso a lo largo de los ensayos, los reforzados con una solución

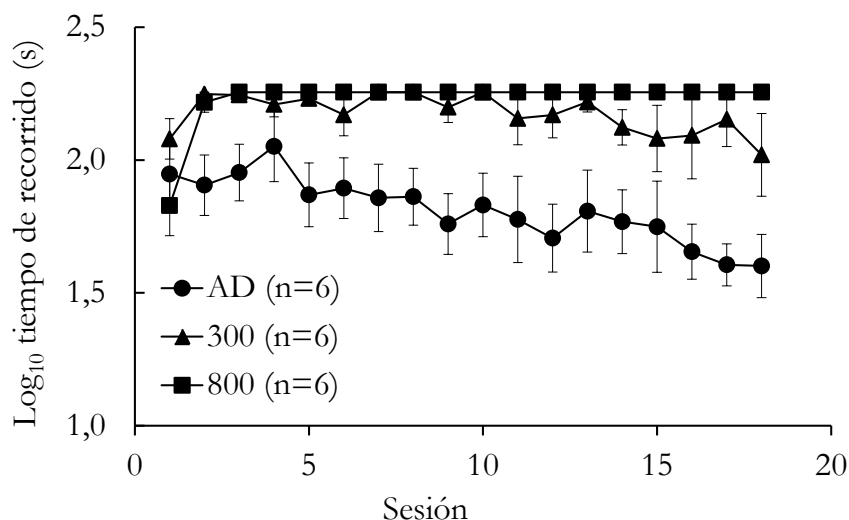


Fig. 5: Promedio del Log₁₀ del tiempo de recorrido de los individuos de cada grupo a través de las sesiones. Las barras inidcan el error estándar.

300 mM NaCl (levemente hipertónica) tuvieron poco o ningún cambio (es decir, puede considerarse en estas condiciones motivacionalmente neutra), y los reforzados con una solución 800 mM NaCl, altamente hipertónica, tuvieron una ligera deshidratación. El análisis de ANOVA de medidas repetidas (ensayo 1-18) mostró una interacción significativa, $F_{(34, 255)} = 1,80$, $p < 0,01$, así como efectos significativos para los grupos, $F_{(2, 15)} = 38,64$, $p < 0,001$, y los ensayos, $F_{(17,255)} = 2,26$, $p < 0,01$.

En la última sesión se observaron diferencias entre los grupos $F_{(2,15)} = 46,18$ $p < 0,001$; comparaciones post-hoc indican que el grupo AD capta mayor cantidad de agua (LSD $p < 0,001$), seguido por el grupo 300 (LSD $p < 0,001$) y por último el grupo 800 (LSD $p < 0,001$).

Si se analiza el comportamiento de los individuos en el compartimento meta para el primer ensayo se encontró que los animales del grupo AD son los que pasan más tiempo en la pileta (\log_{10} (tiempo de recorrido) = 2,46 seg), seguido por el grupo 300 (\log_{10} (tiempo de recorrido) = 1,64 seg) y por último el grupo 800 (\log_{10} (tiempo de recorrido) = 1,04 seg). Un ANOVA de una vía para este tiempo mostró diferencias significativas entre el grupo

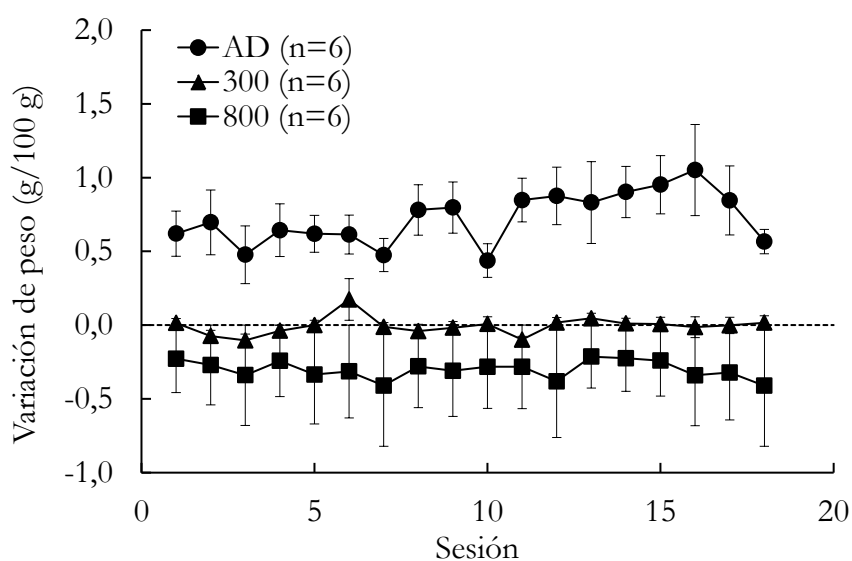


Fig. 6: Variación de peso experimentada por los animales de cada grupo a través de las sesiones. Los valores positivos son el incremento en el peso y los negativos son la pérdida del mismo. Las barras indican el error estándar.

AD y los otros dos pero no entre el grupo 300 y 800 ($F_{(2,15)}=12,58$ $p<0,001$; LSD AD-300 $p=0,01$, AD-800 $p<0,001$ y 300-800 $p>0,05$). Comparando la primera sesión y la sesión 11 (Figura 7) se observó que el tiempo de permanencia en la piletta de los grupos 300 y 800 aumentó mientras que el grupo AD permaneció igual. El análisis de ANOVA de medidas repetidas comparando ambos tiempos mostró efecto entre los grupos $F_{(2, 15)}=18,83$, $p<0,001$, entre el tiempo $F_{(1, 15)}= 24,94$, $p<0,001$ e interacción entre los factores $F_{(2, 15)} = 5,46$, $p=0.016$. Una comparación *a posteriori* muestra que no hay diferencias entre el grupo AD en el tiempo (LSD $p=0,85$) pero sí en el grupo 300 (LSD $p<0,001$) y en el grupo 800 (LSD $p<0,001$).

Los individuos del grupo AD en la primera sesión presentaron un promedio de 9,5 desplazamientos en el tiempo de permanencia en la piletta, a diferencia del grupo 300, que en promedio tuvo menos de un desplazamiento, y el grupo 800, en el cual el desplazamiento fue nulo. Transformando la variable a tasa de

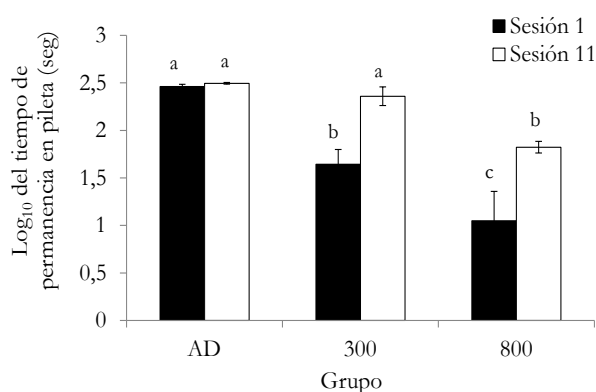


Fig. 7: Log₁₀ del tiempo de permanencia en la piletta durante la primera sesión y la sesión 11. Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los grupos ($p<0,05$). Las barras indican el error estándar.

desplazamiento y comparando con la sesión 11 podemos observar un aumento en la cantidad promedio de desplazamiento en los grupos 300 y 800, así como una pequeña disminución en el grupo AD (Figura 8).

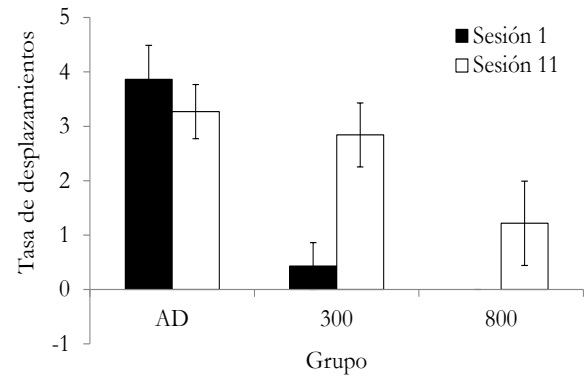


Fig. 8: Tasa de desplazamientos (cantidad de desplazamientos/ \log_{10} del tiempo de permanencia en piletta) realizados por los individuos de los diferentes grupos durante la sesión 1 y 11 del entrenamiento. Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los grupos ($p<0,05$). Las barras indican el error estándar.

Una ANOVA de medidas repetidas para la sesión 1 y 11 (grupos $F_{(2, 15)} = 12,70$, $p<0,001$; tiempo $F_{(1, 15)} = 6,50$, $p<0,05$; interacción $F_{(2, 15)} = 4,84$, $p<0,05$) mostró diferencias significativas solo en el grupo 300 (LSD 300 sesión 1- 300 sesión 11 $p<0,001$). En la sesión 11 la cantidad de desplazamientos del grupo AD son estadísticamente iguales a las del grupo 300 (LSD AD sesión 11- 300 sesión 11 $p=0,41$).

Sólo los animales del grupo AD presentaron el comportamiento de frotación con un promedio de 5 frotaciones en la primera sesión, aumentando a un promedio de 35 frotaciones en la sesión 11. Para realizar el análisis estadístico dicha variable se transformó en una tasa de frotaciones, dividiendo la cantidad de frotaciones

por el \log_{10} del tiempo de permanencia en pileta de los mismos (Figura 9). Un ANOVA de medidas repetidas mostró diferencias significativas para los factores: grupos $F_{(2, 15)}=46,7$, $p<0,001$, tiempo $F_{(1, 15)}=75,80$, $p<0,001$; interacción $F_{(2, 15)}=62,35$, $p<0,001$, en la comparación *a posteriori* se observó un aumento significativo entre las sesiones de la cantidad de frotaciones en el grupo AD, mientras que el resto de los grupos no tuvieron cambios entre las sesiones.

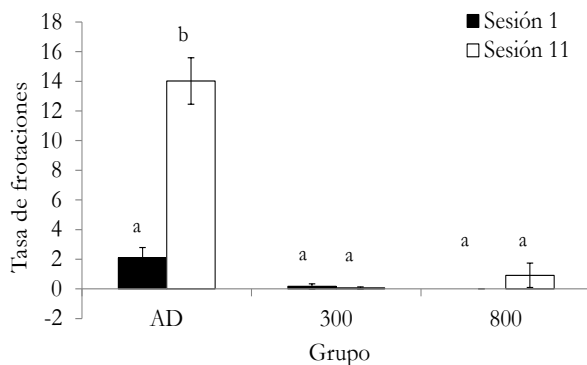


Fig. 9: Tasa de frotaciones (cantidad de frotaciones/ \log_{10} del tiempo de permanencia en pileta) realizados por los individuos de los diferentes grupos durante la sesión 1 y 11 del entrenamiento. Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los grupos ($p<0,05$). Las barras indican el error estándar.

DISCUSIÓN

Los datos mostraron que la concentración de NaCl en la solución externa que es usada como reforzador produce un cambio en el comportamiento de los individuos desde las primeras sesiones. En el caso de los animales que reciben la solución de agua deionizada disminuyen la latencia de recorrido, los animales que reciben una solución de 300 mM de NaCl comenzaron teniendo los máximos tiempos de recorrido

pero luego tendieron a disminuirlos. Finalmente, los animales que en el compartimento de llegada encuentran una solución de 800 mM de NaCl no vuelven a entrar en el compartimento meta durante todo el entrenamiento. Esto estaría indicando que los sapos pueden sentir la osmolaridad del medio externo y actuar según las consecuencias que ello produzca. Resultados similares en cuanto a la capacidad de los anfibios de sentir la osmolaridad del medio externo y cambiar su comportamiento se ha encontrado en diferentes especies (*Bufo alvarius*, Nagai *et al* 1999 y *Bufo punctatus*, Brekke *et al.* 1991).

Si se observan las variables relacionadas con el comportamiento de los animales durante el tiempo de refuerzo (o sea, tiempo de permanencia en pileta y tasa de desplazamientos en el tiempo de permanencia en pileta) se puede observar que los animales expuestos a una solución 300mM de NaCl comienzan el entrenamiento teniendo valores similares a los del grupo 800, pero al final del mismo los valores se igualan con los animales expuestos a AD, mostrando la adaptación a un ambiente en el cual no pierden ni ganan peso.

En cuanto la tasa de frotaciones se encontró que únicamente los animales expuestos a una solución de AD aumentan la cantidad de frotaciones entre la sesión 1 y 11, esta conducta estaría asociada a una adaptación comportamental que ayudaría a aumentar la captación de agua durante el período de reforzamiento.

En líneas generales los resultados de los experimentos anteriores muestran que:

1- los sapos parcialmente deshidratados pueden discriminar entre lugares donde se encuentran o no refuerzos apetitivos;

2- el comportamiento de los individuos de aproximación y de contacto con refuerzo cambia dependiendo de la concentración de NaCl que presente el medio, confirmando la existencia de un componente sensorial asociado a la captación de agua.

3- los animales expuestos a una solución 300mM de NaCl al cominezo del entrenamientomuestran un comportamiento similar al de los animales expuestos a una solución 800mM pero al final del mismo los parámetros comportamentales son similares a los del grupo AD mostrando un cambio comportamental sin variación de peso.

En base a (i) los experimentos expuestos en este capítulo, (ii) los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio en los cuales se varió la osmolaridad de las soluciones externas con el fin de obtener diferentes reforzadores para ser utilizados en diferentes paradigmas de aprendizaje instrumental (ver introducción) y (iii) los experimentos realizados en otras especies sobre los mecanismos de transporte de solutos y agua a través de la piel que permiten la evaluación de las propiedades iónicas y osmótica de fuentes de hidratación en los anuros (Von Seckendorff Hoff y Hillyard 1993, Maleek *et al.* 1999, Nagai *et al.* 1999), se comenzó con la búsqueda de soluciones que logren una variación en el intercambio hidrosalino en los sapos manteniendo la misma osmolaridad externa, mediante la manipulación de los mecanismos involucrados en la captación/pérdida de peso.

SERIE EXPERIMENTAL 2

Estudio de los mecanismos de membrana reguladores del intercambio iónico

Introducción

Para obtener diferentes soluciones que puedan ser utilizadas como reforzadores en estudios comportamentales en anfibios se requiere comprender el efecto y la interacción entre los diferentes mecanismos fisiológicos reguladores de la variación de peso en los mismos.

El primer mecanismo regulador que se abordó en esta tesis es el transporte de sodio (Na^+) a través de la membrana plasmática apical de las células de la piel. Tal como se expuso en la introducción, experimentos previos en nuestro laboratorio mostraron en animales hidratados que un cambio en la osmolaridad externa (reemplazando agua por una solución 115 mM NaCl) más la adición de amilorida produce la reducción de la captación de agua si se compara la misma antes y después del cambio (Reboreda *et al.* 1987).

La amilorida bloquearía o provocaría un cambio conformacional de los canales de sodio sensibles a amilorida (ENaC) que se encuentran en las membranas apicales de los epitelios de alta resistencia. Estos canales se han caracterizado en la piel y vejiga urinaria de anfibios, así como en los conductos colectores renales, colon, glándulas sudoríparas y salivales, pulmón y papilas gustativas. La función de los mismos es mediar el primer paso de reabsorción activa de Na^+ y desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la

homeostasis de electrolitos y agua en todos los vertebrados (Garty y Palmer 1997).

El mecanismo de intercambio de sodio descrito de una manera simple sería el siguiente. El sodio exterior entra a las células a través de los canales (ENaC), que se localizan sólo en la membrana externa (apical). Los iones de sodio son extruidos activamente hacia el espacio intersticial a través de la membrana interna (basolateral) mediante la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$. Asimismo el potasio entrante es luego reciclado a través de canales selectivos de K^+ . Esta disposición asimétrica de los transportadores permite que el Na^+ sea transportado activamente a través del epitelio, lo cual genera un potencial transepitelial que puede ser utilizado para reabsorber un anión (por ejemplo, Cl^-) o para secretar un catión (como H^+ o K^+) para mantener la electroneutralidad en las células.

La exposición de los anfibios a diferentes soluciones externas, así como también la deshidratación por exposición al aire, produce cambios fisiológicos que afectan la captación de agua a través de la piel (Loza Coll y Muzio, en preparación, Spight 1967, Schmajuk y Segura 1982). La activación de mecanismos reguladores de la homeostasis podría actuar disminuyendo o aumentando la acción de la amilorida. Debido a que los protocolos comportamentales llevados a cabo requieren la deshidratación de los individuos (a fin de motivarlos) y la exposición a soluciones externas con diferentes osmolaridades (con el objetivo de reforzarlos positiva o negativamente), los experimentos que se desarrollan a

continuación estudiaron el efecto de la amilorida sobre la variación de peso y permeabilidad del agua en el sapo común a diferentes niveles de deshidratación (100%, 90% y 80%) y a diferentes osmolaridades (115 mM y 300 mM de NaCl).

Experimento 3: Efectos de la exposición aguda a amilorida sobre la captación de agua a diferentes niveles de hidratación en el sapo común en una solución isosmótica

Materiales y Metodos

Sujetos: Se utilizaron 72 sapos machos adultos de la especie *Rhinella arenarum* de la Provincia de Buenos Aires.

