



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA TAREA DE DISCRIMINACIÓN
AUDITIVA DE DOS ALTERNATIVAS PARA EL ESTUDIO DE LA
TOMA DE DECISIONES PERCEPTUALES EN RATAS**

Cristóbal Arturo Veloso Oyarzún

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: DIEGO ENRIQUE ELGUEDA GONZÁLEZ

Financiamiento: FONDECYT 11190278

SANTIAGO, CHILE
2023



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA TAREA DE DISCRIMINACIÓN
AUDITIVA DE DOS ALTERNATIVAS PARA EL ESTUDIO DE LA
TOMA DE DECISIONES PERCEPTUALES EN RATAS**

Cristóbal Arturo Veloso Oyarzún

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

Nota Final

Firma

Profesor guía: Diego Elgueda González

Profesor corrector: Ricardo Olivares Pérez-Montt

Profesor corrector: Rigoberto Solís Muñoz

Financiamiento: FONDECYT 11190278

SANTIAGO, CHILE

2023

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo a FONDECYT 11190278 por financiar esta investigación, ya que sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible. También, agradezco a todas las personas que me ayudaron y apoyaron en este proceso de elaboración de mi memoria de título. Su colaboración fue fundamental para llevar a cabo este trabajo y estoy inmensamente agradecido. Entre las personas importantes que deseo agradecer, esta mi destacado profesor guía Diego Elgueda, quien además de ser un perfecto guía en este proceso, me ayudo enormemente con el desarrollo experimental y la escritura de esta memoria de título. Aprendí mucho de él en el área de la investigación en neurociencia y su apoyo fue muy grande. Otra persona que destaco en este proceso fue Roberto Saavedra, gran amigo y compañero, quien desempeñó un papel fundamental en todo el desarrollo experimental de esta memoria de título. Su colaboración y compromiso fue muy importante en este proceso. Otra persona importante fue Macarena Lobovsky, mi maravillosa novia, quien me ayudo también con la escritura y redacción de esta, además de ser un pilar fundamental en el apoyo moral para lograr finalizar este proceso. También, agradezco a mi familia por apoyarme y ayudarme en la redacción de esta y a practicar las presentaciones, incluyendo a mi profesor guía y mis amigos. Agradezco a Claudio Navarro, amigo y compañero, quien me brindó su apoyo al inicio de este proceso. Agradezco a los estudiantes y amigo/as, Pedro Obieta, Paula Rivera, Camila Castro y Jaqueline Rojas que se unieron al final de este proceso y así continuar con la investigación del Dr. Diego Elgueda. Agradezco a mis profesores correctores, Ricardo Olivares y Rigoberto Solís, por corregir minuciosamente mi memoria de título y evaluarme de manera profesional y simpática en mis presentaciones. Agradezco a Milivoy Videka, por proporcionarme su memoria de título, lo cual me brindó una estructura y guía para mi memoria de título. Además, quiero expresar mi agradecimiento a la Sociedad Chilena de Neurociencia, por la organización de su XVIII Reunión Anual donde los resultados de esta investigación fueron presentados. Por último, me agradezco a mí por ser perseverante y lograr terminar este proceso largo y difícil de titulación. Estoy orgulloso de haber superado los desafíos y haber alcanzado este logro en mi formación académica.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

1.INTRODUCCIÓN	1
2.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
3.OBJETIVO GENERAL	9
4.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
5.MATERIALES Y MÉTODOS	10
5.1 Mantenición	10
5.2 Adaptación.....	12
5.3 Entrenamiento conductual de discriminación auditiva.....	14
5.4 Parámetros de estimulación y temporalidad de la tarea.....	18
5.5 Obtención y análisis de datos (Psicofísica)	19
6.RESULTADOS	21
6.1 Rendimiento de las ratas	21
6.2 Latencias de las respuestas.....	24
6.3 Influencia de los parámetros de la tarea en el rendimiento del animal	27
7. DISCUSIÓN	32
7.1 Rendimiento de las ratas	32
7.2 Distribución de las latencias	34
7.3 Influencia de los parámetros en el rendimiento del animal	35
7.4 Calidad y Validez de los resultados	37
7.5 Proceso cognitivo.....	39
8.CONCLUSIÓN	40
9.BIBLIOGRAFÍA	42
10.ANEXO	46

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE <i>T-STUDENT</i> DE CADA RATA PARA EVALUAR LA SIGNIFICANCIA DE LAS DIFERENCIAS ENTRE LAS LATENCIAS DE LAS RESPUESTAS CORRECTAS E INCORRECTAS.....	26
TABLA 2. RESULTADOS DE LA MEDIANA, MEDIA, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LAS LATENCIAS DE LAS RESPUESTAS CORRECTAS E INCORRECTAS DE CADA RATA.....	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA DE LAS PRINCIPALES VÍAS AUDITIVAS.	4
FIGURA 2: MANTENCIÓN DE LAS RATAS EN LA UNIDAD.....	12
FIGURA 3: ADAPTACIÓN.....	13
FIGURA 4: LUGAR DE ENTRENAMIENTO.	14
FIGURA 5: ESPECTROGRAMA DE UNA NUBE DE TONOS.....	15
FIGURA 6: ENTRENAMIENTO.....	16
FIGURA 7: ESTÍMULOS AUDITIVOS Y EVENTOS EN UN ENSAYO.....	17
FIGURA 8: RENDIMIENTO DE LAS RATAS EN LA TAREA DE DISCRIMINACIÓN AUDITIVA 2-AFC DURANTE UN PERIODO DE 10 MESES.....	24
FIGURA 9: COMPARACIÓN DE LAS DISTRIBUCIONES DE LATENCIAS DE RESPUESTAS CORRECTAS E INCORRECTAS PARA CADA RATA.	26
FIGURA 10: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA MODIFICACIÓN DEL PARÁMETRO DE ESTIMULACIÓN.....	28
FIGURA 11: INFLUENCIA DEL PARÁMETRO DE ESTIMULACIÓN EN EL RENDIMIENTO EN LA TAREA DE UNA RATA.	29
FIGURA 12: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA DURACIÓN DE LOS ESTÍMULOS (SONIDO DE REFERENCIA Y OBJETIVO) EN EL TIEMPO.....	30
FIGURA 13: INFLUENCIA DE LA DURACIÓN DE LOS SONIDOS EN EL RENDIMIENTO EN LA TAREA DE UNA RATA.	31

