

Estudio cuantificado de la actividad bioeléctrica cerebral del sapo común *Rhinella arenarum* Hensel (Anura, Bufonidae) bajo distintas condiciones experimentales

*Quantified study of the brain bioelectrical activity of the common South American toad *Rhinella arenarum* Hensel (Anura, Bufonidae) under different experimental conditions*

Claudio O. Cervino

Instituto de Ciencias Básicas y Experimentales (ICByE, SeCyT), Universidad de Morón, Morón. Argentina.

Manuscrito recibido: 06 de marzo de 2021; aceptado para publicación: 31 de mayo de 2021

Autor de Contacto: Dr. Claudio O. Cervino. Instituto de Ciencias Básicas y Experimentales (ICByE-SeCyT), Universidad de Morón. Machado 914, (1708) Morón, Pcia. de Buenos Aires, Argentina. E-mail: ccervino@unimoron.edu.ar

Resumen

En este trabajo se estudian los cambios de la actividad eléctrica de los bulbos olfatorios (BO) y de los hemisferios cerebrales (HC) en sapos: a) mantenidos bajo condiciones naturales de luz y temperatura en verano y en invierno; b) sometidos a desafrentación olfatoria periférica, y c) bajo el efecto de una dosis única de melatonina. Con este objetivo, ejemplares de *Rhinella arenarum* fueron implantados crónicamente con electrodos de acero inoxidable en la superficie de los BO y HC, realizándose registros electroencefalográficos bipolares (ECoG). Se realizó análisis espectral de potencia de la actividad cerebral registrada (EEGq). También se registró la actividad de la bomba bucal y del corazón sistémico (ECG). Durante el verano está presente una abundante actividad fusil (15,5-20,5 Hz) en los BO característica de esta época del año, mientras que en invierno la actividad bioeléctrica cerebral se enlentece (predomina actividad theta de 4,5-7,0 Hz) y disminuye su amplitud, con ausencia de actividad fusil. En animales sin mucosa olfatoria el EEG durante el verano se asemeja al registrado en época invernal, predominando la baja amplitud y la desincronización. El efecto de la melatonina ensayada (0,5 mg de melatonina/100g) en época estival inhibe la actividad bioeléctrica cerebral, haciendo desaparecer la actividad fusil de los BO. Los resultados obtenidos reafirman una vez más con procedimientos experimentales diferentes la importancia de la aferencia olfatoria en la determinación de la actividad eléctrica cerebral de estos anfibios.

Palabras clave: actividad bioeléctrica cerebral, bulbo olfatorio, variación estacional, melatonina, sapo común, *Rhinella arenarum*.

Abstract

*This work studies changes in the electrical activity of olfactory bulbs (OB) and cerebral hemispheres (CH) in toads: a) maintained under natural light and temperature conditions in summer and winter; b) subjected to peripheral olfactory disaffection, and c) under the effect of a single dose of melatonin. Specimens of *Rhinella arenarum* were chronically implanted with stainless steel electrodes on the surface of the OB and CH, with bipolar electroencephalographic records (EECoG). Spectral analysis of brain activity (EEGq) was performed. Buccal pump and systemic heart activity (ECG) were also recorded. During summer there is an abundant oscillatory activity (15.5-20.5 Hz) in the OB characteristic of this time of year, while in winter the electroencephalographic activity slows (theta activity predominates, 4.5-7.0 Hz) and decreases its amplitude, with no oscillatory activity. In animals without olfactory mucosa the EEG resembles that recorded in winter times. The effect of melatonin tested (0.5 mg of melatonin/100g) in summer inhibits electroencephalographic activity, causing the OB oscillatory activity to disappear. The results obtained reaffirm once again with different experimental procedures the importance of olfactory afference in determining the cerebral electrical activity of these amphibians.*

Key words: electroencephalogram, olfactory bulb, seasonal variation, melatonin, common toad, *Rhinella arenarum*.

DOI: <http://doi.org/10.34073/274>

Introducción

Los anuros manifiestan, especialmente aquellos que viven en regiones templadas y frías, ciclos anuales en su fisiología y comportamiento. Durante la época primavera-verano exhiben una amplia gama de comportamientos alimentarios, de exploración del hábitat y reproductivos. En cambio, durante el invierno entran en un estado de hibernación disminuyendo drásticamente su metabolismo (Vitt y Caldwell, 2009). De esta manera, observaciones en sapos de algunas respuestas del lóbulo óptico mostraron variaciones marcadamente estacionales (Mitarai, 1955a y b).

Rhinella (= *Bufo*) *arenarum* es un anuro terrestre que se distribuye en regiones templadas de América del Sur. El polimorfismo fisiológico de estos sapos es remarcable como también su adaptabilidad ecológica (Ceï, 1959; Bionda et al., 2011; Duport Bru, 2020; Pereyra et al., 2021).

R. arenarum posee una marcada variación de sus patrones fisiológicos y comportamentales a lo largo del año (Bionda et al., 2011; Duport Bru, 2020). En invierno, durante el período de hibernación, permanece en sus cuevas bajo el suelo. En primavera y verano estos animales se encuentran activos durante el crepúsculo y la noche. Durante la época de reproducción se los encuentra cerca de cuerpos de agua, pudiendo permanecer parcialmente sumergidos, pero pasan la mayor parte del tiempo sobre tierra.

Desde el punto de vista anatómico, el encéfalo de los anuros está fuertemente dominado por el sistema olfativo principal y accesorio (Herrick, 1933, Scaglia, 1976). Poseen dos grandes bulbos olfatorios (BO) cuyas proyecciones llegan a todo el resto del cerebro. El trabajo pionero de Gerard y Young (1937) describió la actividad bioeléctrica aguda "in vivo" e "in vitro" del cerebro de dos especies de ranas (la rana leopardo *Lithobates* (= *Rana*) *pipiens* y la rana toro *L. catesbeianus*). El BO era en ambos casos dominante, con un ritmo a menudo extremadamente regular a 4 a 8 Hz - 20 μ V y otro ritmo comúnmente presente en 25 a 30 Hz - 5 a 10 μ V.

La actividad bioeléctrica cerebral (EEG) de anfibios fue estudiada posteriormente por otros autores (Boldyreva y Grindel, 1959; Hobson, 1967a; Laming, 1982). En *R. arenarum* se llevaron a cabo registros de diversas estructuras cerebrales (Segura y De Juan, 1966; De Juan y Segura, 1966; Segura et al., 1971a y b) y su estudio fue ampliado y profundizado en nuestro laboratorio en años recientes. En esta especie se han descrito fuertes variaciones anuales en la actividad bioeléctrica cerebral (Segura y de Juan, 1966; Segura et al, 1971a y b; Cervino y Affanni, 1996) como así también cambios de la excitabilidad en el curso de las estaciones, independientes de la temperatura, humedad e iluminación (de Juan y Segura, 1966), consistentes en bajo

umbral a los estímulos en primavera-verano y marcada hipoexcitabilidad durante la hibernación. También los niveles de distintos neurotransmisores en el cerebro varían a lo largo del año (Segura et al., 1967).

Por otro lado, los anuros poseen un tipo particular de ventilación pulmonar, donde interviene activamente el piso de la cavidad bucal (Gans, 1969). Esta actividad de la bomba bucal produce el movimiento de una masa de aire a través de las narinas estimulando la mucosa olfatoria. De esta manera el sistema olfatorio es estimulado, muchas veces de manera irregular, en concordancia con la función ventilatoria, la cual varía estrechamente con el estado comportamental del animal (Hobson, 1967a y b; Laming, 1982). Hobson estudió los correlatos electrográficos del bombeo bucal en ranas toro (*L. catesbeianus*). Demostró la presencia de actividad rítmica en el EEG que ocurre en correspondencia con cada movimiento ventilatorio, mientras que durante los períodos apnéicos intermedios el EEG mostraba actividad rápida de bajo voltaje.

Por lo tanto, es probable que las modificaciones de la aferencia olfatoria provocadas por la destrucción de la mucosa olfatoria pudiesen acarrear importantes cambios de la actividad bioeléctrica de los BO en particular, y de todo el encéfalo.