Selección de los sujetos y procedimiento previo general: Se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 1.

Procedimiento experimental: Los 72 animales seleccionados previamente fueron divididos en seis grupos, 12 sujetos en cada uno ($n=12$). Los grupos fueron los siguientes:

- 100% y 100% + Amilorida (en su peso estándar, PS)
- 90% y 90% + Amilorida (deshidratados un 10% del PS)
- 80% y 80% + Amilorida (deshidratados un 20% del PS)

El día previo a comenzar con el experimento se determinó el peso estándar (PS) de los animales. Se utilizó la misma balanza empleada en el Experimento 1. Los valores variaron entre 61,95 g a 170,80 g. No registrándose diferencias entre los PSs de los mismos ($F_{(5,66)}=0.31942, p=0.9$).

Cada grupo fue deshidratado hasta llegar al peso establecido. Se los mantuvo por al menos 12 horas con ese peso, a fin de que sus parámetros fisiológicos se estabilizaran antes de realizar el ensayo. Al comienzo del experimento se registró el peso inicial. Todos los grupos fueron colocados durante 180 minutos en un recipiente con 150 ml de: I) NaCl 115mM (solución isotónica con el plasma de animales hidratados al 100% de su PS), o II) NaCl 115mM + amilorida 0,5 mM. La variación de peso de los individuos fue registrada cada 15 minutos durante el período que duró el experimento.

Fueron excluidos del análisis los animales que mostraron una variación negativa desproporcionada de su peso (orinaron) durante el período de permanencia en el recipiente.

A partir de los datos colectados durante el experimento se calculó el índice de permeabilidad osmótica siguiendo Katchalsky y Curran (1965):

$$J_w = L_p * \Delta P + L_{pd} * \Delta \Pi$$

Donde J_w es el flujo de agua a través de la piel; L_p es el coeficiente de permeabilidad hidráulica; L_{pd} es el coeficiente de permeabilidad osmótica; ΔP y $\Delta \Pi$ es la presión hidráulica y osmótica respectivamente a través de la piel.

La ΔP es igual a 0, entonces:

$$L_{pd} = J_w / \Delta \Pi$$

J_w fue estimado como WU/S. Donde la variación de peso (WU) medida en ml/hr (o cm^3/seg) y S es la superficie del cuerpo en cm^2 . La superficie del cuerpo se supone que es igual a $9 * \text{Peso corporal (g)}^{2/3}$ (Joergensen, 1950). El mayor intercambio

de agua en sapos se limita a la piel ventral que contribuye en aproximadamente 10% de la superficie total (McClanahan y Baldwin, 1969). Por lo tanto, se supuso que todos consumo de agua era a través del 10% de la superficie corporal.

La $\Delta \Pi$ a través de la piel se calculó como:

$$\Delta \Pi = (O_i - O_e) * R * T$$

donde R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta (293 ° K) y O_i y O_e , la osmolaridad interna y externa, respectivamente, medidas en mOsmoles. La osmolaridad interna se obtuvo mediante la regresión lineal $Y = (-5,92) * X + 844$ $R^2 = 0,89$ obtenida a partir de datos de osmolaridad vs % de deshidratación de *Rhinella arenanun* (Dr. Reboreda, J.C. y Dr. Petriella, comunicación personal).

Estadística: Se realizó el análisis de los datos mediante ANOVA de dos factores y de una vía con contrastes a posteriori mediante el test LSD. En todos los casos para estas comparaciones la significancia fue evaluada estableciendo el valor de alfa en el nivel 0.05.

Resultados

La captación de agua aumenta a medida que aumenta la deshidratación de los animales (Figura 10).

A los 15 minutos de exposición, se encontraron diferencias entre los estados de deshidratación en la captación de agua ($F_{(2,64)} = 43,1$; $p < 0,001$), así como también, efecto de amilorida entre los grupos ($F_{(1,64)} = 4,34$; $p = 0,041$). No se encontró interacción entre los factores ($F_{(2,64)} = 0,37$;

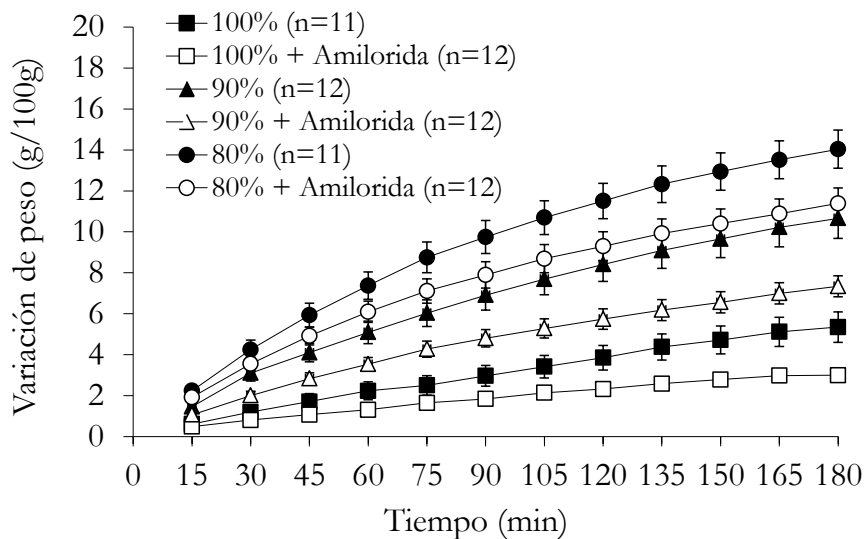


Fig. 10: Variación de peso (g/100g) durante la exposición de los animales a una solución de 115 mM de NaCl, con o sin amilorida. Las barras representan el error estándar.

$p = 0,69$) (Figura 11). Pero si se analizan los grupos individualmente, se encontró que no hay efecto de la amilorida en los grupos 100 % ($F_{(1,21)} = 0,65$; $p = 0,43$) y 80 % ($F_{(1,21)} = 0,97$; $p = 0,33$), mientras que sí se encontró efecto de amilorida en el 90 % ($F_{(1,22)} = 4,60$; $p = 0,043$).

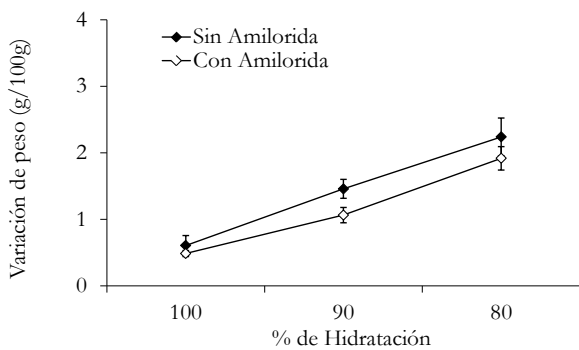


Fig. 11: Variación de peso (g/100g) a los 15 minutos para los diferentes grados de deshidratación en los grupos con y sin amilorida. Las barras representan el error estándar.

La disminución de la captación de agua debida al amilorida en el grupo 80% + Amilorida se encontró a partir de 135 minutos de exposición ($F_{(1,21)} = 4,84$; $p = 0,046$) y en el grupo 100% + Amilorida

a partir de los 60 minutos de exposición ($F_{(1,21)} = 4,44$; $p = 0,047$).

A los 180 minutos, no se encontró diferencias en la captación entre el grupo 100% sin amilorida y el grupo 90% + Amilorida ($F_{(5,64)} = 31,11$; $p < 0,001$, comparación múltiple LSD $p = 0,061$); y entre el grupo 90% sin amilorida y el grupo 80% + Amilorida ($F_{(5,64)} = 31,11$; $p < 0,001$, comparación múltiple LSD $p = 0,47$); Entre el resto de los grupos se encontraron diferencias significativas en la captación

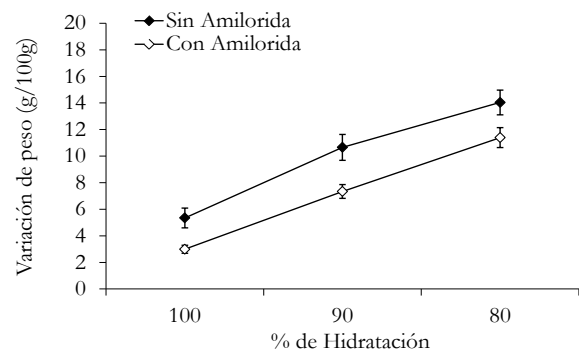


Fig. 12: Variación de peso (g/100g) a los 180 minutos para los diferentes grados de deshidratación en los grupos con y sin amilorida. Las barras representan el error estándar.

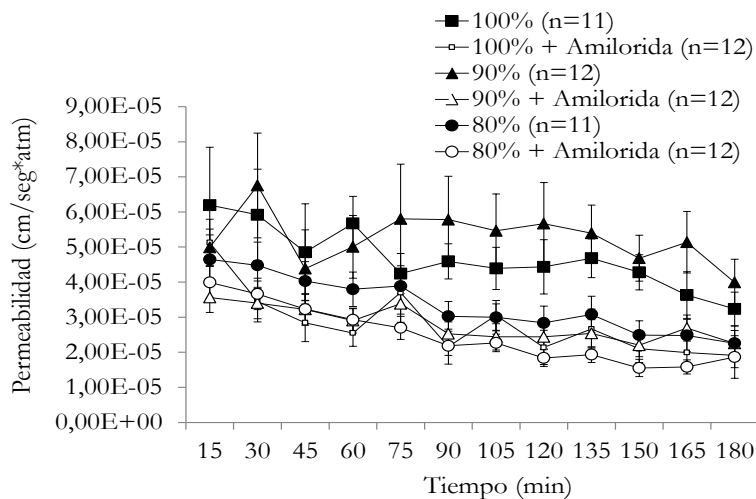


Fig. 13: Permeabilidad de la piel de los sapos a través del tiempo cuando son expuestos a una solución 115 mM de NaCl con y sin amilorida. Las barras indican el error estándar.

entre los grupos. Estos datos mostraron que el efecto de la amilorida disminuye la captación de agua que se produce al aumentar la deshidratación de los animales (Figura 12).

La permeabilidad decreció a lo largo del tiempo en todos los grupos expuestos a una solución de 115 mM de NaCl (80% tiempo 15 (T15) = $4,65 \times 10^{-5}$ a tiempo 180 (T180) = $2,26 \times 10^{-5}$ $R^2=0,89$; 90% T15 = $4,99 \times 10^{-5}$ a (T180) = $3,99 \times 10^{-5}$ $R^2=0,73$; 100% T15 = $6,19 \times 10^{-5}$ a (T180) = $3,24 \times 10^{-5}$ $R^2=0,59$). Para los grupos que estuvieron expuestos a amilorida se encontró que el grupo 100% (T15 = $5,13 \times 10^{-5}$ a (T180) = $1,91 \times 10^{-5}$ $R^2=0,78$) y el grupo 80% (T15 = $3,99 \times 10^{-5}$ a (T180) = $1,87 \times 10^{-5}$ $R^2=0,93$) decrecen mientras que el grupo 90% (T15 = $3,56 \times 10^{-5}$ a (T180) = $2,25 \times 10^{-5}$ $R^2=0,14$) se mantiene estable en el tiempo (Figura 13).

Un ANOVA de dos factores mostró que a los 15 minutos no hubo efecto de la deshidratación ($F_{(2,64)} = 1,95$; $p=0,15$), ni de la amilorida ($F_{(1,64)} = 2,7$; $p=0,10$) sobre la permeabilidad de la piel de los

sapos. Si este mismo análisis se realiza a los 30 minutos se observa que la exposición de los sapos a amilorida disminuyó la permeabilidad ($F_{(1,64)} = 4,3$; $p < 0,05$), mientras que no hubo diferencias al comparar los distintos niveles de deshidratación ($F_{(2,64)} = 1,3$; $p=0,27$), ni interacción entre los factores ($F_{(2,64)} = 0,67$; $p=0,51$). Estos resultados se mantienen hasta los 180 minutos de exposición (Figura 14).

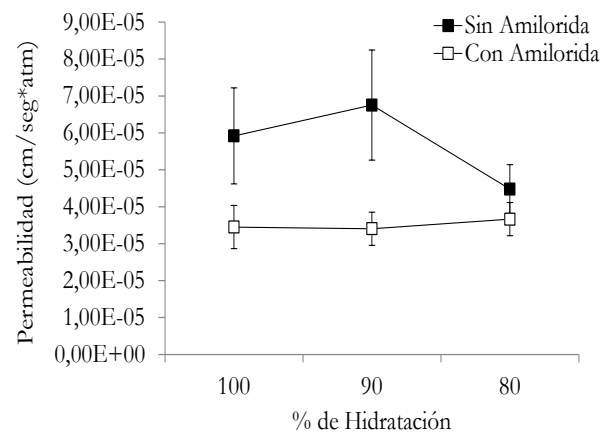


Fig. 14: Permeabilidad de la piel de los sapos a los 30 minutos de exposición a una solución 115 mM de NaCl con y sin amilorida. Las barras indican el error estándar.

Experimento 4: Efectos de la exposición aguda a amilorida sobre la captación de agua a diferentes niveles de hidratación del sapo común en una solución levemente hiperosmótica

Sujetos: Se utilizaron 72 sapos machos adultos de la especie *Rhinella arenarum* de la Provincia de Buenos Aires.

Selección de los sujetos y procedimiento previo general: Se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 1.

Procedimiento experimental: Los 72 animales seleccionados previamente fueron divididos en seis grupos, 12 sujetos en cada uno (n=12). Los grupos fueron los siguientes:

- 100% y 100% + Amilorida (en su peso estándar, PS)

- 90% y 90% + Amilorida (deshidratados un 10% del PS)

- 80% y 80% + Amilorida (deshidratados un 20% del PS)

El día previo a comenzar con el experimento se determinó el peso estándar (PS) de los animales y se utilizó la misma balanza del Experimento 1. Los valores variaron entre 70,20 g a 176,10 g. No registrándose diferencias entre los PSs de los mismos ($F_{(5,66)}=0.153, p=0.98$).

Se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 3, pero en este caso el recipiente contenía 150 ml de una solución de 300 mM de NaCl.

Se calculó el índice de permeabilidad teniendo en cuenta esta nueva condición de osmolaridad externa.

Estadística: Se utilizaron las mismas herramientas estadísticas que en el Experimento anterior.

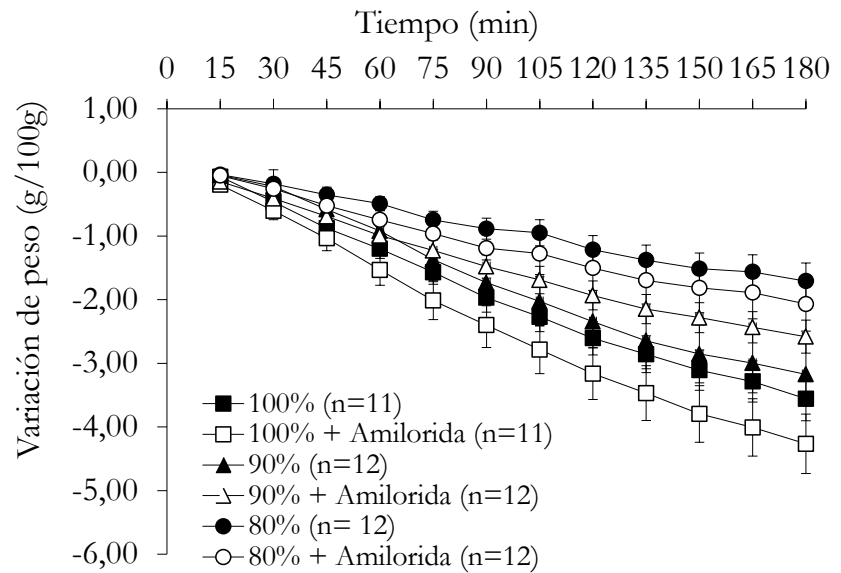


Fig. 15: Variación de peso (g/100g) durante la exposición de los animales a una solución de 300 mM de NaCl, con o sin amilorida. Las barras representan el error estándar.

Resultados

Los animales en los primeros minutos mantienen el peso aunque luego empiezan a deshidratarse (Figura 15).

A los 15 minutos de exposición, no se encontraron diferencias en la variación de peso de los animales entre los diferentes estados de deshidratación ($F_{(2,64)} = 1,02; p=0,36$), así como tampoco, efecto de la amilorida entre todos los grupos ($F_{(1,64)} =$

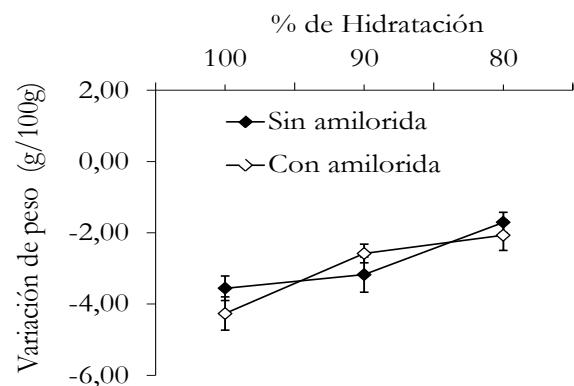


Fig. 16: Variación de peso (g/100g) a los 180 minutos para los diferentes grados de deshidratación de los individuos de los grupos con y sin amilorida. Las barras indican el error estándar.