En el presente trabajo, como una primera aproximación, se proponen los siguientes objetivos: primero, describir y comparar la actividad bioeléctrica cerebral en sapos *R. arenarum* durante la época invernal y de primavera-verano, y segundo, establecer la repercusión de la actividad bioeléctrica de los BO sobre la de los hemisferios cerebrales (HC), utilizando la desaferenciación olfatoria periférica como herramienta (Cervino, 1997).

En vista de las variaciones estacionales en la fisiología de los anuros de zonas templadas y la influencia de la melatonina (ML) en el desarrollo de ritmos anuales (ver más adelante), esta investigación también se propone evaluar el efecto de la aplicación de una dosis única de ML exógena sobre la actividad bioeléctrica cerebral del sapo *R. arenarum*.

La ML es una hormona derivada del triptófano. La síntesis y secreción de ML por la glándula pineal están bajo control fotoperiódico, siendo mayor durante la fase oscura del día (Cervino y Hernando, 2015). En consecuencia, se la asocia

con la medición del fotoperíodo a lo largo del año. La particularidad del metabolismo de la glándula pineal estriba en que está sometido a un ritmo circadiano. Mientras que en los mamíferos la actividad rítmica de la alternancia día-noche está determinada por una mediación desde una vía nerviosa que parte de la retina (Reiter et al., 2010), en los anfibios las células pineales son directamente fotorreceptoras (Collin y Voisin, 1989).

El ritmo de ML circulante regula en los organismos endotermos la aparición de ritmos diarios y anuales (Reiter, 1993; Pevet, 2000). Por ejemplo, puede regular la secreción de hormonas liberadoras de gonadotropina y, por tanto, los ciclos reproductivos estacionales (Wehr, 1997). En los organismos ectotermos la ML se la asocia con la regulación de los melanóforos; induce la agregación de melanina, con el consecuente blanqueamiento de la piel (Sugden et al., 2004).

Está demostrado que la ML tiene un efecto inhibitorio sobre el SNC. Se ha verificado la presencia de una interacción significativa entre los sistemas GABAérgico y melatoninérgico (Golombek et al., 1996; Bello et al., 2018), y algunas de las acciones neuroquímicas de la ML (incluyendo actividad hipnótica en mamíferos) parecen estar mediadas por el receptor GABAA y pueden bloquearse con antagonistas GABAérgicos (Wang et al., 2003). Cervino (1997) demostró que una dosis de 1,2 mg/kg de ML produce profundos cambios en la actividad bioeléctrica de los BO y neocorteza frontal del armadillo *Chaetophractus villosus*. Dichos cambios se manifestaron como un reforzamiento de un ritmo dentro de la banda alfa, característico de los BO de estos animales en vigilia (Affanni y Cervino, 2005), y que representa un enlentecimiento de la actividad cerebral.

De esta forma, como objetivo final, se desea comprobar si la ML produce una inhibición sobre la actividad bioeléctrica cerebral en sapos, comparable a la época invernal, en donde los niveles de ML se supone son altos por el aumento de la duración de la fase oscura del día.

Material y Métodos

Animales

Para los experimentos se utilizaron 28 sapos adultos (hembras) de la especie *R. arenarum*, cuyos pesos oscilaron entre 98 y 142 g. Previamente a la implantación de los electrodos

y durante el período de registro los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales de fotoperíodo y temperatura naturales a lo largo del año. Para los ensayos con ML se utilizaron ejemplares durante la época estival, durante los meses de febrero a abril.

Técnica de implante de electrodos para registro del EEG

Se realizaron registros crónicos. Los electrodos consistieron en alfileres entomológicos de acero inoxidable (1 mm de diámetro), aislados con barniz, excepto en la punta. A cada alfiler se le soldaba una cánula de 3 mm de largo del mismo material a modo de tope, dejando expuesta una punta acorde al espesor del hueso del cráneo según donde los mismos fueran implantados. De esta manera, se aseguraba por un lado que los electrodos llegaran hasta la superficie de las meninges (ECoG) y, por otro, la uniformidad de registro en todos los sapos registrados.

Bajo anestesia por sumersión en un medio de 1:10.000 MS222 (Sandoz) se eliminó el revestimiento cutáneo del cráneo y con ayuda de transiluminación se delimitó la ubicación de los BO y HC. Se procedió luego a perforar el hueso y se colocó un par de electrodos en cada una de dichas estructuras, tanto en el lado izquierdo como en el derecho. Los electrodos se fijaron al cráneo mediante acrílico dental. Se midió la impedancia de los electrodos ya implantados para asegurar el buen registro de los mismos, considerando valores correctos entre 5 y 10 K Ω .

Registro del electrocardiograma (ECG)

La frecuencia cardíaca (FC) fue determinada por medio del registro del ECG con electrodos metálicos (agrafes quirúrgicos aislados soldados a cables) fijados sobre la piel del dorso en animales bajo anestesia. El registro bipolar se realizó con electrodos sobre la región escapular, con un electrodo a tierra en la parte posterior del tronco. La FC sistémica se registró como latidos/minuto para cada período consecutivo de 5 min, promediando la frecuencia sistólica del ECG de 10 intervalos de 10 s cada uno, tomada aleatoriamente dentro de cada período de 5 min.

Registro de la actividad de la bomba bucal

Los movimientos de la bomba bucal fueron estudiados por medio del artefacto que se registraba con un par de electro-

dos confeccionados con alambre de nicrome fijados a los músculos del piso de la boca.

Melatonina

La ML (SIGMA-ALDRICH, pureza 99%, grado analítico) fue preparada disolviendo 3,0 mg en 1 mL de etanol y llevada a 6 mL con solución Ringer-sapo. Se ensayaron dosis de 0,1 mg/100 g (0,2 mL de solución inyectada) y 0,5 mg/100 g (1,0 mL de solución inyectada). También se realizó un ensayo control con el vehículo (1,0 mL).

Registro y procesamiento de las señales bioeléctricas

Las señales transducidas desde el encéfalo, el corazón sistémico y la actividad de la bomba bucal fueron amplificadas y filtradas (banda pasante 0,53 - 40 Hz). Luego ingresaban a una plaqueta Burr-Brown PCI-20098C para la conversión y digitalización de los datos. La conversión analógica-digital se realizó con una frecuencia de muestreo de 128 Hz. La rutina de adquisición, visualización y análisis del registro se llevó a cabo por medio del software Rhythms 10.0 (Stellate Systems, 1995).

Para el registro y análisis de la actividad bioeléctrica cerebral se seleccionaron 4 derivaciones bipolares entre los electrodos ubicados sobre cada BO y HC. En regiones seleccionadas del registro para el procesamiento de la señal se aplicó la Transformada Rápida de Fourier -FFT- en épocas de 2 s, durante 30 a 40 s de registro (Gotman, 1990). Así, se obtuvieron espectros de potencia y potencias absolutas y relativas para cada canal (BO y HC, derechos e izquierdos) y banda frecuencial. Estas últimas fueron definidas de la siguiente manera: delta 0,5-3,5 Hz, theta 4,0-7,5 Hz, alfa 8,0-13,0 Hz y beta 13,5-40,0 Hz.

En los ensayos con dosis única de ML, para comparar los cambios fisiológicos, se tomaron los siguientes tiempos: control (0-15 min previos a la inyección), 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 y 240 min posteriores a la administración de la droga.

Durante el análisis del EEG cuantificado (EEGq) se descartó la banda frecuencial delta debido a que en ciertos momentos la actividad de la bomba bucal provocaba la aparición de grandes ondas dentro del registro, especialmente en los BO. Este artefacto ocasionaba un importante aumento de la potencia de la banda delta, y por ende de la potencia relativa

delta, en detrimento de las restantes bandas relativas de origen cerebral.

Protocolo experimental

Para los ensayos los sapos fueron colocados dentro de una pecera de 50 cm x 35 cm x 40 cm, con fondo de arena húmeda, ubicada dentro de una caja de Faraday. La disposición del sistema de registro permitía seguir el comportamiento del animal a través de un circuito cerrado de TV. Durante los registros la temperatura del aire fue mantenida en $20 \pm 1^\circ\text{C}$ (invierno) y $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (verano).

Cuarenta y ocho horas posteriores al implante, los sapos eran registrados de 1 a 2 días para caracterizar su actividad cerebral. Luego, se realizaron tres tratamientos experimentales, registrando la actividad bioeléctrica cerebral, el ECG y los movimientos de la bomba bucal:

- a) registros de animales con la mucosa olfatoria intacta durante el verano ($n = 8$) e invierno ($n = 6$);
- b) registros de animales con desaferentación olfatoria periférica durante el verano ($n = 8$). La mucosa olfativa fue eliminada a través de la perfusión de 5 mL de una solución de sulfato de zinc al 10% (Cervino, 1997), a través de cada coana por medio de una cánula plástica curva.
- c) registros de animales con administración exógena de ML ($n = 10$) y control vehículo ($n = 4$) durante el verano. Luego de los registros control, se ensayaron con un intervalo de 48 hs el control del vehículo o las dos dosis de ML en animales diferentes. En cada ensayo se obtuvo una hora de registro de base, a continuación se inyectaba el preparado en el saco linfático dorsal y se registraba continuamente durante 4 hs el comportamiento, la actividad bioeléctrica cerebral, el ECG, la actividad de la bomba bucal y los cambios en la coloración de la piel. Los ensayos con ML se realizaron entre las 14:00 y 20:00 hs.

Análisis estadístico

Para comparar los parámetros del EEGq (potencia total (PT); potencias relativas delta (% δ), theta (% θ), alfa (% α) y beta (% β)) en sapos durante el verano versus sapos aclimatados al invierno o sometidos a desaferentación olfatoria periférica, se utilizó la prueba t de Student (nivel de significación se consideró a $P < 0,05$). El estudio estadístico se efectuó tanto sobre los B0 como en los HC.

En los ensayos de dosis única de ML, para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de Medidas Repetidas de un Factor (tiempo) (SigmaStat, SPSS, 2003). Dicho análisis se realizó sobre cada uno de los parámetros del EEGq de B0 y HC, como así también de la FC. Para obtener normalidad y homocedacia, los datos fueron transformados: la actividad bioeléctrica cerebral con la relación $\log(r / (100 - r))$, donde r = banda frecuencial relativa (Gotman, 1990) y la FC con la raíz cuadrada. Luego se realizó una comparación de todos los tiempos contra el control por el método de Dunnett's (nivel de significación $P < 0,05$).

Consideraciones éticas

Los animales fueron tratados siguiendo el código de ética confeccionado por el Consejo Canadiense de Cuidado Animal (Olfert et al., 1993) y también de acuerdo con las leyes argentinas.

Resultados

Variación estacional de la actividad bioeléctrica cerebral en sapos con aferencia olfatoria

En el EEG de ejemplares de *R. arenarum* con mucosa olfatoria y ventilando aire varía marcadamente según la época del año.

Durante el verano, predomina en los B0 una abundante actividad sinusoidal espontánea (husos) dentro de la banda β de alrededor 19 Hz (15,5-20,5 Hz) con una amplitud hasta $100 \mu\text{V}$ y una duración promedio de 800 ms. La actividad fusil registrada está asociada a los movimientos ventilatorios de la bomba bucal (**Fig. 1**). Acompañando esta actividad beta, se registra una actividad de base de 4,5-7,0 Hz (theta, θ). En los HC se pueden reconocer actividades correspondientes a las bandas θ , α y β , con predominio de un ritmo θ (4,0-5,0 Hz).

En cambio, durante la época invernal, la amplitud de la actividad bioeléctrica cerebral es mucho menor comparada con la del verano. El EEG en las estructuras estudiadas, está dominada por actividad θ entre 4,5 y 7,0 Hz (**Fig. 2**).

Tanto en verano como en invierno el animal responde con salvas sinusoidales en los B0 ante la aplicación de estímulos odorantes (humo de tabaco). Las salvas sinusoidales provocadas durante el invierno son de frecuencia y amplitud mucho menores (por ej., 10 a 12 Hz, $30 \mu\text{V}$), que las provocadas en verano (**Fig. 2**).

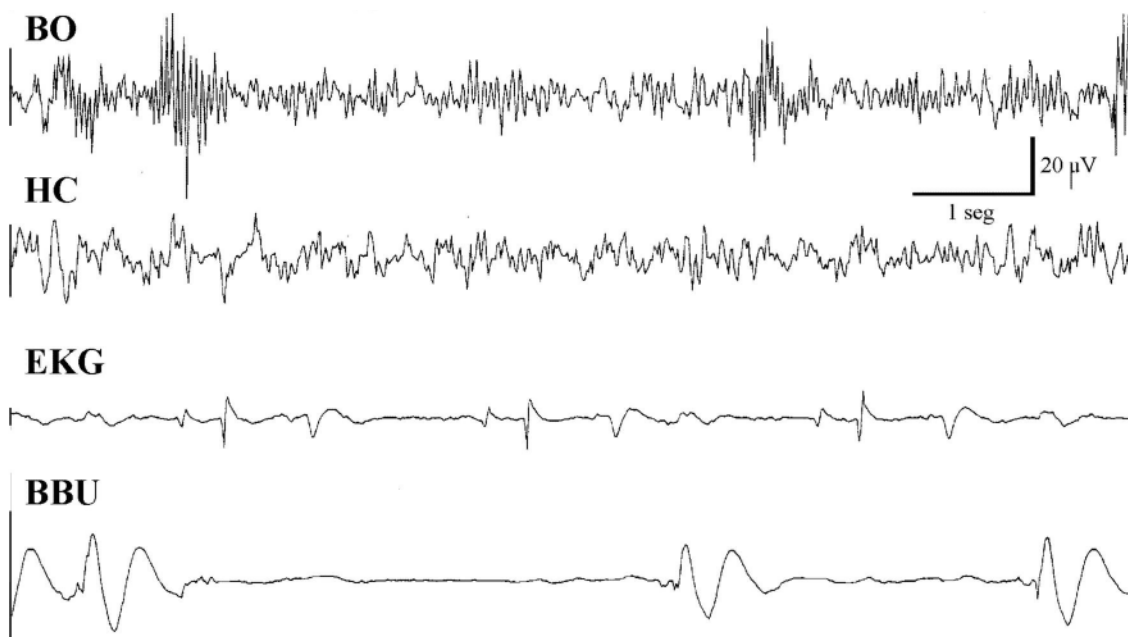


Figura 1. Registros de la actividad bioeléctrica de bulbo olfatorio (BO) y hemisferio cerebral (HC) de *Rhinella arenarum*, ventilando en medio aéreo, durante el verano, con mucosa olfatoria intacta. EKG= electrocardiograma; Bbu= actividad de la bomba bucal.

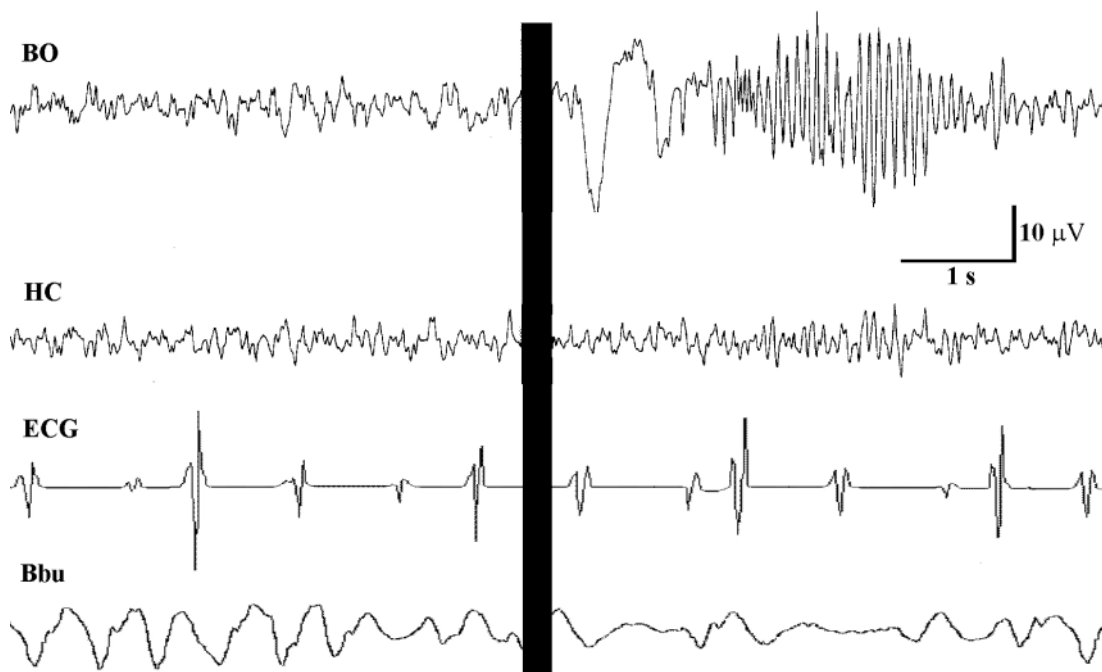


Figura 2. Registros de la actividad bioeléctrica de bulbo olfatorio (BO) y hemisferio cerebral (HC) de *Rhinella arenarum*, ventilando en medio aéreo, durante el invierno, con mucosa olfatoria intacta. Barra vertical= estimulación olfativa con humo de tabaco. ECG= electrocardiograma; Bbu= actividad de la bomba bucal.