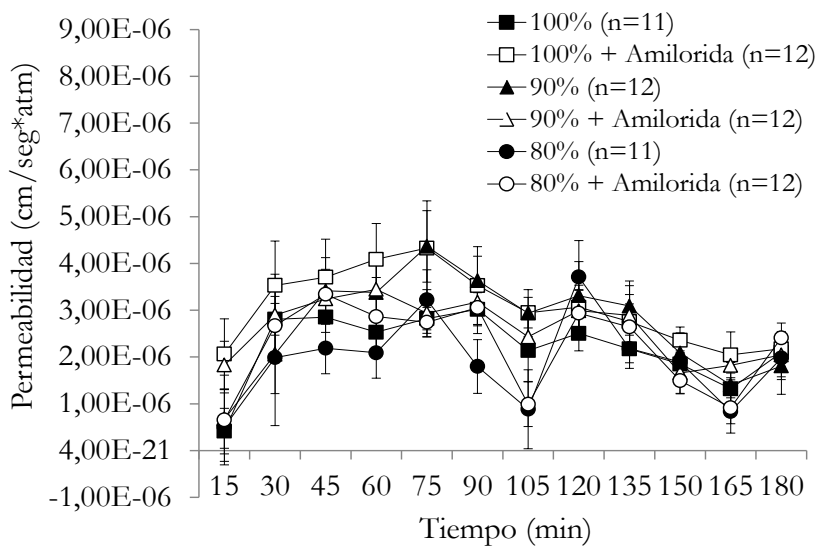


Fig. 17: Permeabilidad de la piel de los sapos a través del tiempo cuando son expuestos a una solución 300 mM de NaCl con y sin amilorida. Las barras indican el error estándar.

2,54; $p=0,12$). No se encontró interacción entre los factores ($F_{(2,64)} = 0,45$; $p=0,63$). Los animales de todos los grupos no ganan ni pierden peso durante este período (datos no mostrados).

Luego de los 180 minutos de exposición, a mayor nivel de hidratación mayor es la pérdida de peso que experimentan los animales ($F_{(2,64)} = 15,7$; $p < 0,001$). El grupo 100 % pierde en promedio 3,91 g/100g, el grupo 90% pierde 2,88 g/100g y por último el 80% pierde 1,89 g/100g. No se observó efecto de la amilorida sobre la pérdida de peso de los animales, ni interacción entre los factores (Figura 16).

La permeabilidad de los grupos expuestos a 300mM de NaCl con o sin amilorida se mantuvo sin mayores variaciones (100% sin amilorida $T_{15} = 4,17 \times 10^{-7}$ a $T_{180} = 2,10 \times 10^{-6}$ $R^2=0,0085$; 90% sin amilorida $T_{15} = 6,77 \times 10^{-7}$ a $T_{180} = 1,81 \times 10^{-6}$ $R^2=0,0091$; 80% sin amilorida $T_{15} = 5,02 \times 10^{-7}$ a $T_{180} = 1,98 \times 10^{-6}$ $R^2=0,0043$; 100% con amilorida $T_{15} = 2,06 \times 10^{-6}$ a $T_{180} = 2,17 \times 10^{-6}$

$R^2=0,27$; 90% con amilorida $T_{15} = 1,83 \times 10^{-6}$ a $T_{180} = 2,05 \times 10^{-6}$ $R^2=0,19$; 80% con amilorida $T_{15} = 5,02 \times 10^{-7}$ a $T_{180} = 1,98 \times 10^{-6}$ $R^2=0,025$) (Figura 17).

Luego de 180 minutos, la permeabilidad de la piel de los animales expuestos a una solución de 300 mM de NaCl no se encontró afectada por la amilorida ($F_{(1,66)} = 0,91$; $p=0,34$), ni por los niveles de deshidratación ($F_{(2,66)} = 0,2$; $p=0,82$) y no hubo interacción entre los factores ($F_{(2,66)} = 0,025$; $p=0,97$) (Figura 18).

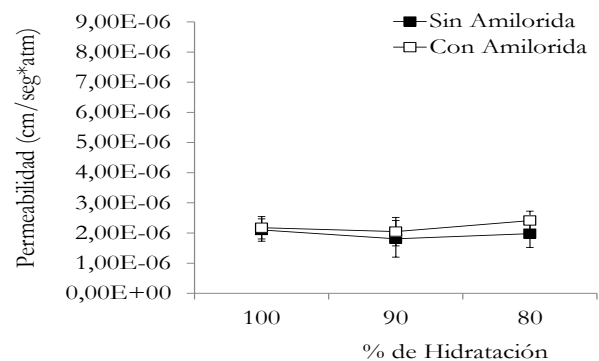


Fig. 18: Permeabilidad de la piel de los sapos a los 180 minutos de exposición a una solución 300 mM de NaCl con y sin amilorida. Las barras indican el error estándar.

DISCUSIÓN

Los resultados indican que los niveles de hidratación de los animales al inicio de la exposición condicionan la variación de peso que experimentan en 180 minutos. Los animales hidratados al 100% de su PS tienen la menor ganancia de peso en una solución isosmótica y la mayor pérdida en una solución hiperosmótica, seguido por los animales hidratados un 90% y por último

los hidratados un 80%. Así, animales que se encuentren en una situación de deshidratación aguda al localizar una fuente de agua pueden hidratarse más rápidamente que aquellos que se encuentran en una situación más favorable.

La exposición a la solución de cloruro de sodio isosmótica o hiposmótica produjo una disminución de la permeabilidad a medida que los animales se rehidrataban, mientras que si la solución era hiperosmótica la misma se mantuvo constante y fue menor en un grado de magnitud, lo cual evidenciaría una mayor resistencia a la deshidratación. La permeabilidad no se vió modificada por el estado inicial de hidratación de los sapos. Este resultado muestra que la diferencia en la captación de agua entre los animales con diferentes grados de hidratación se explicaría debido a diferencia existente entre la osmolaridad interna y externa.

La disminución en la captación y en la permeabilidad cuando se bloquean los canales de sodio, mediante amilorida, sólo se encontró cuando los animales fueron expuestos a una solución isosmótica o hiposmótica con respecto al plasma de los animales. Esto daría indicios de que los mecanismos involucrados en la captación de agua no serían los mismos que los involucrados en la evitación de la pérdida de la misma. Se requieren más estudios para saber cuáles son los mecanismos involucrados en cada una de las situaciones (recaptación y pérdida de agua). Cuando los animales estaban deshidratados un 10% de su PS el bloqueo de los canales de sodio produjo un efecto en la captación de agua mucho más rápido que cuando los animales se

encontraban en un 20% de deshidratación, lo cual sugeriría que los animales muestran una mayor susceptibilidad a la droga cuando la deshidratación es baja. Es de destacar que la disminución significativa en la captación de agua en los animales del grupo 80% + Amilorida comenzó a los 135 minutos de permanencia en la solución 115 mM y que en ese momento dichos animales se encontraban con una hidratación promedio del 92,4% para el grupo 80% sin amilorida y de 89,5% para el grupo 80% + Amilorida. En base a estos datos se podría especular que el bloqueo de los canales de sodio dependientes de amilorida constituiría un factor importante de captación de agua cuando los niveles de deshidratación son bajos (cercaos al 10%), mientras que a mayores niveles de deshidratación los mecanismos predominantes serían otros. A fin de evaluar la certeza de estas conjeturas es necesario el desarrollo de más estudios futuros.

El nivel de deshidratación usado en los protocolos de experimentación conductual es de 20% del peso estándar. La disminución de la captación por amilorida en ese grado de hidratación se encontró a partir de los 150 minutos. Dicho tiempo es muy superior al usado en cualquier protocolo experimental por lo cual no es posible utilizarlo en el futuro como reforzadores diferenciales. Si bien en el grupo 90% de hidratación se encontró disminución de la captación de agua debido a amilorida a los 15 minutos, este nivel de deshidratación no es el adecuado para los protocolos de discriminación, ni para el aprendizaje instrumental que se describió en la serie experimental anterior. Por lo tanto, no es posible el uso de amilorida para

obtener distintas soluciones que puedan ser usadas como reforzadores, debido a la falta de efecto que se encuentra en la condición de 20% de deshidratación.

En vista de estos resultados se realizó un experimento con un análogo más potente que la amilorida, el benzamil, a fin estudiar si era posible encontrar una disminución en la captación de agua en un tiempo compatible con los protocolos comportamentales (15 minutos como máximo).

Experimento 5: Efectos de la exposición aguda a benzamil sobre la captación de agua a diferentes niveles de hidratación del sapo común en una solución isosmótica

Materiales y Métodos

Sujetos: Se utilizaron 18 sapos machos adultos de la especie *R. arenarum* de la Provincia de Buenos Aires.

Selección de los sujetos y procedimiento previo general: Se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 1.

Procedimiento experimental: Los 36 animales seleccionados previamente fueron divididos en seis grupos, 6 sujetos en cada uno (n=6). Los grupos fueron los siguientes:

- 100% y 100% + Benzamil (en su peso estándar, PS)
- 90% y 90% + Benzamil (deshidratados un 10% del PS)
- 80% y 80% + Benzamil (deshidratados un 20% del PS)

El día previo a comenzar con el experimento se determinó el peso estándar (PS) de los animales y se utilizó la misma balanza del Experimento 1. Los valores variaron entre 70 g a 175.55 g. No registrándose diferencias entre los PSs de los mismos ($F_{(5, 30)}=0.28$, $p=0.92$).

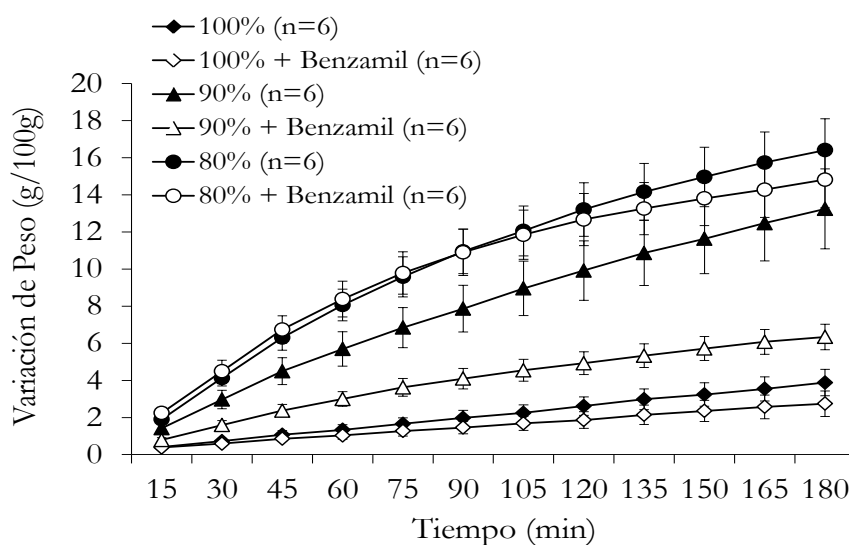


Fig. 19: Variación de peso (g/100g) durante la exposición de los animales a una solución de 115 mM de NaCl, con o sin benzamil. Las barras representan el error estándar.

Se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 3, pero en este caso el recipiente contenía 150 ml de una solución de 115 mM de NaCl, o 115 mM de NaCl + Benzamil 10 μ M, según el grupo.

Se calculó el índice de permeabilidad teniendo en cuenta esta nueva condición de osmolaridad externa.

Estadística: Se utilizaron las mismas herramientas estadísticas que en el experimento anterior.

Resultados

Los resultados mostraron que la captación de agua aumentó a través del tiempo y a medida que aumenta la deshidratación de los sapos (Figura 19).

A los 15 minutos de exposición, se encontraron diferencias entre los estados de deshidratación en la captación de agua ($F_{(2,30)} = 34,75$; $p < 0,001$). No se encontró efecto del benzamil ($F_{(1,30)} = 0,41$; $p=0,53$), ni interacción entre los factores ($F_{(2,30)} = 0,97$; $p= 0,07$). Pero si se analizan los grupos individualmente (Figura 20), se

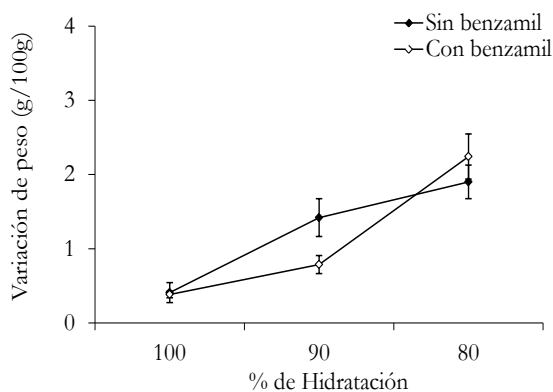


Fig. 20: Variación de peso (g/100g) a los 15 minutos para los diferentes grados de deshidratación de los individuos en los grupos con y sin benzamil. Las barras representan el error estándar.

encontró que no hubo efecto del benzamil en los grupos 100% ($F_{(1,10)} = 0,31$; $p=0,86$) y 80% ($F_{(1,10)}=0,80$; $p=0,39$), mientras que sí se encontró efecto del benzamilda en el 90% ($F_{(1,10)} = 5,01$; $p=0,049$).

A los 180 minutos el patrón de diferencias en la captación de agua se mantuvo (Figura 21), encontrándose una disminución en la captación por efecto del benzamil en el grupo 90% ($F_{(1,10)} = 9,29$; $p=0,01$), pero no en los otros dos grupos (100% ($F_{(1,10)} = 1,31$; $p=0,28$) y 80% ($F_{(1,10)} = 0,48$; $p=0,5$)).

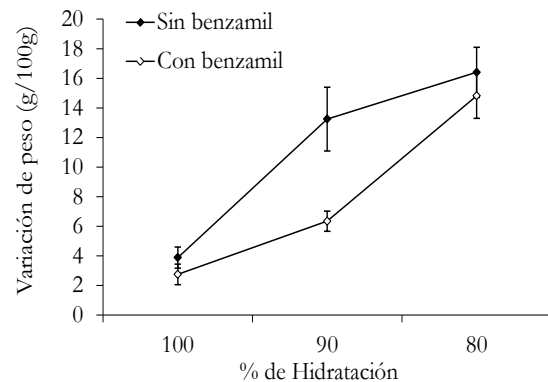


Fig. 21: Variación de peso (g/100g) a los 180 minutos para los diferentes grados de deshidratación de los individuos en los grupos con y sin benzamil. Las barras representan el error estándar.

Discusión

La captación de agua en animales con un 10% de deshidratación se ve disminuida por la acción de Benzamil, encontrándose el mismo efecto que con Amilorida con una concentración mucho menor. La falta de efecto en el grupo hidratado 100% y 80% puede ser atribuida a la menor cantidad de animales que fueron utilizados en este experimento con respecto al experimento de amilorida. No se realizaron réplicas de este experimento, ya que, en vista del patrón presentado no hay indicios que sugieran

que benzamil podría actuar antes de los 15 minutos (tiempo máximo de reforzamiento en los protocolos comportamentales).

Cabe destacar que los animales deshidratados un 10% son muy sensibles a la presencia de bloqueantes de los canales de sodio y que las diferencias en la captación se encuentran desde los primeros 15 minutos de exposición. Sin embargo, un nivel de hidratación del 90% del PS no se ajusta a una respuesta de aprendizaje apropiada para nuestras condiciones de entrenamiento instrumental.

Manipulando los mecanismos de canales de sodio no se obtuvieron diferencias en la captación o en la pérdida de agua, de manera de poder utilizar dichas soluciones en los protocolos de entrenamiento comportamentales propuestos. Por lo tanto, se continuó con la búsqueda abordando el estudio de otros mecanismos involucrados en la variación de peso de los animales.

En la siguiente serie de experimentos utilizamos un bloqueante específico de los receptores V2 de AVT a fin de modificar la variación de peso que experimentan los sapos cuando se los expone a una solución isotónica, hipotónica o hipertónica con respecto a su plasma. De esta manera nos propusimos avanzar en el estudio de los mecanismos hormonales reguladores del intercambio iónico.

SERIE EXPERIMENTAL 3

Estudio de los mecanismos hormonales reguladores del intercambio iónico

Introducción

El efecto de las hormonas sobre el intercambio iónico y acuoso han sido ampliamente evaluados, históricamente, en animales intactos o usando como modelo tejido aislado de piel y vejiga (Joergensen 1997, Yorio y Bentley 1977, Acher *et al.* 1997, Suzuki *et al.* 2007). Las hormonas mayormente involucradas que han sido estudiadas son hipofisarias (antidiurética -AVT-, Hydrinas y Prolactina), del sistema nervioso simpático y parasimpático (adrenalina, noradrenalina y acetilcolina) y del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Wells, 2007).