Actividad bioeléctrica cerebral en sapos con desafe- rentación olfatoria periférica

Los registros durante el verano en sapos sin mucosa olfatoria, a las 24 hs la actividad bioeléctrica de los BO decae drásticamente. Se observa una actividad de base rápida - 22 a 25 Hz- de baja amplitud, tanto en los BO como en los HC (**Fig. 3**), superpuesta sobre un conspicuo ritmo Θ de ~ 5 Hz, especialmente en los BO. La actividad de los HC se asemeja al EEG de invierno. Cuando se estimula con humo de tabaco se comprueba taquicardia y una variación de la frecuencia del movimiento de la bomba bucal, pero sin cambios en la actividad bioeléctrica de BO y HC.

Actividad cuantificada de la actividad bioeléctrica cerebral

En la **Tabla I** se observan valores de potencia total (PT) y potencias relativas delta ($\% \delta$), theta ($\% \theta$), alfa ($\% \alpha$) y beta ($\% \beta$) de la actividad bioeléctrica cerebral en sapos intactos en distintas épocas del año y con desafe-rentación olfativa periférica en verano.

Considerando la actividad bioeléctrica cerebral de verano como basal, la PT en invierno cae significativamente un 83 % en los BO y un 42 % en los HC. Frente a la desafe-rentación olfativa periférica, la PT cae significativamente un 93 % en los BO y un 50 % en los HC.

Tomando en cuenta las potencias relativas de las distintas bandas frecuenciales del EEGq, entre estaciones, claramente los cambios en la actividad θ y β son los más pronunciados. Con respecto al $\% \theta$ hay un aumento significativo, tanto en BO como en HC, de este ritmo durante el invierno, incrementándose cuatro y dos veces, respectivamente. En contraposición, el $\% \beta$ mostró una disminución significativa del 60 % en los BO de verano a invierno, que se corresponde con la desaparición de la actividad sinusoidal característica del EEG de verano; en los HC esta banda frecuencial disminuyó un 42%.

En los animales sin mucosa olfativa, durante el verano, la falta de aferencia olfatoria periférica provocó que disminuyera significativamente la actividad β en los BO, registrándose un aumento del $\% \theta$ y $\% \alpha$. En los HC no se observan

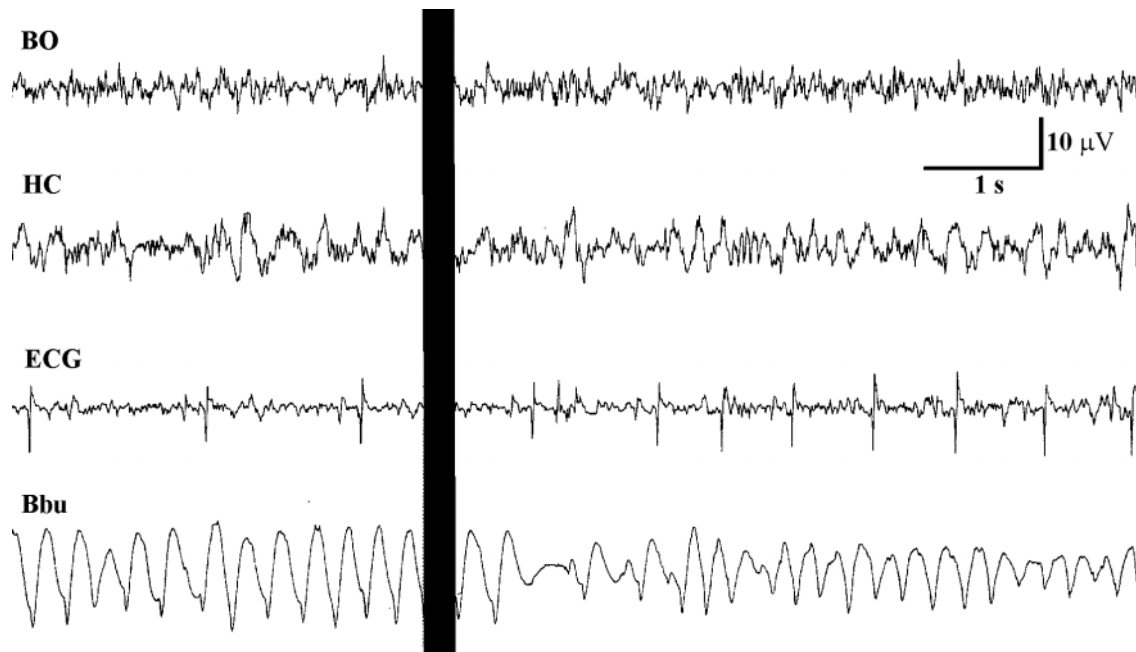


Figura 3. Registros de la actividad bioeléctrica de bulbo olfatorio (BO) y hemisferio cerebral (HC) de *Rhinella arenarum* sin mucosa olfatoria (desafe-rentación olfativa periférica), durante el verano. Barra vertical = estimulación olfativa con humo de tabaco. ECG = electrocardiograma; Bbu = registro de los movimientos de la bomba bucal.

Tabla 1. Valores del EEGq (media $\pm$ ESM) de *Rhinella arenarum* durante el verano, el invierno y sapos sometidos a desaferentación olfativa periférica (BO = bulbos olfatorios; HC = hemisferios cerebrales; potencia total (PT ($\mu V^2/Hz$)); potencias relativas delta (% δ), theta (% θ), alfa (% α) y beta (% β)). (Diferencias significativas versus verano: * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$)

	Verano (N= 8)		Invierno (N= 6)		Desaferentación Olfatoria (N= 8)	
	BO	HC	BO	HC	BO	HC
PT	38,5 $\pm$ 1,15	20,0 $\pm$ 1,83	6,5 $\pm$ 0,49**	11,5 $\pm$ 0,97*	2,5 $\pm$ 0,25**	10,5 $\pm$ 0,87*
% δ	39,7 $\pm$ 2,54	47,1 $\pm$ 3,02	34,1 $\pm$ 2,21	35,3 $\pm$ 1,87*	41,6 $\pm$ 2,21	42,5 $\pm$ 2,69
% θ	9,8 $\pm$ 1,12	16,6 $\pm$ 1,87	36,1 $\pm$ 2,24**	36,4 $\pm$ 2,15**	14,2 $\pm$ 1,47*	14,8 $\pm$ 1,66
% α	10,3 $\pm$ 0,92	15,0 $\pm$ 0,85	15,5 $\pm$ 0,89*	16,0 $\pm$ 0,74	15,0 $\pm$ 0,77*	12,0 $\pm$ 0,79
% β	40,2 $\pm$ 2,84	21,3 $\pm$ 1,32	14,3 $\pm$ 1,65**	12,3 $\pm$ 0,95*	29,2 $\pm$ 2,15**	30,7 $\pm$ 1,48*

grandes cambios en las frecuencias relativas de las bandas del EEG, a excepción de un aumento del % β .