En anuros, la deshidratación desencadena la liberación de AVT, desde la neurohipófisis, produciendo los siguientes efectos sobre el balance acuoso: 1. promueve la afluencia de agua a través de la piel (Koefoed-Johnsen y Ussing, 1953); 2. induce la reabsorción de agua por el riñón (Sawyer 1957) y por la vejiga (Bentley 1958, Ewer 1952); 3. reduce, en algunas circunstancias, la tasa de filtración glomerular (Sawyer 1951).

Con respecto a la absorción de agua a través de la piel, la hormona antidiurética, en *Hyla japonica*, induciría la translocación de acuaporinas (AQP-h2 y AQP-h3) a la membrana apical de las células del estrato granuloso de la piel, aumentando la permeabilidad al agua (Hasegawa *et al.* 2003, Suzuki *et al.* 2007). La translocación se produciría debido a la cascada de segundos mensajeros que desencadenaría la unión de la hormona AVT con los receptores tipo V2 (Kohno *et al.* 2003). Por otro lado, en la membrana plasmática basolateral de las células principales epidérmicas de la región

pélvica (con excepción del estrato córneo) se detectó la AQP-h3BL que no responde a la estimulación con AVT (Akabane *et al.* 2007) y propiciaría el flujo de agua hacia la dermis. También, se propuso que las AQP 1, localizadas en la membrana de las células endoteliales de los capilares, mediarían el transporte de agua hacia el torrente sanguíneo.

Tomando como base este modelo, el bloqueo de los receptores tipo V2 de AVT produciría una disminución de la permeabilidad de la piel, ya que no permitiría la translocación de las acuaporinas hacia la membrana apical. Recientemente se caracterizó un inhibidor competitivo selectivo para el receptor V2 de AVT denominado OPC31260 (Yamamura *et al.* 1992). Dicho antagonista de AVT ha sido estudiado in vivo e in vitro en mamíferos (Yamamura *et al.* 1992, Wang *et al.* 2005) y anfibios (Yamada *et al.* 2008) con el fin de evaluar la participación de AVT en los diferentes tejidos implicados en la osmoregulación.

La implicancia de AVT en el balance acuoso de *Bufo arenarum* cuando se realizan cambios repentinos en la osmolaridad del medio externo (de agua deionizada a 115 mM NaCl) fue analizada mediante la destrucción total del sistema hipofisario. Los resultados indicaron que la captación de agua no se vio afectada por el cambio de osmolaridad en los animales intactos ni en los hipofisectomizados, aunque en animales intactos sí se encuentra una reducción en la producción de orina la cual no se evidencia en los hipofisectomizados (Reboreda *et al.* 1987). Experimentos previos del laboratorio indican que la dosis necesaria

para el incremento de la tasa de captación de agua en animales intactos es de 1-10 µg/kg la cual es 100 veces mayor a la necesaria para producir una respuesta antidiurética significativa (Reboreda *et al.* 1987). Estos resultados indicarían que AVT produce una disminución en la producción de orina y afectaría pobremente o no afectaría la captación de agua.

Tomando en cuenta (1) los antecedentes presentados sobre acuaporinas y su función en la captación de agua en los anfibios, (2) los datos previos desarrollados en nuestro laboratorio en la especie (realizados antes del descubrimiento de las acuaporinas en 1995 por Agre y Nielsen) que involucran procedimientos de incremento de los niveles plasmáticos de AVT mediante la inyección de AVP o la disminución de los mismos por lesión, a nivel central, de su sistema productor, y (3) la reciente aparición de un inhibidor específico de los receptores V2 de AVT -OPC31260- (conociendo que estos receptores estarían implicados en la exposición de las acuaporinas vesiculares en la membrana plasmática de las células principales de la piel), se prosiguió el estudio de la variación de peso de los anfibios cuando se bloquean los receptores V₂ de AVT, en animales a los que se les generó distintas concentraciones endógenas de dicha hormona debido a que se los llevó a diferentes grados de deshidratación.

En los siguientes experimentos se evaluó si la administración aguda de OPC31260 en animales con distintos niveles de deshidratación genera diferencias en la variación de peso o en la permeabilidad al agua de la piel de los animales: en el

primero, exponiendo a los sapos a un medio externo isosmótico (solución 115 mM de NaCl); y el segundo, exponiéndolos a un medio externo levemente hiperosmótico (solución 300 mM de NaCl).

Experimento 6: Efecto de la administración de un antagonista de AVT –OPC31260- sobre la captación de agua a diferentes niveles de deshidratación en una solución isosmótica

Materiales y métodos

Sujetos: Se utilizaron 80 sapos machos adultos de la especie *Rhinella arenarum* de la Provincia de Buenos Aires.

Selección de los sujetos y procedimiento previo general: Se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 1.

Procedimiento experimental: Los animales seleccionados previamente fueron divididos en seis grupos. Los grupos fueron los siguientes:

- 100% (n=13) y 100% + OPC31260 (n=11) (en su peso estándar, PS).

- 90% (n=11) y 90% + OPC31260 (n=12) (deshidratados un 10% del PS).

- 80% (n=12) y 80% + OPC31260 (n=12) (deshidratados un 20% del PS).

El día previo a comenzar con el experimento se determinó el peso estándar (PS) de los animales y se utilizó la misma balanza del Experimento 1. Los valores variaron entre 57,2 g a 168,5 g. No registrándose diferencias entre los PSs de los mismos ($F_{(5,67)}=0,215, p=0.95$).

Luego de la determinación de peso (vaciamiento de las vejigas de los individuos) se los dejó en sus respectivos recipientes durante 8 horas aproximadamente a fin de estabilizar sus parámetros fisiológicos. A continuación se les inyectó 5 μ litro/g de animal del antagonista de AVT (dosis 4 μ moles/kg de animal) o el mismo volumen del vehículo (Solución de Ringer`s: Glucosa 0,99gr/l, NaHCO₃ 0,19gr/l, KCl 0,25gr/l, CaCl₂ 0,30gr/l, NaCl 6,48gr/l) más 7% de Dimetilsulfóxido -DMSO-) según correspondiese. Al cabo de 30 minutos se los colocó en jaulas de deshidratación a fin de que lleguen al peso establecido. Cuando todos los animales llegaron al peso se los colocó por 30 minutos en sus respectivos recipientes y luego se comenzó el experimento. Los animales permanecieron por 180 minutos en un recipiente con 150 ml de una solución de 115 mM de NaCl. La variación de peso de los individuos fue registrada cada 15 minutos durante el período que duró el experimento.

Los animales que mostraron una variación negativa desproporcionada de peso durante el tiempo de permanencia en el recipiente, fueron excluidos del análisis general y se realizó un análisis separado de estos datos.

Estadística: Se realizó el análisis de los datos mediante ANOVA de dos factores y de una vía con contrastes a posteriori mediante el test LSD. En todos los casos para estas comparaciones la significancia fue evaluada estableciendo el valor de alfa en el nivel 0.05.

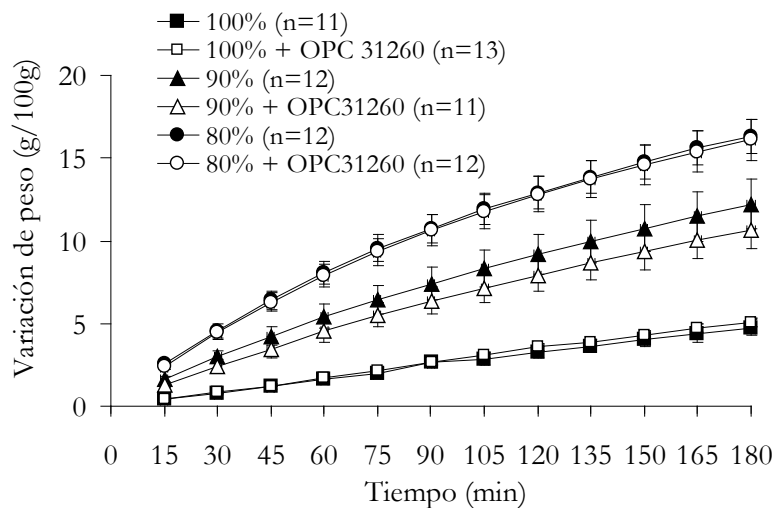


Fig. 22: Variación de peso de los animales a través del tiempo, expuestos a una solución 115 mM de NaCl, inyectados antes de la deshidratación con OPC31260 o solución vehículo según correspondiera. Las barras representan el error estándar.

Resultados

Los datos mostraron que los animales aumentaron su captación de agua a medida que transcurre el tiempo ($F_{(11,715)}=559,07$, $p<0,001$). Globalmente se observa que a mayor deshidratación los sapos aumentaron la captación de agua ($F_{(2,65)}=62,26$, $p<0,001$), y que este efecto se verifica desde los primeros 15 minutos de exposición ($F_{(2,65)}=82,65$, $p<0,001$, análisis a posteriori LSD 80-90 $p<0,001$, 90-100 $p<0,001$ y 80-100 $p<0,001$). No se encontraron diferencias significativas en la variación de peso por efecto de OPC31260 ($F_{(1,65)}=0,35$, $p=0,55$) así como tampoco interacción entre los factores ($F_{(2,65)}=0,39$, $p=0,68$) (Figura 22).

La permeabilidad de los grupos expuestos a 115 mM de NaCl con o sin OPC31260 se mantuvo constante

(100% sin OPC31260 $T_{15} = 4,88 \times 10^{-5}$ a $T_{180} = 3,75 \times 10^{-5}$ $R^2=0,0077$; 90% sin OPC31260 $T_{15} = 9,11 \times 10^{-5}$ a $T_{180} = 7,76 \times 10^{-5}$ $R^2=0,16$; 80% sin OPC31260 $T_{15} = 5,84 \times 10^{-5}$ a $T_{180} = 4,03 \times 10^{-5}$ $R^2=0,26$; 100% con OPC31260 $T_{15} = 5,22 \times 10^{-5}$ a $T_{180} = 2,44 \times 10^{-5}$ $R^2=0,06$; 90% con OPC31260 $T_{15} = 4,59 \times 10^{-5}$ a $T_{180} = 5,55 \times 10^{-5}$ $R^2=0,19$; 80% con OPC31260 $T_{15} = 5,05 \times 10^{-5}$ a $T_{180} = 4,62 \times 10^{-5}$ $R^2=0,38$) (Figura 23).

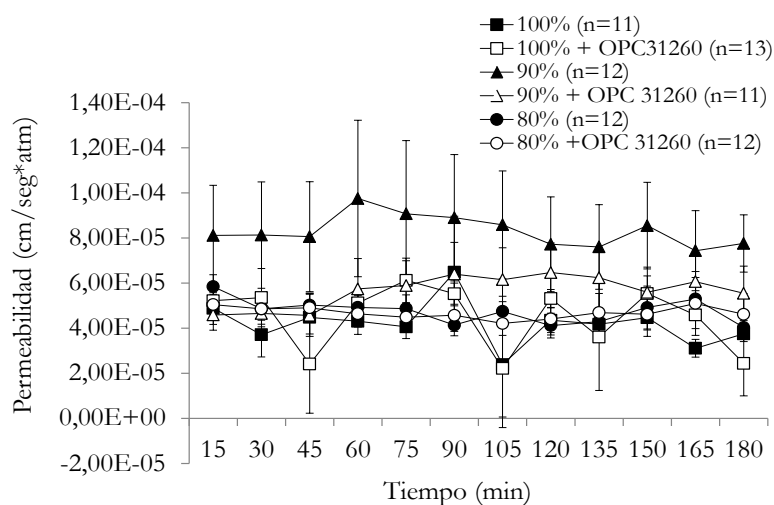


Fig. 23: Permeabilidad de la piel de los sapos a través del tiempo cuando son expuestos a una solución 115 mM de NaCl con y sin OPC31260. Las barras indican el error estándar.

En general se observa que el grupo 90% de deshidratación tiene una tendencia a mostrar una permeabilidad mayor que el resto de los grupos, aunque esta tendencia está presente desde el inicio del ensayo. A los 15 minutos de exposición no se encontraron diferencias debidas al nivel de deshidratación ($F_{(2,66)} = 0,73$; $p=0,48$), ni por la droga ($F_{(1,66)} = 1,93$; $p=0,17$) y tampoco se encontró interacción entre los factores. A los 180 minutos se encontró que el grupo 90% de deshidratación tuvo una permeabilidad mayor que el resto de los grupos ($F_{(2,66)}=5,6$, $p<0,05$; LSD 100% - 90% $p<0,05$; 90%-80% $p<0,05$; 100% - 80% $p=0,22$), mientras que no se encontraron diferencias por efecto de la droga ($F_{(1,66)} = 1,25$; $p=0,26$) ni interacción entre los factores ($F_{(2,66)} = 0,87$; $p=0,42$).

Del análisis presentado anteriormente se excluyeron los animales que experimentaron una reducción abrupta de su peso durante el tiempo de permanencia en el contenedor (lo cual podría reflejar la orina eliminada durante el ensayo). Como era esperado, se observó una mayor cantidad de animales hidratados al 100% que eliminaron orina durante el experimento que el resto de los grupos, pero los sapos hidratados al 100% e inyectados con OPC31260 lo hicieron en mayor proporción (grupo 100% + OPC31260: 7 de 21; grupo 100%: 1 de 12; grupo 90% + OPC31260: 1 de 12; en los demás grupos ninguno).

Por lo tanto, mediante el bloqueo de los receptores V2 de AVT en estas condiciones, no se observaron variaciones en el peso de animales al 80% de su PS (condición de hidratación necesaria para luego usar

dichas soluciones en los entrenamientos comportamentales).

Experimento 7: Efecto de la administración de un antagonista de AVT –OPC31260- sobre el intercambio hidrosalino a diferentes niveles de deshidratación en una solución levemente hiperosmótica

Materiales y Métodos

Sujetos: Se utilizaron 36 sapos machos adultos de la especie *Rhinella arenarum* de la Provincia de Buenos Aires.

Selección de los sujetos y procedimiento previo general: Se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 1.

Procedimiento experimental: Los animales seleccionados previamente fueron divididos en seis grupos. Los grupos fueron los siguientes:

- 100% (n=6) y 100% + OPC31260 (n=5) (en su peso estándar, PS).
- 90% (n=6) y 90% + OPC31260 (n=6) (deshidratados un 10% del PS).
- 80% (n=6) y 80% + OPC31260 (n=6) (deshidratados un 20% del PS).

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el experimento anterior pero con la diferencia que el recipiente experimental contenía una solución de 300 mM de NaCl.

Estadística: Se realizó el análisis de los datos mediante ANOVA de dos factores y de una vía con contrastes a posteriori mediante el test LSD. En todos los casos para estas comparaciones la significancia

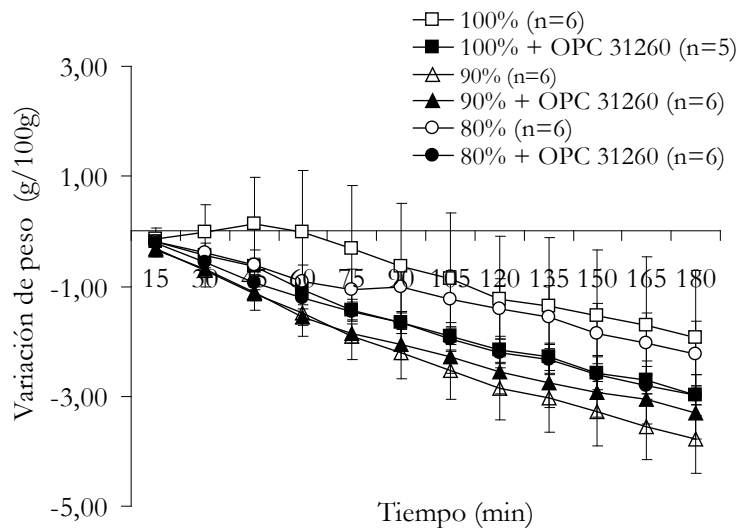


Fig. 24: Variación de peso de los animales a través del tiempo, expuestos a una solución 300 mM de NaCl, inyectados antes de la deshidratación con OPC31260 o solución vehículo, según correspondiera. Las barras representan el error estándar.

fue evaluada estableciendo el valor de alfa en el nivel 0.05.

Resultados

Los resultados mostraron que los animales luego de 180 minutos en una solución hipertónica con respecto a su plasma se deshidratan. La máxima pérdida promedio fue -3,78 g/100g en el grupo 90% y la mínima de -1,94 g/100g en el grupo 100% sin OPC31260. No se encontraron diferencias debidas al nivel de deshidratación ($F_{(2,29)} = 4,03$; $p=0,19$), ni por la droga ($F_{(1,29)} = 1,71$; $p=0,40$) y tampoco interacción entre los factores ($F_{(2,29)}=1,9$; $p=0,45$) (Figura 24).