El análisis de los espectros de potencia (Fig. 4) permite identificar claramente la actividad sinusoidal β en los BO de animales intactos durante los registros de verano, la cual aparece como un pico de potencia alrededor de 19 Hz; también se comprueba actividad θ . Al pasar de la época de verano al invierno se puede comprobar una caída de la PT (área debajo de los espectros de potencia), especialmente en los BO, en donde también se observa la desaparición de la actividad β , y la persistencia de actividad θ . En los animales con desaferentación olfativa periférica, especialmente en los BO se observa una marcada caída de la PT, la que repercute sobre los HC, y presencia de % β .

Con respecto al EEG y la FC no se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en ningún parámetro estudiado a lo largo del tiempo con respecto al registro control previo.

Al inyectar 0,5 mg de ML/100 g ($n = 6$), los sapos entraron a los pocos minutos en un estado de total akinesia, con una disminución de la frecuencia e intensidad del trabajo de la bomba bucal y un aclaramiento conspicuo de la piel. Este estado se acentuó a partir de los 45 min de administrada la ML. De esta forma, los estudios del efecto de una dosis única de ML sobre la actividad bioeléctrica cerebral y la FC se realizaron con la dosis de 0,5 mg de ML/100 g.

Actividad bioeléctrica cerebral en sapos bajo efecto de la melatonina

Durante los ensayos de control de vehículo, la variación inicial de todos los parámetros estudiados alcanzó los valores

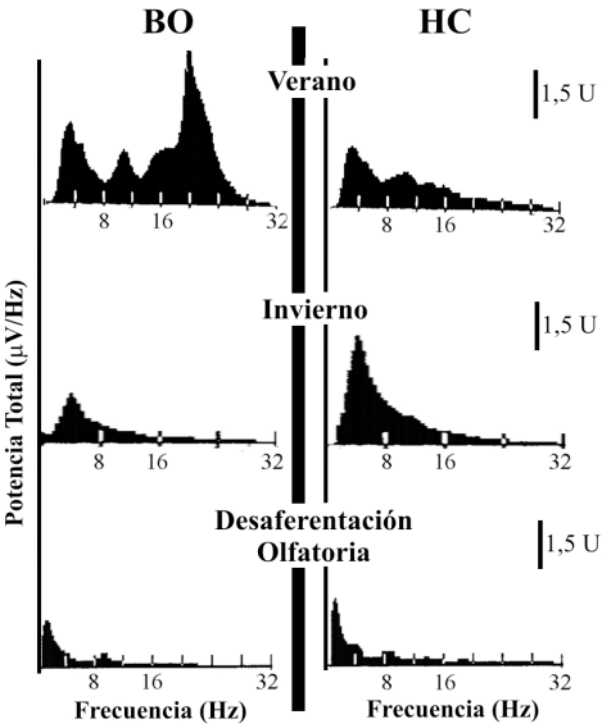


Figura 4. Espectros de potencia (EP) obtenidos de la actividad bioeléctrica de los bulbos olfatorios (BO) y hemisferios cerebrales (HC) de *Rhinella arenarum*. EP superiores = animales ventilando en aire durante el verano; EP medios = animales ventilando en aire durante el invierno; EP inferiores = animales ventilando aire sin mucosa olfativa.

controles aproximadamente a los 10 min de la inyección (no mostrado).

Con la dosis de 0,1 mg de ML/100 g ($n = 4$) se observó un aclaramiento de la piel y un comportamiento akinético leve.

Con respecto al EEG y la FC no se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en ningún parámetro estudiado a lo largo del tiempo con respecto al registro control previo.

Al inyectar 0,5 mg de ML/100 g ($n = 6$), los sapos entraron a los pocos minutos en un estado de total akinesia, con una disminución de la frecuencia e intensidad del trabajo de la bomba bucal y un aclaramiento conspicuo de la piel. Este estado se acentuó a partir de los 45 min de administrada la ML. De esta forma, los estudios del efecto de una dosis única de ML sobre la actividad bioeléctrica cerebral y la FC se realizaron con la dosis de 0,5 mg de ML/100 g.

De acuerdo a la época de verano en que se llevaron adelante los experimentos con ML, la inspección visual de los registros muestra que el EEG cambia a lo largo del tiempo. Pocos minutos después de la inyección de la ML la actividad cerebral

se modifica, volviéndose semejante a los registros en época invernal. Luego de los 45 min de administrada la ML la actividad fusil en los BO desaparece por completo del registro, para reaparecer nuevamente con una frecuencia entre 14,5 y 15,5 Hz a los 240 min.

El EEGq muestra las siguientes características:

Potencia total (PT). Tanto en los BO ($P < 0,001$) como en los HC ($P = 0,019$) la PT disminuyó significativamente (**Fig. 5A**). La PT de los BO comenzó a disminuir significativamente a partir de los 45 min, mostrando una inhibición de la actividad bioeléctrica de esas estructuras hasta los 180 min, y a partir de ahí vuelve a los valores de los registros controles (tiempo = 0). En cambio, en los HC disminuyó desde la inyección de ML, pero significativamente fue menor a los 90

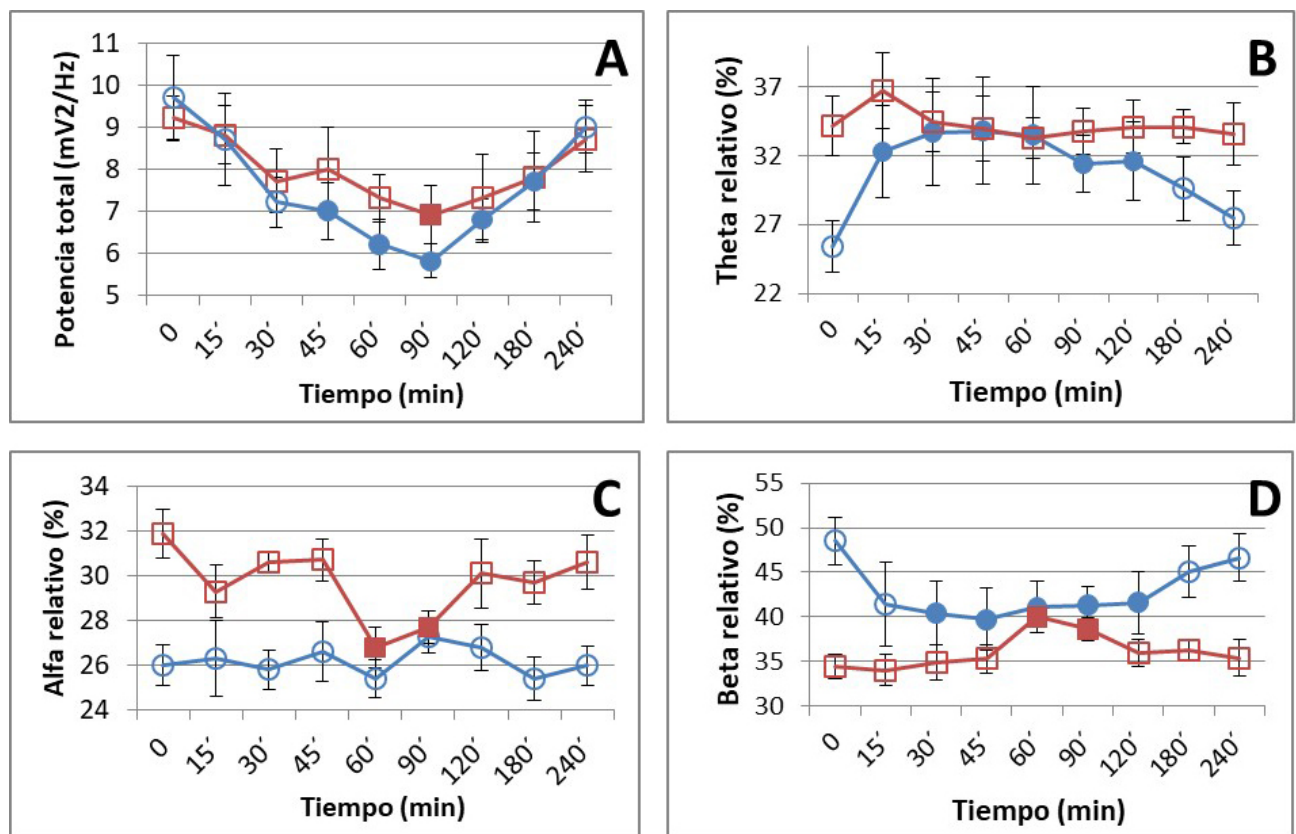


Figura 5. Actividad bioeléctrica cuantificada de los bulbos olfatorios (BO, símbolos redondos) y hemisferios cerebrales (HC, símbolos cuadrados) en el tiempo. A- Variación de la potencia total (PT, $\mu V^2/Hz$). B- Frecuencia relativa theta (% θ). C- Frecuencia relativa alfa (% α). D- Frecuencia relativa beta (% β). En todos los casos, sapos *Rhinella arenarum* ($n = 6$) ventilando en medio aéreo ($25^\circ C$) luego de una dosis 0,5 mg melatonina/100g (tiempo = 0). Los símbolos rellenos indican diferencia significativa ($P < 0,05$) respecto del tiempo 0.

min, respecto al inicio. Luego la actividad de los HC vuelve a los valores iniciales.

Frecuencias relativas en bulbos olfatorios. Con respecto a la variación de las frecuencias relativas en las distintas bandas frecuenciales, en el BO hay un aumento significativo del $\% \Theta$ ($P < 0,001$) y una disminución significativa del $\% \beta$ ($P < 0,001$) entre los 15 y 120 min de inyectada la dosis de ML (Fig. 5B y D, respectivamente).

Frecuencias relativas en hemisferios cerebrales. En cambio, en los HC se comprueba, entre los 60 y 90 min, una disminución significativa del $\% \alpha$ ($P < 0,001$) y un aumento significativo del $\% \beta$ ($P = 0,007$) (Fig. 5C y D, respectivamente).

Frecuencia cardíaca. La FC del corazón sistémico varió significativamente ($P < 0,001$) con un aumento inicial a los 15 min, para luego comenzar a disminuir llegando a un valor mínimo hacia los 120 min (Fig. 6).

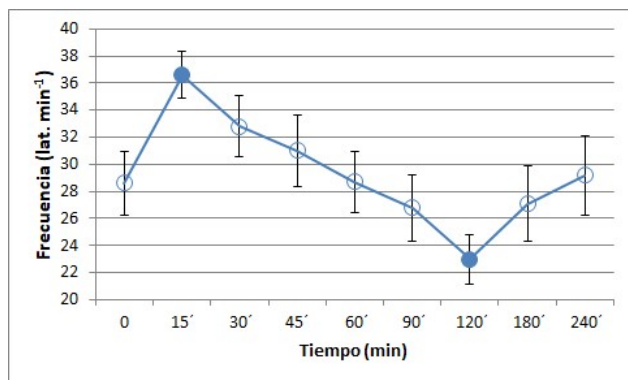


Figura 6. Variación de la frecuencia cardíaca del corazón sistémico en el tiempo en sapos *Rhinella arenarum* ($n = 6$) ventilando en medio aéreo (25 °C), luego de una dosis 0,5 mg melatonina/100g (tiempo = 0). Los símbolos rellenos indican diferencia significativa ($P < 0,05$) respecto del tiempo 0.

Discusión

Considerando la neuroanatomía y las conexiones nerviosas en el encéfalo de los anuros se comprueba que éste está fuertemente influido por el sistema olfatorio (Herrick, 1933; Scalia, 1976). Los resultados expuestos en este trabajo con-

firman dicha apreciación, desde el punto de vista neurofisiológico. Hay varias consideraciones a tomar en cuenta.

Primero, el estudio de la actividad bioeléctrica cerebral de sapos durante el verano y el invierno muestra diferencias en la amplitud y en la presencia de ritmos electroencefalográficos entre ambas épocas del año. Durante el invierno, cuando el animal está en un estado de reposo fisiológico, tanto en los BO como en los HC se puede registrar una actividad de bajo voltaje, dominada por un ritmo dentro de la banda Θ . Durante la primavera-verano, cuando los sapos salen del estado de hibernación, el cambio de comportamiento es acompañado por una activación del EEG, predominando las actividades más rápidas y de mayor amplitud, husos β en los BO, superponiéndose al ritmo Θ que perdura en el trazado.

Segundo, tanto en verano como en invierno, cuando al animal se lo expone a la aplicación de estímulos odorantes, como humo de tabaco, responde con salvas sinusoidales en los BO. Pero las salvas sinusoidales provocadas durante el invierno son de frecuencia y amplitud mucho menores, manifestándose una menor excitabilidad nerviosa respecto de las provocadas en verano.

Tercero, la bomba bucal juega un importante papel en el proceso ventilatorio de estos anfibios y permite la entrada de aire a las cavidades nasales. Dicho bombeo bucal determina la estimulación por el aire de los elementos sensoriales de la mucosa olfatoria, y su repercusión sobre la actividad bioeléctrica de los BO, y de ahí, una activación del resto del encéfalo. En este sentido, Hobson (1967a) equiparó el estado de alerta conductual con el aumento de las tasas de ventilación y el aumento de la actividad sincrónica de 8 a 12 Hz en los BO.

Cuarto, entonces, es probable que las modificaciones de la aferencia olfatoria provocadas por la eliminación de la mucosa olfativa pudiesen acarrear importantes cambios de la actividad bioeléctrica cerebral. De esta forma, en sapos con desafrentación olfatoria periférica desaparece la estimulación de la mucosa, y por ende, de los BO, lo cual desencadena un descenso de su actividad bioeléctrica, la cual repercute en el resto del SNC. Este hecho sugiere que los cambios de actividad bioeléctrica cerebral observados bajo dichas condiciones experimentales son debidos en buena parte a la supresión de la aferencia olfatoria. En los animales

con mucosa olfatoria destruida la actividad bioeléctrica de los BO y de los HC es similar, aunque no es igual, a la registrada durante el invierno.

Estos resultados reafirman una vez más, con procedimientos experimentales diferentes, la importancia de la aferencia olfatoria en la determinación de la actividad bioeléctrica cerebral de estos anfibios, y su repercusión en la excitabilidad del SNC y en su comportamiento.

Cabe mencionar, que en animales con desaferentación olfativa periférica, cuando se estimula con humo de tabaco, se registra taquicardia y una variación en los movimientos de la bomba bucal, pero sin cambios en la actividad bioeléctrica de BO y HC. Dichas variaciones pueden deberse a la estimulación del nervio trigémino cuyas terminaciones también llegan a las cavidades nasales (Sakakibara, 1978).

En poiquiloterms, durante el invierno, los peces dorados tienen una frecuencia EEG predominante de 3 a 4 Hz en reposo y de 6 a 8 Hz cuando están activos conductualmente (Laming y Savage, 1981). En verano, las frecuencias equivalentes son 6-8 y 16-24 Hz (Laming, 1980; Laming y Savage, 1981). Estos resultados muestran una característica común de la actividad EEG, con un aumento en la frecuencia, que puede o no sincronizarse, durante el comportamiento de alerta o excitación conductual. Pero además, dicha actividad puede ser modulada según la época del año.

Reportes anteriores ya muestran en los anuros una gran variación estacional. Básicamente, se ha reportado una disminución de la amplitud y cambios en las frecuencias captadas al nivel de los HC y lóbulos ópticos durante el pasaje desde el verano al invierno (Segura y de Juan, 1966). De Juan y Segura (1966) indican que existe una verdadera oscilación periódica, de tipo al parecer intrínseco, de la susceptibilidad de la actividad bioeléctrica cerebral del sapo a los estímulos exteriores, en particular los lumínicos. Una variación similar ha sido descrita por Mitarai (1955a y b) para los potenciales evocados por estímulos luminosos en el lóbulo óptico de sapo, los cuales varían de amplitud y latencia de acuerdo con las estaciones e independientemente de la temperatura.

Los resultados de la presente investigación muestran que la actividad bioeléctrica de los BO y HC en sapos también varía marcadamente según la época del año, cuando los animales manifiestan distintos tipos de reactividad nerviosa y conduc-

tual. Estos cambios consisten fundamentalmente en la ausencia de las salvas sinusoidales inducidas en los BO y en una marcada disminución de la amplitud del EEG en ambas estructuras cerebrales estudiadas durante el invierno, en correspondencia con un estado de hipoexcitabilidad.