La permeabilidad de los grupos expuestos a 300 mM de NaCl con o sin OPC31260 se mantuvo constante (100% sin OPC31260 $T_{15} = 1,69 \times$

10^{-6} a $T_{180} = 1,99 \times 10^{-6}$ $R^2=0,0053$; 90% sin OPC31260 $T_{15} = 2,51 \times 10^{-6}$ a $T_{180} = 2,22 \times 10^{-6}$ $R^2=0,49$; 80% sin OPC31260 $T_{15} = 1,77 \times 10^{-6}$ a $T_{180} = 2,78 \times 10^{-6}$ $R^2=0,06$; 100% con OPC31260 $T_{15} = 1,77 \times 10^{-6}$ a $T_{180} = 2,77 \times 10^{-6}$ $R^2=0,15$; 90% con OPC31260 $T_{15} = 3,10 \times 10^{-6}$ a $T_{180} = 2,40 \times 10^{-6}$ $R^2=0,28$; 80% con OPC31260 $T_{15} = 3,30 \times 10^{-6}$ a $T_{180} = 2,60 \times 10^{-6}$ $R^2=0,06$) (Figura 25). La permeabilidad a los 180 minutos no se

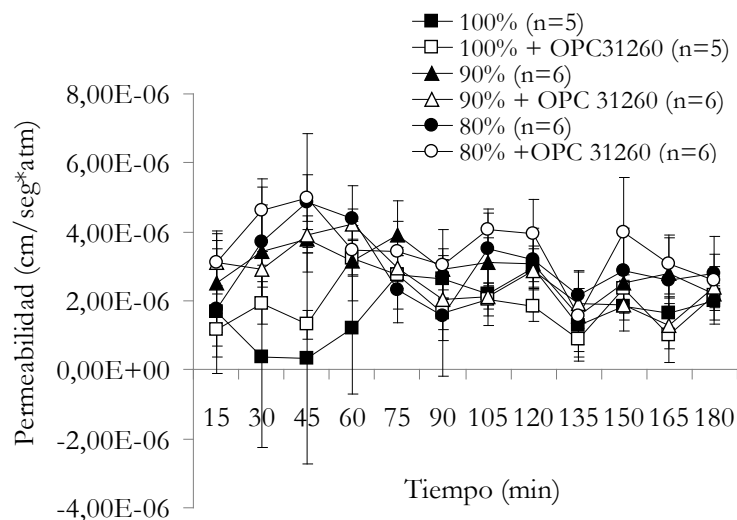


Fig. 25: Permeabilidad de la piel de los sapos a través del tiempo cuando son expuestos a una solución 300 mM de NaCl con y sin OPC31260. Las barras indican el error estándar.

vió afectada por la deshidratación ($F_{(2,29)} = 0,35$; $p=0,70$), ni por la droga ($F_{(1,29)} = 0,01$; $p=0,92$) y tampoco hubo interacción entre los factores ($F_{(2,29)} = 0,04$; $p=0,96$).

Por lo tanto, tampoco se hallaron diferencias debidas a la administración del antagonista de los receptores V_2 de AVT en un medio levemente hiperosmótico.

En vista de los resultados anteriores y con el fin de evaluar si la administración crónica de OPC31260 en animales con altos niveles de deshidratación (20% del PS) podría producir diferencias en la captación de agua se realizó el siguiente experimento.

Experimento 8: Efecto de la administración crónica de un antagonista de AVT -OPC31260- sobre la captación de agua en un estado de deshidratación elevado en una solución isosmótica

Materiales y Métodos

Sujetos: Se utilizaron 32 sapos machos adultos de la especie *Rhinella arenarum* de la Provincia de Buenos Aires.

Selección de los sujetos y procedimiento previo general: se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 1.

Procedimiento experimental: Los animales seleccionados previamente fueron divididos en dos grupos. Los grupos fueron los siguientes:

- 80% (n=15) (deshidratados un 20% del PS)
- 80% + OPC31260 (n=16) (deshidratados un 20% del PS)

Luego de la determinación de peso se colocó a los animales en sus respectivos recipientes durante 8 horas aproximadamente a fin de estabilizar sus parámetros fisiológicos. A continuación se les inyectó 5 μ litro/g de animal del antagonista de AVT (dosis 4 μ moles/kg de animal) o el mismo volumen del vehículo (Solución de Ringer`s) según correspondiese durante 5 días consecutivos. El día 5 luego de la inyección de antagonista o vehículo se esperaron 30 minutos y se comenzó la deshidratación de los mismos. Cuando todos los animales llegaron al peso correspondiente se los colocó otros 30 minutos en sus respectivos recipientes y luego se comenzó el experimento. Los animales permanecieron por 180 minutos en un recipiente con 150 ml de una solución de 115 mM de NaCl. La variación de peso de los individuos fue registrada cada 15 minutos durante el período que duró el experimento. Aquellos sapos que orinaron durante los días de previos o durante el experimento fueron descartados del análisis.

Estadística: Se realizó el análisis de los datos mediante ANOVA de una vía con contrastes a posteriori mediante el test LSD. En todos los casos para estas comparaciones la significancia fue evaluada estableciendo el valor de alfa en el nivel 0.05.

Resultados

En términos generales, los animales mantenidos durante 5 días a una deshidratación del 20% de su peso estándar y expuestos a una solución de 115 mM de NaCl durante 180 minutos mostraron un aumento promedio de peso de 19,20 g/ 100g de PS. Sin embargo, no se observaron efectos de la administración crónica de OPC31260

para dicho nivel de deshidratación ($F_{(1,29)}=0,53$ $p=0.47$) (Figura 26).

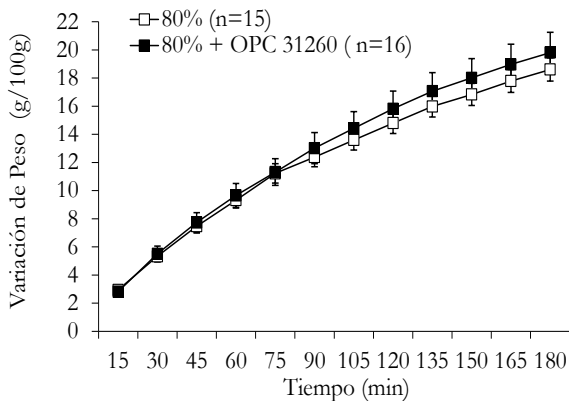


Fig. 26: Variación de peso de los animales a través del tiempo, los cuales previamente fueron inyectados durante 5 días con solución de OPC31260 o solución vehículo, expuestos a una solución 115 mM de NaCl. Las barras representan el error estándar.

Discusión de los experimentos 6, 7 y 8

Los resultados obtenidos en estos experimentos indican que, independientemente del nivel de hidratación, la variación de peso experimentada por *Rhinella arenarum* cuando se lo expone a soluciones externas de diferentes osmolaridad no involucraría a los receptores V2 de AVT. Estos datos ampliarían los encontrados por Rebores y colaboradores (1991) quienes reportaron poca o nula participación de la hormona AVT en la captación de agua antes del descubrimiento de la existencia de las acuaporinas. Otros géneros en los cuales se produce una pequeña o nula respuesta de AVT sobre la permeabilidad o respuesta de la piel son *Necturus* (Bentley y Yorio 1977), *Xenopus* y *Dicoglossus* (Heller y Bentley 1965). Hillyard (1975, 1976) encontró que la piel de *Scaphiopus couchii* respondía a AVT

sólo en los primeros días después de salir del letargo, pero no durante la época de reproducción o después de haber estado en el laboratorio durante varias semanas.

Nuestros datos no apoyarían el modelo propuesto para *Hyla japonica* en el cual la unión de AVT con los receptores V2 implicaría la translocación de las acuaporinas que están en vesículas hacia la membrana plasmática. Varias razones podrían explicar las diferencias con este modelo en *H. japonica*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en nuestro modelo, la más parsimoniosa es que el mecanismo implicado en *R. arenarum* no involucraría los receptores V2 de AVT. Si bien se han encontrado AQP2 y AQP3 en la piel de especies del género *Bufo* (Ogushi *et al.* 2010), no hay hasta el momento estudios sobre la distribución de estas acuaporinas en la piel de *R. arenarum*, con lo cual cabe la posibilidad de que no se encuentren o estén distribuidas de otra manera.

Si bien el objetivo del experimento fue analizar la participación de los receptores V2 en la captación de agua, es interesante destacar que el bloqueo de los mismos produjo una tendencia a una mayor eliminación de orina en los animales hidratados al 100% de su peso estándar con respecto a los otros grupos de animales deshidratados, lo cual podría atribuirse al bloqueo de la acción antidiurética que posee la hormona AVT.

Un aspecto complementario que requeriría de una investigación más exhaustiva es el estudio de la participación de OPC31260 en la producción o liberación de orina en los sapos, dado que esa es la aplicación potencial

de la droga en humanos (Takahashi *et al.* 2012).

Al no obtener variaciones en el peso de los animales, mediante el bloqueo de los receptores V2 de AVT que pudiéramos usar luego en los entrenamientos comportamentales, decidimos continuar nuestra investigación manipulando los mecanismos nerviosos que potencialmente regulan la variación de peso. Dentro de estos mecanismos nerviosos nos centramos en la acción de las vías colinérgicas mediante la utilización de atropina (un antagonista de acetilcolina).

SERIE EXPERIMENTAL 4

Estudio de los mecanismos nerviosos reguladores del intercambio iónico y acuoso

Introducción

La implicancia del sistema nervioso autónomo en el balance acuoso fue una de la hipótesis planteadas por Segura y colaboradores (1982) en base a sus resultados sobre (1) el balance de agua negativo que poseían los sapos de nuestra especie en estudio *R. arenarum* que eran sometidos a una manipulación constante y (2) la gran captación de agua inducida por la anestesia general administrada que persistía aun cuando el sistema productor de la hormona antidiurética era totalmente destruido. Experimentos posteriores de Segura y colaboradores (1982b) y Reboreda y colaboradores (1991) confirman la participación del sistema autónomo simpático en la captación de agua de sapos totalmente hidratados y

deshidratados un 80% de su peso estándar. En este último trabajo, los resultados apoyan la hipótesis de la participación de los receptores β -adrenérgicos en el control de la permeabilidad al agua de la piel de los sapos durante la rehidratación. La administración sistémica del agonista β -adrenérgico, isopoteranol (5 mg / kg), en animales totalmente hidratados aumentó la permeabilidad de la piel a los valores observados en animales deshidratados al 80% de su PS luego de 90 minutos de iniciada. Dicho efecto también se encontró en *Scaphiopus couchi*, *Bufo cognatus* y *Bufo bufo* (Hillyard 1979, Viborg y Rosenkilde 2004, Yokota y Hillman 1984).

La acción adrenérgica aparentemente es independiente de la acción de AVT y tiene un efecto aún más fuerte sobre la permeabilidad de la piel. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de la importancia fisiológica de estos efectos o su relación con la ecología de los anfibios.

La participación del sistema nervioso autonómico parasimpático en el balance acuoso ha sido menos estudiada. Estudios in vitro, realizados por Kirschner en 1953 y 1955, en *Rana esculenta* mostraron que la adición de atropina (antagonista competitivo del receptor muscarínico de acetilcolina) en la cara apical de la piel produce un aumento en la entrada de sodio hacia el compartimento basolateral. Dicho efecto, al menos en concentraciones por debajo de 10 mM/L, se mantiene durante todo el tiempo que el compuesto está en el baño. La piel es capaz de responder a un incremento de atropina aun luego de 5 horas en el baño. Pero si la atropina

era administrada en el lado basolateral, el efecto era sólo transiente. El efecto es completamente reversible y se puede obtener un resultado similar si se utiliza tubocurarina (principio activo del curare: antagonista de los receptores nicotínicos de acetilcolina).

Existe un solo registro realizado en nuestro laboratorio en el cuál se abordó un estudio acerca del efecto de atropina. En dicho experimento animales hidratados al 100% de su peso estándar eran separados en tres grupos (lesionados en el mesencéfalo, totalmente hipofisectomizados postquirúrgicamente y con operación simulada – sham-), inyectados con atropina (3mg/kg disuelto en 115 mM de NaCl) y colocados en un recipiente con agua corriente durante 3 horas. Los animales eran pesados cada 15 minutos y se les vaciaba la vejiga antes de colocarlos nuevamente en el recipiente. Luego de esta manipulación no se encontró efecto de atropina en la captación de agua ni en la producción de orina en todos los grupos (Segura, 1982b).

Por otra parte, en pruebas comportamentales preliminares, realizadas también en nuestro laboratorio, en las que se investigaba la implicancia de las vías colinérgicas en el aprendizaje y memoria de una tarea instrumental, se encontró una tendencia a una mayor captación de agua de los animales a los cuales se les administraba atropina crónicamente durante 5 días (Lic. Puddington M.M., comunicación personal). Dada la existencia de esta tendencia encontrada en animales deshidratados un 80% de su peso estándar, los cuales estaban sometidos a una situación de

aprendizaje similar a las expuestas en los experimentos realizados para esta tesis se decidió analizar la implicancia de las vías colinérgicas en la variación de peso de los sapos.

Se programaron así dos experimentos en los que se evaluaría si la administración aguda de Atropina en animales con distintos niveles de deshidratación genera diferencias en la captación de agua: uno, exponiendo a los sapos a un medio externo isosmótico (solución 115 mM de NaCl); y el otro, exponiéndolos a un medio externo levemente hiperosmótico (solución 300 mM de NaCl).

Experimento 9: Efectos de la administración de Atropina (anticolinérgico) sobre la captación de agua a diferentes niveles de hidratación en una solución isosmótica

Materiales y métodos

Sujetos: Se utilizaron 36 sapos machos adultos de la especie *Rhinella arenarum* de la Provincia de Buenos Aires.

Selección de los sujetos y procedimiento previo general: se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 1.

Procedimiento experimental: Los animales seleccionados previamente fueron divididos en seis grupos. Los grupos fueron los siguientes:

- 100% (n=6) y 100% + Atropina (n=6) (en su peso estándar, PS).
- 90% (n=6) y 90% + Atropina (n=6) (deshidratados un 10% del PS).

- 80% (n=6) y 80% + Atropina (n=6) (deshidratados un 20% del PS).

El día previo a comenzar con el experimento se determinó el peso estándar (PS) de los animales y se utilizó la misma balanza del Experimento 1.. Los valores variaron entre 72 g a 134,9 g. No registrándose diferencias entre los PSs de los mismos ($F_{(5,30)}=0,15, p=0.98$).

Luego de la determinación de peso (vaciamiento de las vejigas de los individuos) se los dejó en sus respectivos recipientes durante 8 horas aproximadamente a fin de estabilizar sus parámetros fisiológicos. Se los colocó en jaulas de deshidratación a fin de que lleguen al peso establecido en el grupo al que fueron asignados azarosamente. Cuando todos los animales llegaron al peso se los colocó por 30 minutos en sus respectivos recipientes. A continuación se les inyectó 5 μ litro/g de animal de Atropina (dosis 150 mg/kg de animal) o el mismo volumen de solución de solución de Ringer`s según correspondiese. Se los colocó nuevamente por 30 minutos en sus recipientes y luego se dio comienzo al experimento. Los animales permanecieron por 180 minutos en un recipiente con 150 ml de una solución de 115 mM de NaCl. La variación de peso de los individuos fue registrada cada 15 minutos durante el período que duró el experimento.

Los animales que mostraron una variación negativa desproporcionada de peso durante el tiempo de permanencia en el recipiente, fueron excluidos del análisis general. Se realizó un análisis cualitativo del estado de los animales durante el tiempo de permanencia en la solución.

Estadística: Se realizó el análisis de los datos mediante ANOVA de dos factores y de una vía con contrastes a posteriori mediante el test LSD. En todos los casos para estas comparaciones la significancia fue evaluada estableciendo el valor de alfa en el nivel 0.05.

Resultados

Los resultados indican que la captación de agua ya había aumentado debido al bloqueo de los receptores muscarínicos colinérgicos a los 15 minutos de exposición aguda a una solución 115 mM de NaCl ($F_{(1,30)}=4,6, p<0,05$). Al igual que en los experimentos anteriores, a medida que el nivel de deshidratación era mayor aumentaba la

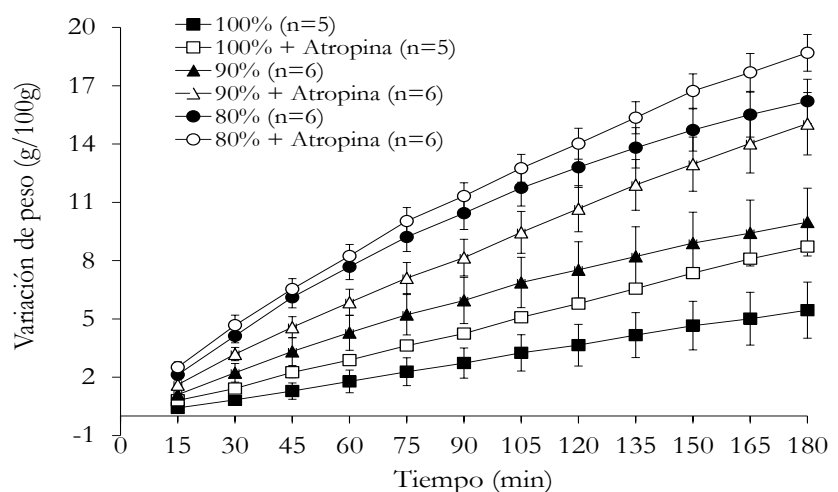


Fig. 27: Variación de peso de los animales a través del tiempo, expuestos a una solución 115 mM de NaCl, inyectados luego de la deshidratación con atropina o solución de Ringer`s, según correspondiera. Las barras representan el error estándar.