Del análisis del EEGq se comprueba que el pasaje de verano a invierno produce una disminución de la actividad general del SNC de los sapos, evidenciado en una disminución de la PT, pero también, se observa un cambio muy marcado en la abundancia de las distintas bandas frecuenciales. En particular, con una disminución de la actividad β , por desaparición de la actividad fusil al llegar el invierno, claramente un índice de disminución de excitabilidad nerviosa, y un aumento significativo del $\% \theta$, tanto en los BO como en los HC (Tabla I).

También, es interesante mencionar que estas variaciones estacionales se den en *R. arenarum* en coincidencia temporal con cambios significativos en el contenido cerebral de adrenalina y serotonina (Segura et al., 1967). En efecto, durante la hibernación la adrenalina alcanza niveles muy bajos en tanto que la serotonina llega a su máxima concentración. Durante el período del abrazo sexual y la estivación esta situación se invierte, haciéndose muy alto el tenor de adrenalina en el SNC, mientras que la serotonina cae a sus valores mínimos.

La desaferentación olfativa periférica hace disminuir muy marcadamente la PT de la actividad bioeléctrica cerebral, con cambios en la abundancia de las distintas bandas frecuenciales, pero en este caso, sin llegar a ser tan marcadas como con el cambio de estación.

Hobson (1967a), trabajando con rana toro (*L. catesbeianus*), obtuvo resultados casi idénticos y encontró que la sincronía del EEG podría ser eliminada por sección del tracto olfativo. Esto deja en evidencia, nuevamente, el fundamental papel que cumple la información olfativa que es ingresada desde la mucosa olfatoria y que mantiene activado al BO, y éste, al resto del encéfalo.

Los cambios de coloración de la piel que se han observado en este trabajo están de acuerdo con la primera acción biológica conocida de la ML, la decoloración tegumentaria de los anuros por retracción de los melanóforos.

Los sapos utilizados en los experimentos con ML se encontraban bajo un fotoperíodo en donde la fase de oscuridad

aumentaba día a día, produciendo un aumento de la cantidad de horas en que la ML es sintetizada y liberada a la circulación. Se puede suponer que este proceso fisiológico, junto con la disminución de la temperatura ambiente, deben ser los factores desencadenantes del estado de hibernación que sufren estos animales.

La glándula pineal desempeña el papel de transductor neuroendócrino que traduce señales nerviosas en señales hormonales. A partir de la alternancia del día y la noche, una periodicidad del entorno, establece un ritmo circadiano humoral que hace la función de reloj interno o permite la sincronización con el ambiente de un marcapasos interno. La ML se secreta en la circulación a un ritmo cíclico con niveles máximos en la oscuridad, en la mayoría de las especies de vertebrados estudiadas (Johnston y Skene, 2015), incluyendo a las ranas, como *Pelophylax (Rana) perezi* (Delgado y Vivien-Roels, 1989).

Los efectos de la ML sobre la actividad cerebral pueden explicarse considerando dos mecanismos, que pueden superponerse. Que la ML actúe directamente sobre sus propios receptores en el SNC, o considerar, que esta molécula interactúa con el sistema GABAérgico central.

Wiechmann y Wirsig-Wiechmann (1993) realizaron un estudio autorradiográfico sobre la distribución de receptores de ML en el encéfalo de la rana leopardo (*L. pipens*) y demuestran que las estructuras olfativas, estriadas y límbicas expresaban la unión más fuerte en el telencéfalo. La marcada unión de ML en la distribución del tracto olfativo lateral (palio lateral) en esta rana sugiere que el sistema olfativo es un blanco para la ML. El palio lateral es la vía final de las proyecciones olfativas primarias del BO (Scalia, 1976; Scalia et al., 1991). La distribución anterior del tracto olfativo lateral situado en el palio lateral muestra la mayor unión a la ML que cualquier otra estructura olfativa (Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 1993). Más caudalmente, el palio lateral sólo muestra moderadamente sitios de unión a ML. De esta forma, la unión de la ML a receptores en el sistema olfatorio puede producir una inhibición de este sistema, que se expresa con hipoexcitabilidad de la actividad bioeléctrica de los BO, y su posterior repercusión sobre el resto del SNC.

Por otro lado, siendo el GABA el principal neurotransmisor de las sinapsis inhibitorias del SNC (Cheng et al., 2012) y a su vez, las evidencias acerca que actividad de la ML en el

cerebro tiene como objetivo a mecanismos gabaérgicos centrales (Rosenstein y Cardinali, 1990), explicaría el efecto inhibitorio de la ML sobre la actividad cerebral en los sapos. El BO tiene abundantes neuronas que contienen GABA y receptores GABAA (Brünig et al, 1999; Lledo et al., 2005).

En este sentido, los resultados mostrados en este trabajo frente al aumento de ML exógena en sangre concuerdan con los cambios observados en la actividad bioeléctrica cerebral durante el pasaje verano-invierno. En primer lugar, hay una significativa disminución de la PT de ambas estructuras cerebrales estudiadas. Por otro lado, en los BO se comprueba la desaparición de la actividad fusil y un aumento de las actividades bioeléctricas lentas sobre las rápidas.

Es sugerente que también estos cambios en el EEG se den en anuros asociado a distintos estados de vigilia. Fang et al. (2012), en la rana musca (*Babina daunchina*), encuentran una clara diferenciación entre la actividad EEG en animales alertas (activos) y en reposo. En ranas durante el período de alerta, en el telencéfalo (al igual que en el mesencéfalo) la potencia EEG se concentró en cuatro bandas de frecuencia y en tres bandas de frecuencia durante el reposo, como también un aumento de la abundancia de frecuencias más bajas en este último estado. Los sapos bajo los efectos de una dosis única de ML mostraron un estado de relajación y akinesia, con cambios en el EEG semejantes a los descriptos más arriba.

Por otro lado, en ratas se ha demostrado que la frecuencia de la banda θ cae con la disminución de la temperatura corporal (Whishaw y Vanderwolf, 1971). Así, las diferencias en los patrones de frecuencia en los anuros podrían, entonces, depender en parte del hecho de que sus encéfalos están a una temperatura mucho más baja en invierno.

Es de esperar, entonces, que en época invernal junto con la caída del metabolismo por la baja temperatura ambiente y corporal, los animales con mayores niveles de ML plasmática ingresen a un estado de inmovilidad, disminución de la frecuencia cardíaca y cambios a nivel de la actividad bioeléctrica cerebral hacia la hipoexcitabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Affanni, J.M., and Cervino, C.O. (2005). Interactions between sleep, wakefulness and the olfactory system. In: P. Par-

meggiani and R. Velluti (Eds.), *The Physiological Nature of Sleep* (571-99). London, Union Kingdom: Imperial College Press:.