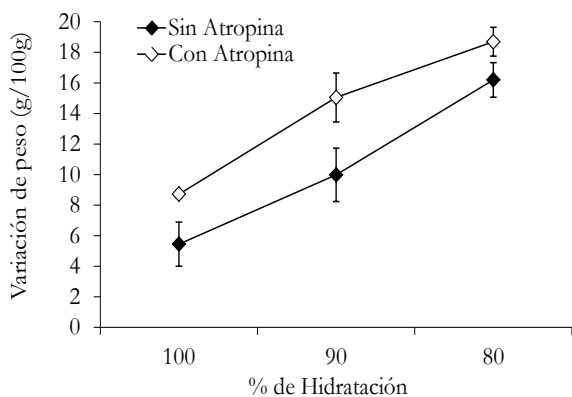


Fig. 28: Variación de peso (g/100g) a los 180 minutos para los diferentes grados de deshidratación de los individuos en los grupos inyectados con Atropina o solución de Ringer`s. Las barras representan el error estándar.

captación de agua ($F_{(2,30)}=34,7$, $p<0,001$; LSD 100-90 $p>0,05$; 90-80 $p<0,05$; 100-80 $p<0,05$). No se encontró interacción entre los factores ($F_{(2,30)}=$, $p>0,05$) (Figura 27).

Cabe destacar que el aumento en la captación de agua que genera el tratamiento con atropina produjo una captación similar a la que se origina en el nivel de deshidratación siguiente (Figura 28).

La permeabilidad se mantuvo constante a lo largo del tiempo en todos los grupos expuestos a una solución de 115 mM de NaCl (80% T15= $4,73 \times 10^{-5}$ a T180 = $3,60 \times 10^{-5}$ $R^2=0,35$; 90% T15= $4,00 \times 10^{-5}$ a (T180) = $5,30 \times 10^{-5}$ $R^2=0,172$; 100% T15= $4,63 \times 10^{-5}$ a (T180) = $4,61 \times 10^{-5}$ $R^2=0,038$). Para los grupos que estuvieron expuestos a atropina se encontró que el grupo 90% (T15= $6,29 \times 10^{-5}$ a (T180) = $1,09 \times 10^{-4}$ $R^2=0,67$) y el grupo 80% (T15= $5,97 \times 10^{-5}$ a (T180) = $8,88 \times 10^{-5}$ $R^2=0,63$) aumentaron su permeabilidad, mientras que el grupo 100% (T15= $3,56 \times 10^{-5}$ a (T180) = $2,25 \times 10^{-5}$ $R^2=0,14$) se mantuvo estable (Figura 29).

A los 15 minutos de exposición no se encontró efecto de la deshidratación ($F_{(2,64)}=1,95$; $p=0,15$), ni de la amilorida ($F_{(1,64)}=2,7$; $p=0,10$) y tampoco hubo interacción entre los factores ($F_{(2,64)}=0,12$; $p=0,88$) sobre la permeabilidad de la piel de los sapos. Si este mismo análisis se realiza a los 120 minutos se observa que la exposición de los sapos a atropina aumentó

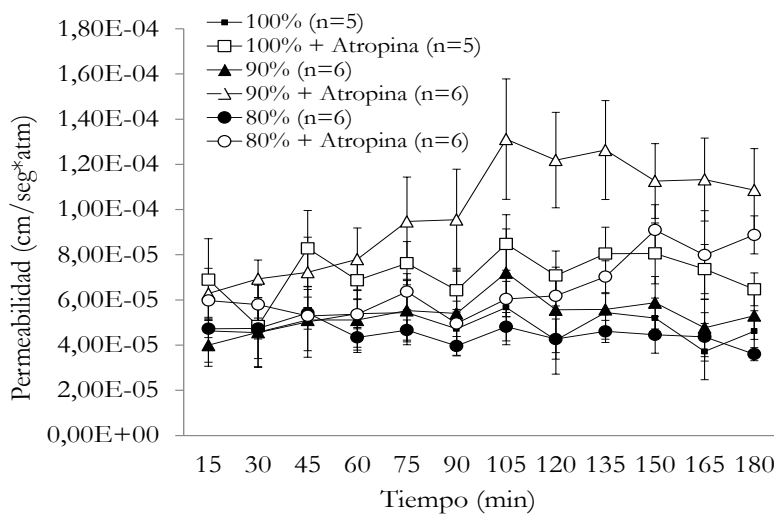


Fig. 29: Permeabilidad de la piel de los sapos a través del tiempo cuando son expuestos a una solución 115 mM e inyectados con solución de Ringer`s o Atropina. Las barras indican el error estándar.

la permeabilidad ($F_{(1,64)} = 12,92$; $p < 0,001$). Para el grupo 90% fue mayor que la del grupo 80% e igual que la del grupo 100%, mientras que la del grupo 100% no se diferenció de la del grupo 80% ($F_{(2,64)} = 3,55$; $p < 0,05$; LSD 90%-80% $p < 0,05$; 90%-100% $p = 0,19$ y 100%-80% $p = 0,2$) y no se encontró interacción entre los factores ($F_{(2,64)} = 1,50$; $p = 0,23$) (Figura 30).

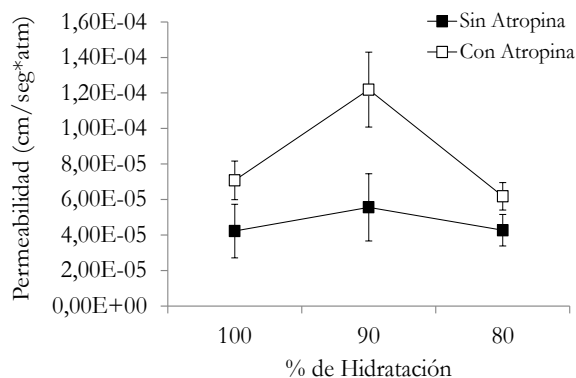


Fig. 30: Permeabilidad de la piel de los sapos a los 120 minutos de exposición a una solución 115 mM de NaCl con y sin Atropina. Las barras indican el error estándar.

Experimento 10: Efectos de la administración de Atropina sobre la captación de agua a diferentes niveles de hidratación del sapo común en una solución levemente hipertónica

Materiales y Métodos

Sujetos: Se utilizaron 58 sapos machos adultos de la especie *Rhinella arenarum* de la Provincia de Buenos Aires.

Selección de los sujetos y procedimiento previo general: Se realizó el mismo procedimiento que en el Experimento 1.

Procedimiento experimental: Los animales seleccionados previamente fueron divididos en seis grupos. Los grupos fueron los siguientes:

- 100% (n=9) y 100% + Atropina (n=9) (en su peso estándar, PS)

- 90% (n=9) y 90% + Atropina (n=9) (deshidratados un 10% del PS)

- 80% (n=9) y 80% + Atropina (n=13) (deshidratados un 20% del PS)

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el experimento anterior pero con la diferencia que el recipiente experimental contenía una solución de 300 mM de NaCl.

Los animales que en algún momento de las tres horas de permanencia presentaban pérdida de reflejos y falta de movimiento fueron descartados del análisis.

Estadística: Se realizó el análisis de los datos mediante ANOVA de dos factores y de una vía con contrastes a posteriori mediante el test LSD. En todos los casos para estas comparaciones la significancia fue evaluada estableciendo el valor de alfa en el nivel 0.05.

Resultados

En general, se observó que los animales perdieron peso a lo largo del tiempo cuando fueron expuestos a la solución levemente hiperosmótica de 300 mM de NaCl. Al cabo de 180 minutos, la pérdida de peso fue mayor para los grupos hidratados un 100% (-3,9 g/100g) y un 90% (-3,5 g/100g) que para los animales que presentaban una hidratación del 80% al inicio del experimento (-2,2 g/100g) ($F_{(2,46)} = 6,35$, $p < 0,05$; LSD 100-80 $p < 0,05$, 90-80 $p < 0,05$ y 100-90 $p > 0,05$). No se encontró efecto de atropina ($F_{(1,46)} = 0,19$, $p > 0,05$), ni interacción entre los factores ($F_{(2,46)} = 0,36$, $p > 0,05$) (Figura 31).

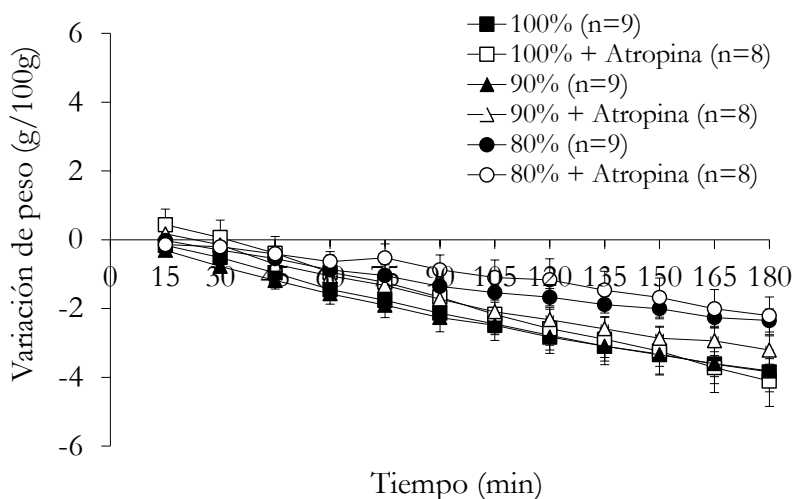


Fig. 31: Variación de peso de los animales a través del tiempo, expuestos a una solución 300 mM de NaCl, inyectados luego de la deshidratación con Atropina o Solución de Ringer's, según correspondiera. Las barras indican el error estándar.

El análisis cualitativo de los animales durante las tres horas de exposición a la solución mostró que el 38% de los sapos del Grupo 80% con atropina presentaron pérdida de reflejos y fueron eliminados del análisis. El 11% de los animales (1 de 9) del grupo 90% con atropina presentaron pérdida de reflejos, mientras que en el grupo

100% con atropina sólo se encontraron dos animales con falta de tonicidad muscular, pero con reflejos. Los animales en los grupos sin atropina no presentaron estos síntomas.

La permeabilidad se mantuvo constante a lo largo del tiempo en todos los grupos expuestos a una solución de 300 mM de

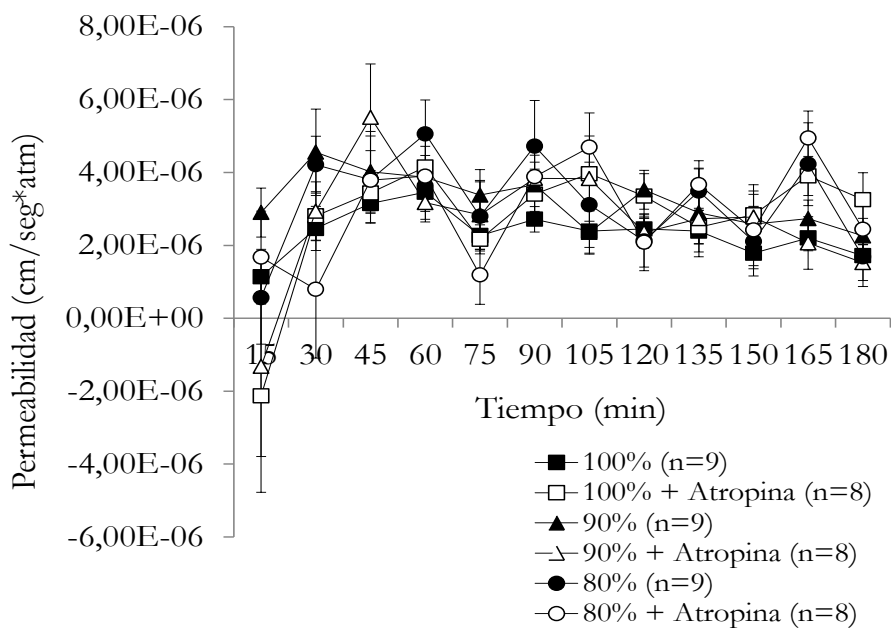


Fig. 32: Permeabilidad de la piel de los sapos a través del tiempo cuando son expuestos a una solución 300 mM de NaCl con y sin atropina. Las barras indican el error estándar.

NaCl inyectados con solución de Ringer's (100% T15= $1,14 \times 10^{-6}$ a T180 = $1,72 \times 10^{-6}$ $R^2=0,046$; 90% T15= $2,90 \times 10^{-6}$ a T180 = $2,26 \times 10^{-6}$ $R^2=0,47$; 80% T15= $5,65 \times 10^{-7}$ a T180 = $1,68 \times 10^{-6}$ $R^2=0,35$) y con atropina (100% T15= $-2,13 \times 10^{-6}$ a T180 = $3,25 \times 10^{-6}$ $R^2=0,21$; 90% T15= $-1,32 \times 10^{-6}$ a T180 = $1,53 \times 10^{-6}$ $R^2=3 \times 10^{-5}$; 80% T15= $1,68 \times 10^{-6}$ a T180 = $2,44 \times 10^{-6}$ $R^2=0,12$) (Figura 32).

A los 15 minutos, no se encontraron diferencias en la permeabilidad según la deshidratación ($F_{(2,46)}=0,55$ $p>0,05$), ni efecto de la Atropina ($F_{(1,46)}=2,60$ $p>0,05$) y tampoco hubo interacción entre los factores ($F_{(2,46)}=1,57$ $p>0,05$). En términos generales, el perfil observado en estos momentos iniciales se mantiene hasta los 180 minutos.

Discusión de los experimentos 9 y 10

Si bien la mayoría de los datos encontrados sobre la participación del sistema nervioso autónomo en la captación de agua refieren al sistema simpático a través de los receptores β -adrenérgicos (Segura *et al.* 1982b, Reboresda *et al.* 1991, Viborg y Rosenkilde 2004), nuestros datos muestran que además el sistema parasimpático, mediante las vías colinérgicas asociadas a los receptores muscarínicos, también estaría involucrado. La unión de acetilcolina a dichos receptores en la piel provocaría una inhibición de la captación de agua (disminuyendo la permeabilidad de la piel) que sería revertida mediante la administración de atropina. Sobre la base de nuestro conocimiento, éste constituye el primer hallazgo *in vivo* en anfibios de este fenómeno.

El tratamiento administrado a los animales del grupo 80% podría ser utilizado en experimentos comportamentales que requieran un cambio en la calidad del refuerzo, como por ejemplo investigar el comportamiento de contraste sucesivo negativo o positivo, tal como se hizo en experimentos previos (Muzio *et al.* 2011), pero ahora manipulando el control adrenérgico de la permeabilidad usando soluciones externas isosmóticas. Tal como se expresó en la introducción general,

a lo largo de todos los estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio, la magnitud del reforzador fue cambiada mediante la cantidad de agua destilada que se les daba a consumir (1 ml o 4 gotas de agua destilada) o el tiempo de exposición a agua deionizada (20s, 80s, 300s, 320s, 600s, o 1280s) o cambiando la osmolaridad de la solución externa (de agua deionizada a 225, 212 o 200 mM de NaCl) (Schmajuk *et al.* 1981, Muzio *et al.* 1992, Papini *et al.* 1995, Muzio *et al.* 2011). La utilización del tratamiento con atropina permitiría modificar la calidad del refuerzo manteniendo la osmolaridad externa constante. Este tratamiento no podría ser utilizado en protocolos donde la solución externa sea de 300 mM NaCl (levemente hiperosmótica y potencialmente aversiva) debido a que se encontró un alto porcentaje de animales que pierden los reflejos en dicha situación. Un análisis cuantitativo y en mayor profundidad sería necesario a fin de establecer si el efecto encontrado es significativo o no.

DISCUSIÓN GENERAL

Aprendizaje y Comportamiento

Para el estudio sistemático del comportamiento de los anfibios, en particular del aprendizaje, en los protocolos experimentales desarrollados en nuestro laboratorio se definieron, entre otros, los siguientes parámetros: reforzador (agua deionizada o distintas soluciones con diferentes concentraciones de cloruro de sodio), tiempo de reforzamiento (2, 5 o 10 minutos), nivel de deshidratación (80%).

Los reforzadores han sido clasificados, de acuerdo a la variación de peso que produce en los animales luego de ser expuesto al mismo, 1) apetitivo: los animales aumentan su peso debido a la captación de agua, 2) neutro: los animales no tienen variación en su peso, o sea, no ganan ni pierden agua y 3) aversivo: los animales pierden peso debido a la pérdida de agua (Daneri *et al.* 2007, Muzio *et al.* 2011). Los parámetros usados en los experimentos comportamentales realizados en esta tesis (agua deionizada o distintas soluciones con diferentes concentraciones de cloruro de sodio como reforzadores, 2 minutos de tiempo de reforzamiento y un nivel de deshidratación del 80% de su PS) mostraron que en dichas condiciones los sapos aprenden a encontrar un refuerzo apetitivo que se encuentra a la derecha o a la izquierda de su propia posición. Además, los animales aprenden la tarea de recorrer un corredor recto cuando al final del mismo encuentran una solución en la cual se pueden hidratar (refuerzo apetitivo) y no lo recorren cuando la solución que encuentran no les permite hidratarse (solución neutra) o se deshidratan (solución aversiva). De esta manera se demostró que los sapos cambian su comportamiento dependiendo del tipo de solución que encuentran como reforzador.

Los animales expuestos a una solución de 300 mM de NaCl son los únicos que cambian su conducta en el compartimento meta a lo largo de las sesiones. Estos animales no ganan ni pierden peso durante el tiempo de exposición a la solución, o sea no reciben ni recompensa ni castigo, pero aun así aumentan el tiempo de permanencia en la misma y la cantidad de desplazamientos

que realizan. Estos datos indican que los animales cambian su comportamiento aún cuando no varía su nivel de hidratación. Suponemos que este cambio podría estar asociado (en una situación inescapable como la presentada a estos animales) a una adaptación fisiológico-comportamental a fin de poder mantener su estado de hidratación o a un intento a largo plazo de tratar de conseguir mayores beneficios de una solución que no se los brinda de manera inmediata.

Las condiciones evaluadas en el laboratorio hasta la presente tesis, tomaron en cuenta la variación de osmolaridad del medio externo a fin de analizar distintas habilidades de aprendizaje. Adicionalmente, en esta tesis se estudió la modificación de diferentes mecanismos reguladores de la captación de agua a fin de obtener condiciones en las cuales cambie la captación de agua de los animales aun cuando la osmolaridad se mantenga constante, con el objeto de obtener así una nueva clase de diferentes reforzadores que puedan ser usados en futuros protocolos de comportamiento.

De las drogas evaluadas en esta tesis, las únicas que produjeron una diferencia en la captación de agua cuando la solución externa era apetitiva (115 mM de NaCl) fueron amilorida y atropina. Sin embargo, la variación en la captación de agua con ambas drogas en los animales hidratados al 80% de su peso estándar se produce en un período superior al tiempo de refuerzo establecido en los protocolos de aprendizaje instrumental, por lo cual se requiere una investigación más exhaustiva para establecer si es posible utilizar dichas

drogas en los protocolos de aprendizaje (por ejemplo, cambiando la concentración de la dosis o el momento de administración de la misma).

Experimentos en *Bufo alvarius* (Nagai *et al.* 1999) mostraron que los animales expuestos a una solución de 250 mM de NaCl con amilorida (10 μ M) permanecen más tiempo en postura de absorción de agua que en la solución de 250 mM de NaCl sola. Los autores postulan que el cambio en el tiempo de hidratación se debería a que el transporte transepitelial de sodio estaría acoplado a un mecanismo quimiosensorial de evaluación de la fuente de hidratación a la cual están expuestos los sapos. Resultados similares se encontraron en *B. punctatus* (Von Seckendorff Hoff y Hillyard 1993) y *B. marinus* (Maleek *et al.* 1999). Aunque se señala que a 300mM de NaCl la efectividad de la amilorida es menor (Nagai *et al.* 1999). Sería interesante investigar si este fenómeno también se produce en *Rhinella arenarum*. Más aún, dado que hemos encontrado que sin variación de peso la conducta de los sapos en el compartimento meta del corredor recto luego de 11 sesiones cambia (aumenta la permanencia en la pileta y la cantidad de desplazamientos), es esperable que en presencia de amilorida estos comportamientos se vean disminuidos, mostrando así una participación de mecanismos quimiosensitivos en estos comportamientos.

Fisiología de la variación de peso

Los primeros estudios desarrollados en *Rana pipiens* sobre la recaptación de agua

en los anfibios indicaban que la hormona AVT estaría involucrada en dicha función (Sawyer *et al.* 1959, Sawyer 1960a, b), pero resultados posteriores en los géneros *Necturus* (Bentley y Yorio 1977), *Xenopus* y *Dicoglossus* (Heller y Bentley 1965) y en *Scaphiopus couchii* (Hillyard 1975, 1976), *Rhinella (Bufo) arenarum* (Reboreda *et al.* 1987) junto a los presentes resultados indicarían que la misma no estaría implicada. Esto reflejaría que existe una variación entre especies del efecto de AVT sobre la recaptación de agua. Si bien en varios trabajos se ha intentado relacionar dicha variación en el efecto con diferencias filogenéticas o ambientales, todavía no se ha llegado a una clara conclusión debido a que en los experimentos que lo realizaron se confunde filogenia con ambiente, ya que las especies elegidas son de familias diferentes pero también presentan diferencias ambientales marcadas (Wells 2007).

Nuestros resultados indican que la permeabilidad de la piel de *R. arenarum* se ve afectada por los canales de sodio sensibles a amiloride y por las vías colinérgicas muscarínicas, mientras que no estaría involucrada la hormona AVT en esta capacidad. La misma se encuentra aumentada cuando se bloquean los receptores de las vías colinérgicas muscarínicas y disminuye cuando se bloquean los receptores β adrenergicos (Reboreda *et al.* 1991), lo cual no sólo está mostrando que estaría regulada por vías nerviosas, sino también que la acción adrenergica sería opuesta a la colinérgica. Los resultados presentados en esta tesis constituyen sobre la base de nuestro conocimiento el primer reporte in vivo de

la existencia de una regulación colinérgica sobre la permeabilidad de la piel en anfibios, revelando además que su acción es contraria a la vía adrenérgica.

La permeabilidad, a diferencia de la captación de agua, no se ve afectada por la hidratación inicial que presentan los animales al ser expuestos a una solución de 115 mM de NaCl. Estos resultados indican que las diferencias en la captación de agua podrían ser explicadas en su totalidad por un fenómeno de ósmosis, ya que al relativizar el flujo de agua por la diferencia entre la osmolaridad plasmática y la osmolaridad externa desaparecen tales diferencias.

Los resultados muestran que la captación y pérdida de agua es diferente dependiendo de la hidratación inicial de los animales. Dichas diferencias pueden ser explicadas por diferencias entre la osmolaridad plasmática y la osmolaridad interna, ya que no hay diferencias en la permeabilidad de los animales según el estado de deshidratación inicial que presentan los individuos.

En cuanto a las drogas administradas, ninguna produce efecto sobre la variación de peso, por lo cual no pueden ser utilizadas en protocolos de aprendizaje con los parámetros mencionados anteriormente, en especial en los que se quiera observar cambios según la aversividad de la solución presentada.

En resumen, la amilorida y la atropina varían la captación de agua a través de la piel en los animales que se encuentran expuestos a una solución apetitiva mientras que no ocurre lo mismo cuando la solución es aversiva. Estos resultados indican que los mecanismos involucrados en la

deshidratación por exposición a soluciones con alta salinidad no serían los mismos que los desencadenados cuando los animales pueden hidratarse desde soluciones con baja salinidad.

Es interesante destacar que la mayoría de los trabajos de investigación se basan en la recaptación de agua mediante la exposición de los animales a diferentes soluciones, pero son muy pocos o ninguno los que se centran en dilucidar los mecanismos involucrados en la evitación de la pérdida de agua cuando están expuestos a soluciones de alta salinidad, como es el caso de los experimentos planteados en esta tesis.

Finalmente, los resultados de esta tesis abren un interrogante sobre cuáles son los mecanismos que estarían involucrados en la evitación de la deshidratación de los sapos que están sometidos a ambientes de alta salinidad por un período prolongado, o que debido a la acción antrópica los mismos están expuestos a ambientes acuáticos salinizados.

Tomando los resultados de esta tesis en su conjunto, estamos ahora en condiciones de encarar futuro experimentos de aprendizaje (considerando la situación estándar de los protocolos de entrenamiento en sapos) utilizando soluciones salinas y manipulando los mecanismos colinérgicos asociados de intercambio hidrosalino, logrando así una variación de peso en los animales manteniendo la misma osmolaridad externa. Especialmente, soluciones salinas apetitivas de baja osmolaridad (por ejemplo, 115 mM de NaCl) en presencia de bloqueantes de los receptores colinérgicos muscarínicos, mediante atropina. Este

procedimiento ayudará a ampliar las condiciones de prueba a las que se puede exponer a los anfibios para verificar en este grupo la existencia de distintos fenómenos de aprendizaje, muchos de ellos con un origen temprano a nivel evolutivo (Muzio *et al.* 2011).

La manipulación de estos mecanismos fisiológicos, involucrados en la captación/pérdida de peso de los sapos, podrá ser entonces usada en animales al 80% de su PS para estudiar cambios sorpresivos en las condiciones de recompensa y/o castigo. De esta forma, la utilización de estos nuevos conocimientos ampliarán las posibilidades de entender la dinámica del balance hidrosalino en anfibios en situaciones de aprendizaje.

CONCLUSIONES GENERALES

- Sapos *Rhinella arenarum* parcialmente deshidratados aprenden a encontrar un reforzador apetitivo (agua deionizada) que se encuentra en una posición fija con respecto a su cuerpo (derecha o izquierda) (Experimento 1).

- La osmolaridad de la solución utilizada como refuerzo en un aprendizaje instrumental produce variación en el comportamiento de los individuos. Si la osmolaridad es nula (agua deionizada, reforzador apetitivo) los animales aumentan la rapidez de la respuesta con el entrenamiento. Por el contrario, si la osmolaridad de la solución es media (300mM de NaCl, solución neutra) o alta (800mM de NaCl, solución aversiva) ese comportamiento se inhibe desde la segunda sesión de entrenamiento (Experimento 2).

- En términos generales, a mayor deshidratación inicial mayor es la captación de agua que realizan los individuos expuestos a una solución de 115mM de NaCl (solución apetitiva), mientras que la permeabilidad de la piel no presenta variaciones. Este hecho muestra que las diferencias en la captación se deberían a la diferencia entre la osmolaridad plasmática y la osmolaridad externa (Experimento 3, 5, 6 y 9).

- La amilorida produce un aumento en la permeabilidad de la piel y en la captación de agua en sapos expuestos a una solución de 115mM de NaCl durante 180 minutos. Esto indica que existe una participación de los canales de sodio sensibles a amilorida en la permeabilidad de la piel (Experimento 3). Sin embargo, a los 15 minutos de exposición (tiempo máximo de reforzamiento utilizado en protocolos de aprendizaje) sólo los animales hidratados al 90% del PS muestran tales diferencias (esta condición de hidratación no es suficiente para generar una respuesta conductual motivada de forma estable).

- El benzamil produce un perfil general similar al que produce la amilorida en cuanto al aumento en la permeabilidad de la piel y en la captación de agua en una solución de 115mM de NaCl (Experimento 5).

- Globalmente, el bloqueo de los receptores V2 de AVT, mediante OPC31260, no produce cambios en la permeabilidad de la piel ni en la captación de agua de los animales (Experimentos 6 y 7). La administración crónica de OPC31260, durante 5 días, a animales deshidratados a un 80% de su PS no produce variación en la captación de agua

de los mismos respecto de sus controles (Experimento 8). Estos datos están en concordancia con los resultados de Reboreda y colaboradores (1991) sobre la poca o nula participación de la hormona AVT en el balance acuoso en *R. arenarum* (estudios que fueron realizados antes del descubrimiento de las acuaporinas).

- El bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos, mediante atropina, produce un aumento de la captación de agua y de la permeabilidad de la piel en sapos expuestos a una solución de 115mM de NaCl (solución apetitiva) desde los primeros 15 minutos (Experimento 9). El efecto contrario había sido encontrado cuando se bloquean los receptores β adrenérgicos (Reboreda *et al.* 1991). Estos resultados confirman que la captación de agua estaría regulada por vías nerviosas y, lo que es más significativo, que las vías colinérgicas actuarían de forma opuesta a las adrenérgicas. Sobre la base de nuestro conocimiento, este es el primer hallazgo *in vivo* en anfibios respecto del aumento de la captación de agua y de la permeabilidad de la piel por efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos de atropina, revelando también así una participación colinérgica en este fenómeno.

- Los animales expuestos a una solución de 300mM de NaCl no presentan cambios en la permeabilidad ni en la captación de agua cuando son tratados con amilorida, atropina u OPC31260 (Experimentos 4, 7 y 10). Esto indica que los mecanismos desencadenados cuando los animales se rehidratan en una solución de baja concentración salina (115 mM NaCl) serían diferentes a aquellos que se activan cuando se deshidratan a partir de

una solución de concentración media (300 mM NaCl).

- A partir de los resultados generales de esta tesis, estamos ahora en condiciones de desarrollar nuevos experimentos de aprendizaje en sapos que amplían las condiciones de entrenamiento usadas hasta el presente. En particular, empleando como reforzadores distintas soluciones salinas de cloruro de sodio y manipulando los mecanismos colinérgicos asociados de intercambio hidrosalino (por ejemplo, soluciones salinas externas apetitivas de baja osmolaridad, 115 mM de NaCl, en presencia de bloqueantes de los receptores colinérgicos muscarínicos mediante atropina).

BIBLIOGRAFÍA

- Acher, R., J. Chauvet and Y. Rouille (1997). "Adaptive evolution of water homeostasis regulation in amphibians: vasotocin and hydrins." *Biology of the Cell* 89(5-6): 283-291.
- Adler, K. (1980). "Individuality in the use of orientation cues by green frogs." *Animal Behaviour* 28(2): 413-425.
- Adolph, E. F. (1925). "The passage of water through the skin of the frog, and the relation between diffusion and permeability." *American Journal of Physiology--Legacy Content* 73(1): 85-105.
- Adolph, E. F. (1932). "The vapor tension relations of frogs." *Biological Bulletin* 62(1): 112-125.
- Adolph, E. F. (1933). "Exchanges of water in the frog." *Biological Reviews* 8(2): 224-240.
- Adolph, E. F. (1934). "Influences of the nervous system on the intake and excretion of water by the frog." *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 5(2): 123-139.
- Akabane, G., Y. Ogushi, T. Hasegawa, M. Suzuki and S. Tanaka (2007). "Gene cloning and expression of an aquaporin (AQP-h3BL) in the basolateral membrane of water-permeable epithelial cells in osmoregulatory organs of the tree frog." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292(6): R2340-R2351.
- Amsel, A. and M. Stanton (1980). *Ontogeny and Phylogeny of Paradoxical Reward Effects*. *Advances in the Study of Behavior*.
- R. A. H. C. B. Jay S. Rosenblatt and B. Marie-Claire, Academic Press. Volume 11: 227-274.
- Baldwin, R. A. (1974). "The water balance response of the pelvic "patch" of *Bufo punctatus* and *Bufo boreas*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 47(4): 1285-1295.
- Bentley, P. (1958). "The effects of neurohypophysial extracts on water transfer across the wall of the isolated urinary bladder of the toad *Bufo marinus*." *Journal of Endocrinology* 17(3): 201-209.
- Bentley, P. (1966). "Adaptations of Amphibia to arid environments." *Science (New York, NY)* 152(3722): 619.
- Bentley, P. J. and T. Yorio (1977). "The permeability of the skin of a neotenus urodele amphibian, the mudpuppy *Necturus maculosus*." *The Journal of physiology* 265(2): 537-547.
- Brattstrom, B. H. (1990). "Maze learning in the fire-bellied toad, *Bombina orientalis*." *Journal of herpetology*: 44-47.
- Brekke, D. R., S. D. Hillyard and R. M. Winokur (1991). "Behavior associated with the water absorption response by the toad, *Bufo punctatus*." *Copeia*: 393-401.
- Cei, J. (1959). "Ecological and physiological observations on polymorphic populations of the toad *Bufo arenarum* Hensel, from Argentina." *Evolution*: 532-536.
- Daneri, M. F., M. R. Papini and R. N. Muzio (2007). "Common toads (*Bufo arenarum*) learn to anticipate and avoid hypertonic saline solutions." *J Comp Psychol* 121(4): 419-427.