- Bello Caraballo, N., Cogo Pagella, J., Iodice, O., y Cervino, C.O. (2018). Efectos de la combinación de melatonina con clorhidrato de ketamina sobre regímenes estándar de anestesia en ratas. *Rev Argent Anesthesiol*, 76(2), 75-84. doi: 10.24875/RAA.18000022.
- Bionda C. L., Lajmanovich, R. C., Salas, N. E., Martino, A. L. and di Tada, I. E.. (2011). Reproductive ecology of the common South American toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae): reproductive effort, clutch size, fecundity, and mate selection. *Journal of Herpetology* 45: 261–264.
- Boldyreva, G., and Grindel, O. (1959). The electrical activity of various parts of the frog brain. *Fiziol. Zh. SSSR*, 45(9), 1037-44.
- Brünig, I., Sommer, M., Hatt, H., and Bormann, J. (1999). Dopamine receptor subtypes modulate olfactory bulb γ -aminobutyric acid type A receptors. *PNAS*, 96(5), 2456-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2456>
- Cei, J.M. (1959). Ecological and physiological observations on polymorphic populations of the toad *Bufo arenarum* Hensel from Argentina. *Evolution*, 13(4), 532-6.
- Cervino, C.O. (1997). Estudio cuantitativo de dos nuevos ritmos bioeléctricos de los bulbos olfatorios registrados en el Armadillo Sudamericano, *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae). (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Recuperado de http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n2949 Cervino
- Cervino, C.O., y Affanni, J.M. (1996). Efectos de la sumersión sobre la actividad bioeléctrica cerebral del sapo *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae). En *IV Congreso Latinoamericano de Herpetología (ALAH)*, Santiago de Chile, Chile.
- Cervino, C.O., y Hernando, M. (2015). La melatonina como agente antioxidante: análisis de estrés oxidativo en un modelo animal con exposición a hieiro. *Rev. de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UM)*, 13, 89-103.
- Cheng, X.P., Sun, H., Ye, Z.Y., Zhou, J.N. (2012). Melatonin modulates the GABAergic response in cultured rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Sci*, 119(2), 77-85. doi: 10.1254/jphs.11183fp. Epub 2012 May 31.
- Collin, J.P., and Voisin, P. (1989). Pineal transducers in the course of evolution: Molecular organization, rhythmic metabolic activity and role. *Arch. Histol. Cytol.*, 52, 441-9.
- De Juan, A., y Segura, E. (1966). Reacción de alerta hipersincrónica en el telencéfalo de anuros. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, 42, 91-8.
- Delgado, M.J., and Vivien-Roels, B. (1989). Effect of environmental temperature and photoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eye, and plasma of the frog, *Rana perezi*: importance of ocular melatonin. *Gen. comp. Endocrinol.*, 75, 46-53.
- Duport Bru, A.S. (2020). *Rhinella arenarum*. Universo Tucumano N° 58. Fundación Miguel Lillo-CONICET. 20 pp.
- Fang, G., Chen, Q., Cui, J., and Tang, Y. (2012). Electroencephalogram bands modulated by vigilance states in an anuran species: a factor analytic approach. *J Comp Physiol A*, 198, 119-27. doi: 10.1007/s00359-011-0693-y
- Gans, C. (1969). Bullfrog (*Rana catesbeiana*) ventilation: How does the frog breathe? *Science*, 163, 1223-5.
- Gerard, R., and Young, J. (1937). Electrical activity of the central nervous system of the frog. *Proc. Roy. Soc.*, 122(B 828), 343-51.
- Golombek, D.A., Pevet, P., and Cardinali, D.P. (1996). Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system. *Neurosci Biobehav Rev.*, 20, 403-12.
- Gotman, J. (1990). The use of computers in analysis and display of EEG and evoked potentials. In: D. Daly and T. Pedley (Eds.). *Current Practice of Clinical Electroencephalography, Second Edition* (51-83). New York, U.S.A.: Raven Press.
- Herrick, J. (1933). The functions of the olfactory parts of the cerebral cortex. *Proc. N. A. S.*, 19, 7-14.
- Hobson, J.A. (1967a). Respiration and EEG synchronization in the frog. *Nature*, 213, 988-989.
- Hobson, J.A. (1967b). Electrographic correlates of behavior in the frog with special reference to sleep. *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology*, 22(2), 113-21. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(67\)90150-2](https://doi.org/10.1016/0013-4694(67)90150-2)
- Johnston, J., and Skene, D. (2015). Regulation of mammalian neuroendocrine physiology and rhythms by melatonin. *J Endocrinol*, 226(2), T187-98. doi: 10.1530/JOE-15-0119.
- Laming, P.R. (1980). Electroencephalographic studies on arousal in the Goldfish (*Carassius auratus*). *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 94(2), 238-54.

- Laming, P.R., and Savage, G.E. (1981). Seasonal differences in brain activity and responsiveness shown by the goldfish (*Carassius auratus*). *Behav Neural Biol*, 32, 386-9.
- Laming, P.R. (1982). Electroencephalographic correlates of behavior in the anurans *Bufo regularis* and *Rana temporaria*. *Behav Neural Biol*, 34(3), 296-306.
- Lledo, P-M., Gheusi, G., and Vincent, J-D. (2005). Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol. Rev.*, 85, 281-317. doi:10.1152/physrev.00008.2004.
- Mitarai, G. (1955a). Cortical response to photic stimulation (Part I). *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 62(3), 261-270.
- Mitarai, G. (1955b). Cortical response to photic stimulation (Part II). *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 62(3), 271-281.
- Olfert, E.D., Cross, B.M., and McWilliam, A.A. (1993). *Guide to the care and use of experimental animals* (vol.1, 2nd ed.). Canadian Council on Animal Care. Ottawa, Canada.
- Pereyra, M. O., Blotto, B. L., Baldo, D., Chaparro, J. C., Ron, S. R., Elias-Costa, A. et al. (2021). Evolution in the Genus *Rhinella*: A Total Evidence Phylogenetic Analysis of Neotropical True Toads (Anura: Bufonidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 447(1):1-156. <https://doi.org/10.1206/0003-0090.447.1.1>
- Pévet, P. (2000). Melatonin and Biological Rhythms. *Biol Signals Recept*, 9, 203-12. doi:10.1159/000014640
- Reiter, R.J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49, 654-64. <https://doi.org/10.1007/BF01923947>
- Reiter R.J., Tan, D.X., and Fuentes-Broto, L. (2010). Melatonin: a multitasking molecule. *Prog. Brain. Res.*, 181, 127-51.
- Rosenstein, R.E., and Cardinali, D.P. (1990). Central gammaergic mechanisms as targets for melatonin activity in brain. *Neurochemistry International*, 17(3), 373-9. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(90\)90019-P](https://doi.org/10.1016/0197-0186(90)90019-P)
- Sakakibara, Y. (1978). Localization of CO2 sensor related to the inhibition of the bullfrog respiration. *Jpn J Physiol.*, 28(6), 721-35. doi: 10.2170/jjphysiol.28.721
- Scalia, F. (1976). Structure of the olfactory and accessory olfactory systems. In: R. Llinás and W Precht. *Frog Neurobiology. A Handbook* (213-33). Berlin, Heidelberg, Germany: Springer.
- Scalia, F., Gallousis, G., and Roca, S. (1991) Differential projections of the main accessory olfactory bulb in the frog. *J. comp. Neurol.*, 305, 443-61.
- Segura, E.T., Biscardi, A.M., and Apelbaum, J. (1967). Seasonal variations of brain epinephrine, norepinephrine and 5-hydroxytryptamine associated with changes in the EEG of the toad, *Bufo arenarum* Hensel. *Comp Biochem Physiol.*, 22(3), 843-50. doi: 10.1016/0010-406x(67)90776-1
- Segura, E. and de Juan, A. (1966). Electroencephalographic studies in toads. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 21, 373-80.
- Segura, E., Colombo, J., and de Hardy, D. (1971a). Effects of castration on brain electrogram of the female toad *Bufo arenarum* Hensel. *Gen. Comp. Endocrin.*, 16, 298-303.
- Segura, E. de Hardy, D, y Negroni, J. (1971b). Aspectos comparativos de las funciones de la formación reticular bulbomesencefálica. *Revta. Soc. Argent. Biol.*, 47, 163-172.
- Sugden, D., Davidson, K., Hough, K.A., and Teh, M.T. (2004). Melatonin, melatonin receptors and melanophores: a moving story. *Pigment Cell Res.*, 17(5), 454-60. doi: 10.1111/j.1600-0749.2004.00185.x
- Vitt, L.J. and Caldwell, J.O. (2009). Chapter 7 - Thermoregulation, Performance, and Energetics. In: L.J. Vitt and J.P. Caldwell (Eds.). *Herpetology* (Third Edition) (191-213). New York, U.S.A.: Academic Press.
- Wang, F., Li, J., Wu, C. et al. (2003). The GABAA receptor mediates the hypnotic activity of melatonin in rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, 74, 573-8.
- Wehr, T.A. (1997). Melatonin and Seasonal Rhythms. *J. Biol. Rhythms*, 12(6), 518-27. doi:10.1177/074873049701200605
- Whishaw, I., Vanderwolf, C. (1971). Hippocampal EEG and behavior: effects of variation in body temperature and relation of EEG to vibrissae movement, swimming and shivering. *Physiol Behav*, 6(4), 391-7.
- Wiechmann, F. and Wirsig-Wiechmann, C.R. (1993). Distribution of melatonin receptors in the brain of the frog *Rana pipiens* as revealed by in vitro autoradiography. *Neuroscience*, 52(2), 469-80.