- Daneri, M.F. (2010) Aprendizaje espacial en el anfibio anuro *Bufo arenarum* estrategias, fenómenos y bases neurales. Tesis Doctoral .
- Daneri, M. F., E. Casanave and R. N. Muzio (2011). "Control of spatial orientation in terrestrial toads (*Rhinella arenarum*)." *Journal of Comparative Psychology* 125(3): 296.
- Day, L. B., N. Ismail and W. Wilczynski (2003). "Use of position and feature cues in discrimination learning by the whiptail lizard (*Cnemidophorus inornatus*)." *Journal of Comparative Psychology*; *Journal of Comparative Psychology* 117(4): 440.
- Duellman, W. E. and L. Trueb (1986). *Biology of amphibians*, Johns Hopkins University Press.
- Ewer, R. (1952). "The effects of posterior pituitary extracts on water balance in *Bufo carens* and *Xenopus laevis*, together with some general considerations of anuran water economy." *Journal of Experimental Biology* 29(3): 429-439.
- Ferreira, H. and C. Jesus (1973). "Salt adaptation in *Bufo bufo*." *The Journal of Physiology* 228(3): 583-600.
- Fox, H. (1986). "The skin of amphibia." *Biology of the Integument* 2: 78-148.
- Frost, D. R. (2013). *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.6 (9 January 2013). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Garty, H. and L. G. Palmer (1997). "Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation." *Physiological Reviews* 77(2): 359-396.
- Geise, W. and K. E. Linsenmair (1986). "Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment." *Oecologia* 68: 542-548.
- Geise, W. and K. E. Linsenmair (1988). "Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment." *Oecologia* 77(3): 327-338
- Giurfa, M., S. Zhang, A. Jenett, R. Menzel and M. V. Srinivasan (2001). "The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect." *Nature* 410(6831): 930-932.
- Hall, F. (1922). "The vital limit of exsiccation of certain animals." *Biological Bulletin* 42(1): 31-51.
- Hasegawa, T., H. Tanii, M. Suzuki and S. Tanaka (2003). "Regulation of water absorption in the frog skins by two vasotocin-dependent water-channel aquaporins, AQP-h2 and AQP-h3." *Endocrinology* 144(9): 4087-4096.
- Heller, H. and P. Bentley (1965). "Phylogenetic distribution of the effects of neurohypophysial hormones on water and sodium metabolism." *General and Comparative Endocrinology* 5(1): 96-108.
- Hempel de Ibarra, N. and M. Giurfa (2003). "Discrimination of closed coloured shapes by honeybees requires only contrast to the long wavelength receptor type." *Animal behaviour* 66(5): 903-910.

- Hillyard, S. D. (1975). "The role of antidiuretic hormones in the water economy of the spadefoot toad, *Scaphiopus couchi*." *Physiological zoology* 48(3): 242-251.
- Hillyard, S. D. (1976). "Variation in the effects of antidiuretic hormone on the isolated skin of the toad, *Scaphiopus couchi*." *Journal of Experimental Zoology* 195(2): 199-206.
- Hillyard, S. D. (1979). "The effect of isoproterenol on the anuran water balance response." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 62(1): 93-95.
- Hillyard, S. D. and E. H. Larsen (2001). "Lymph osmolality and rehydration from NaCl solutions by toads, *Bufo marinus*." *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 171(4): 283-292.
- Ikeno, H. (2004). "Flight control of honeybee in the Y-maze." *Neurocomputing* 58: 663-668.
- Jørgensen, C. B. (1950). "The amphibian water economy, with special regard to the effect of neurohypophyseal extracts." *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum* 22(78): 1.
- Joergensen, C. B. (1997). "200 years of amphibian water economy: from Robert Townson to the present." *Biological Reviews* 72(2): 153-237.
- Katchalsky, A. and P. F. Curran (1965). *Nonequilibrium thermodynamics in biophysics*, Harvard University Press.
- Katz, U. (1989). "Strategies of adaptation to osmotic stress in anuran amphibia under salt and burrowing conditions." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 93(3): 499-503.
- Kirschner, L. B. (1953). "Effect of cholinesterase inhibitors and atropine on active sodium transport across frog skin." *Nature* 172: 348-349.
- Kirschner, L. B. (1955). "The effect of atropine and the curares on the active transport of sodium by the skin of *Rana esculenta*." *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 45(1): 89-102.
- Koefoed-Johnsen, V. and H. H. Ussing (1953). "The Contributions of Diffusion and Flow to the Passage of D₂O through Living Membranes.: Effect of Neurohypophysenl Hormone Isolated Anuran Skin." *Acta Physiologica Scandinavica* 28(1): 60-76.
- Koefoed-Johnsen, V. and H. H. Ussing (1958). "The nature of the frog skin potential." *Acta Physiologica Scandinavica* 42(3-4): 298-308.
- Kohno, S., Y. Kamishima and T. Iguchi (2003). "Molecular cloning of an anuran V₂ type [Arg⁸] vasotocin receptor and mesotocin receptor: functional characterization and tissue expression in the Japanese tree frog (*Hyla japonica*)." *General and comparative endocrinology* 132(3): 485-498.
- Loza-Coll MA and Muzio RN (en preparación) Hypertonic NaCl solutions as aversive stimuli in terrestrial toads.
- Mackintosh, N. J. (1974). *The psychology of animal learning*, Academic Press.

- Maleek, R., P. Sullivan, K. Von Seckendorff Hoff, V. Baula and S. D. Hillyard (1999). "Salt Sensitivity and Hydration Behavior of the Toad, *Bufo marinus*." *Physiology & behavior* 67(5): 739-745.
- Maxwell, S. (1913). "On the absorption of water by the skin of the frog." *American Journal of Physiology--Legacy Content* 32(5): 286-294.
- McClanahan, L. and R. Baldwin (1969). "Rate of water uptake through the integument of the desert toad, *Bufo punctatus*." *Comparative biochemistry and physiology* 28(1): 381-389.
- Mullen, T. L. and R. H. Alvarado (1976). "Osmotic and ionic regulation in amphibians." *Physiological zoology*: 11-23.
- Muzio, R. N., E. T. Segura and M. R. Papini (1992). "Effect of schedule and magnitude of reinforcement on instrumental learning in the toad, *Bufo arenarum*." *Learning and Motivation* 23(4): 406-429.
- Muzio, R. N., E. T. Segura and M. R. Papini (1993). "Effects of lesions in the medial pallium on instrumental learning in the toad (*Bufo arenarum*)." *Physiology & Behavior* 54(1): 185-188.
- Muzio, R. N., E. T. Segura and M. R. Papini (1994). "Learning under partial reinforcement in the toad (*Bufo arenarum*): Effects of lesions in the medial pallium." *Behavioral and Neural Biology* 61(1): 36-46.
- Muzio, R. N. (1999). "Aprendizaje instrumental en anfibios." *Revista latinoamericana de psicología*.
- Muzio, R. N., E. Ruetti and M. R. Papini (2006). "Determinants of instrumental extinction in terrestrial toads (*Bufo arenarum*)." *Learning and Motivation* 37(4): 346-356.
- Muzio, R. N., V. P. Creydt, M. Iurman, M. A. Rinaldi, B. Sirani and M. R. Papini (2011). "Incentive or habit learning in amphibians?" *PloS one* 6(11): e25798.
- Nagai, T., H. Koyama, K. Von Seckendorff Hoff and S. D. Hillyard (1999). "Desert toads discriminate salt taste with chemosensory function of the ventral skin." *The Journal of comparative neurology* 408(1): 125-136.
- Navas, C. A., C. Jared and M. M. Antoniazzi (2002). "Water economy in the casque-headed tree-frog *Corythomantis greeningi* (Hylidae): role of behaviour, skin, and skull skin co-ossification." *Journal of Zoology* 257(4): 525-532.
- Nielsen, R. and E. H. Larsen (2007). "Beta-adrenergic activation of solute coupled water uptake by toad skin epithelium results in near-isosmotic transport." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 148(1): 64-71.
- Nielsen, S. and P. Agre (1995). "The aquaporin family of water channels in kidney." *Kidney international* 48(4): 1057-1068.
- Ogushi, Y., A. Tsuzuki, M. Sato, H. Mochida, R. Okada, M. Suzuki, S. D. Hillyard and S. Tanaka (2010). "The water-absorption region of ventral skin of several semiterrestrial and aquatic anuran amphibians identified by aquaporins." *American Journal of Physiology-*

Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 299(5): R1150-R1162.

O'keefe, J. and L. Nadel (1978). The hippocampus as a cognitive map, Clarendon Press Oxford.

Overton, E. (1904). Neununddreissig Thesen über die Wasserökonomie der Amphibien und die osmotischen Eigenschaften der Amphibienhaut, A. Stuber.

Papini, M. R., R. N. Muzio and E. T. Segura (1995). "Instrumental learning in toads (*Bufo arenarum*): Reinforcer magnitude and the medial pallium." Brain, Behavior and Evolution; Brain, Behavior and Evolution.

Pough, F. H., T. L. Taigen, M. M. Stewart and P. F. Brussard (1983). "Behavioral modification of evaporative water loss by a Puerto Rican frog." Ecology: 244-252.

Pramuk, J. B., T. Robertson, J. W. Sites Jr and B. P. Noonan (2008). "Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae)." Global Ecology and Biogeography 17(1): 72-83.

Reboreda, J. C., S. Petriella and E. Segura (1987). "Short-term changes in natripheric and hydrosmotic water fluxes across the skin and in urine production due to increases in the osmolarity of the external environment in the toad." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 88(3): 571-575.

Reboreda, J. C. and E. T. Segura (1989). "Water balance effects of systemic and intracerebroventricular administration of

angiotensin II in the toad *Bufo arenarum*." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 93(3): 505-509.

Reboreda, J. C., R. N. Muzio, M. C. Viñas and E. T. Segura (1991). "β-adrenergic control of the water permeability of the skin during rehydration in the toad *Bufo arenarum*." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology 100(3): 433-437.

Rodriguez, F., E. Duran, J. P. Vargas, B. Torres and C. Salas (1994). "Performance of goldfish trained in allocentric and egocentric maze procedures suggests the presence of a cognitive mapping system in fishes." Learning & behavior 22(4): 409-420.

Rodríguez, M. Á., J. A. Belmontes and B. A. Hawkins (2005). "Energy, water and large-scale patterns of reptile and amphibian species richness in Europe." Acta Oecologica 28(1): 65-70.

Ruibal, R. (1962). "Osmoregulation in amphibians from heterosaline habitats." Physiological zoology 35(2): 133-147.

Ruibal, R., L. Tevis Jr and V. Roig (1969). "The terrestrial ecology of the spadefoot toad *Scaphiopus hammondi*." Copeia: 571-584.

Ruibal, R. and V. Shoemaker (1984). "Osteoderms in anurans." Journal of Herpetology: 313-328.

Sawyer, W. H. (1951). "Effect of posterior pituitary extracts on urine formation and glomerular circulation in the frog." American Journal of Physiology--Legacy Content 164(2): 457-466.

Sawyer, W. H. (1957). "The antidiuretic action of neurohypophysial hormones in Amphibia." *The neurohypophysis* 8: 171.

Sawyer W.H, Munsick R.A and Vandyke H.B. (1959) Pharmacological evidence for the presence of arginine vasotocin and oxytocin in neurohypophysial extracts from cold-blooded vertebrates. *Nature*, 184:1464-5.

Sawyer W. H. (1960 a) Evidence for the identity of natriferin, the frog water-balance principle and arginine vasotochin. *Nature*, 187:1030-1.

Sawyer, W. H. (1960b). Increased water permeability of the bullfrog (*Rana catesbiana*) bladder in vitro in response to synthetic oxytocin and arginine vasotocin and to neurohypophysial extracts from nonmammalian vertebrates. *Endocrinology* 66: 112-120; doi:10.1210/endo-66-1-112

Schmajuk, N. A., E. T. Segura and J. C. Rebores (1980). "Appetitive conditioning and discriminatory learning in toads." *Behavioral and neural biology* 28(4): 392-397.

Schmajuk, N. A., E. T. Segura and A. C. Ruidiaz (1981). "Reward downshift in the toad." *Behavioral and Neural Biology* 33(4): 519-523.

Schmajuk, N. A. and E. T. Segura (1982). "Behavioral regulation of water balance in the toad *Bufo arenarum*." *Herpetologica*: 296-301.

Schmid, W. D. and R. E. Barden (1965). "Water permeability and lipid content of amphibian skin." *Comparative biochemistry and physiology* 15(3): 423-427.

Schmid, W. D. (1982). "Survival of frogs in low temperature." *Science (New York, NY)* 215(4533): 697.

Segura, E. T., A. M. Biscardi and J. Apelbaum (1967). "Seasonal variations of brain epinephrine, norepinephrine and 5-hydroxytryptamine associated with changes in the EEG of the toad, *Bufo arenarum* Hensel." *Comparative Biochemistry and Physiology* 22(3): 843-850.

Segura, E. T. (1969). "Effect of forebrain stimulation on blood pressure, heart rate, and ST-T complex in toads." *The American journal of physiology* 217(4): 1149-1152.

Segura, E., U. Bandsholm, A. Bronstein and D. Woscoboinik (1982). "Role of the CNS in the control of the water economy of the toad *Bufo arenarum* Hensel. I. Effects of handling, brain lesions, anesthesia and reversible coma upon water uptake, urine production and overall water balance." *J Comp Physiol* 146(1): 95-100.

Segura, E. T., U. C. Bandsholm, A. Bronstein and D. Woscoboinik (1982b). "Role of the CNS in the control of the water economy of the toad *Bufo arenarum* Hensel. II. Adrenergic Control of Water Uptake Across the Skin" *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 146(1): 101-106.

Segura, E., J. Rebores, A. Skorka, M. Cuello and S. Petriella (1984). "Role of the CNS in the control of the water economy of the toad *Bufo arenarum* Hensel. III: Skin permeability increases to raised osmotic pressure of the external milieu." *Journal of comparative physiology. B, Biochemical,*

systemic, and environmental physiology 154(6): 573-578.

Shettleworth, S. J. (2001). "Animal cognition and animal behaviour." *Animal Behaviour* 61(2): 277-286.

Shoemaker, V. and K. A. Nagy (1977). "Osmoregulation in amphibians and reptiles." *Annual Review of Physiology* 39(1): 449-471.

Spight, T. M. (1967). "The water economy of salamanders: water uptake after dehydration." *Comparative Biochemistry and Physiology* 20(3): 767-771.

Suzuki, M., T. Hasegawa, Y. Ogushi and S. Tanaka (2007). "Amphibian aquaporins and adaptation to terrestrial environments: a review." *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* 148(1): 72-81.

Suzuki, M. and S. Tanaka (2009). "Molecular and cellular regulation of water homeostasis in anuran amphibians by aquaporins." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 153(3): 231-241.

Takahashi, K., N. Makita, K. Manaka, M. Hisano, Y. Akioka, K. Miura, N. Takubo, A. Iida, N. Ueda and M. Hashimoto (2012). "V₂ Vasopressin Receptor (V₂R) Mutations in Partial Nephrogenic Diabetes Insipidus Highlight Protean Agonism of V₂R Antagonists." *Journal of Biological Chemistry* 287(3): 2099-2106.

Thorson, T. and A. Svihla (1943). "Correlation of the habitats of amphibians with their ability to survive the loss of body water." *Ecology* 24(3): 374-381.

Viborg, A. and P. Rosenkilde (2004). "Water potential receptors in the skin regulate blood perfusion in the ventral pelvic patch of toads." *Physiological and Biochemical Zoology* 77(1): 39-49.

Von Seckendorff Hoff, K. and S. D. Hillyard (1991). "Angiotensin II stimulates cutaneous drinking in the toad *Bufo punctatus*." *Physiological zoology*: 1165-1172.

Von Seckendorff Hoff, K. and S. D. Hillyard (1993). "Toads taste sodium with their skin: sensory function in a transporting epithelium." *Journal of experimental biology* 183(1): 347-352.

Walker, R. F. and W. G. Whitford (1970). "Soil water absorption capabilities in selected species of anurans." *Herpetologica*: 411-418.

Wang, X., V. Gattone, P. C. Harris and V. E. Torres (2005). "Effectiveness of vasopressin V₂ receptor antagonists OPC-31260 and OPC-41061 on polycystic kidney disease development in the PCK rat." *Journal of the American Society of Nephrology* 16(4): 846-851.

Warburg, M. (1965). "Studies on the water economy of some Australian frogs." *Australian Journal of Zoology* 13(2): 317-330.

Wells, K. D. (2007). *The ecology and behavior of amphibians*, University of Chicago Press.

Williams Jr, J. T. (1967). "A test for dominance of cues during maze learning by toads." *Psychonomic science*.

Yamada, T., T. Nishio, Y. Sano, K. Kawago, K. Matsuda and M. Uchiyama (2008). "Effects of arginine vasotocin and vasopressin receptor antagonists on Na⁺ and Cl⁻ transport in the isolated skin of two frog species, *Hyla japonica* and *Rana nigromaculata*." General and comparative endocrinology 157(1): 63-69.

Yamamura, Y., H. Ogawa, H. Yamashita, T. Chihara, H. Miyamoto, S. Nakamura, T. Onogawa, T. Yamashita, T. Hosokawa, T. Mori, M. Tominaga and Y. Yabuuchi (1992). "Characterization of a novel aquaretic agent, OPC-31260, as an orally effective, nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist." British Journal of Pharmacology 105(4): 787-791.

Yokota, S. D. and S. S. Hillman (1984). "Adrenergic control of the anuran cutaneous hydroosmotic response." General and comparative endocrinology 53(2): 309-314.

Yorio, T. and P. Bentley (1977). "Asymmetrical permeability of the integument of tree frogs (Hylidae)." The Journal of Experimental Biology 67(1): 197-204.

Zayan, R. and J. Vauclair (1998). "Categories as paradigms for comparative cognition." Behavioural Processes 42(2): 87-99.