RESUMEN

En la presente Memoria de Título, se describe en detalle la implementación de una tarea de discriminación auditiva de dos alternativas en ratas en libertad de movimiento, para evaluar la toma de decisiones en base a la información auditiva. Primero, se detalló la mantención y la adaptación que deben tener las ratas antes de ser entrenadas. Luego, se describió el entrenamiento, en donde se les enseñó a 4 ratas la tarea, mediante condicionamiento operante con refuerzo positivo (recompensa con agua), que consistió en que debían comparar y discriminar una secuencia de dos sonidos, para luego reportar si el segundo sonido era de mayor o menor frecuencia promedio respecto al primer sonido, asociando los sonidos de menor frecuencia con la boquilla ubicada a la izquierda y los sonidos de mayor frecuencia con la boquilla de la derecha. Se obtuvieron los datos del entrenamiento, los cuales se analizaron en tiempo real y posterior a éste. Es así como, se observó que 3 de 4 ratas lograron aprender la tarea en un periodo de 4 meses, a pesar de la alta dificultad que presentaba la tarea, ya que tenía una alta variedad de frecuencias (1-50 kHz). Además, se comparó la latencia de las respuestas correctas e incorrectas de cada rata, observándose que la latencia de las respuestas correctas mostraron un menor tiempo de respuesta y menor dispersión del conjunto de sus respuestas en comparación con la latencia de las respuestas incorrectas; sugiriendo una mayor seguridad y precisión en las decisiones tomadas por las ratas a la hora de hacer la tarea. Por último, se encontró que algunos parámetros de estimulación y temporalidad influyen el rendimiento del animal, por lo que se propuso una forma óptima de entrenamiento para este tipo de tarea.

Palabras claves: Ratas, Sprague Dawley, 2-AFC, tarea de discriminación auditiva, toma de decisión, restricción de agua.

ABSTRACT

In this Title Report, we describe in detail the implementation of a two-alternative auditory discrimination task in freely-moving rats to assess decision making based on auditory information. First, the maintenance and adaptation that the rats must have before being trained was detailed. Then, the training was described, where 4 rats were taught the task, by means of operant conditioning with positive reinforcement (reward with water), which consisted of comparing and discriminating a sequence of two sounds, and then reporting whether the second sound was of higher or lower average frequency with respect to the first sound, associating the sounds of lower frequency with the mouthpiece located on the left and the sounds of higher frequency with the mouthpiece on the right. Training data was obtained and analyzed in real time and post training. It was observed that 3 out of 4 rats managed to learn the task within 4 months, despite the high difficulty of the task, as it had a high variety of frequencies (1-50 kHz). In addition, the latency of the correct and incorrect responses for each rat was compared and it was observed that the latency of the correct responses showed a shorter response time and less dispersion of the set of their responses compared to the latency of the incorrect responses, this suggests greater safety and accuracy in the decisions made by the rats when performing the task. Finally, some parameters of stimulation and temporality were found to influence the performance of the animal, therefore, an optimal way of training for this type of task was proposed.

Keywords: rats, Sprague Dawley, 2-AFC, auditory discrimination task, decision-making, water restriction.

1.INTRODUCCIÓN

El sistema auditivo permite que los animales se adapten a su entorno mediante la captación y representación neural de las vibraciones mecánicas que se propagan por el ambiente, constituyendo la percepción de los sonidos. Dicha información es utilizada por el cerebro para la interpretación de los estímulos acústicos y su asociación con eventos potencialmente perjudiciales o beneficiosos para la adaptación del individuo, lo que mediante la toma de decisiones y la generación de respuestas lleva, finalmente, a cambios adaptativos en el comportamiento (Shamma *et al.*, 2011; Bizley y Cohen, 2013).

Hasta el momento, se ha descrito en detalle como las vibraciones acústicas entran al oído, se transforman en impulsos nerviosos y dicha información llega a la corteza auditiva, pero no se tiene un mayor conocimiento de cómo el procesamiento auditivo es influenciado por representaciones neurales internas tales como la memoria, decisiones o atención, para llevar a la formación de objetos perceptuales auditivos. Se cree que esta influencia está dada por una masiva interconexión de partes del cerebro asociadas a funciones cognitivas superiores, como la corteza frontal, con el sistema auditivo, lo que ayudaría a que en las diferentes áreas de la corteza auditiva se vayan incorporando aspectos cognitivos, a las representaciones neurales de los sonidos (Fritz *et al.*, 2010; Elgueda *et al.*, 2019).

En este contexto, comprender cómo los aspectos cognitivos se integran con la información sensorial es uno de los desafíos más relevantes de la neurociencia actual, y aún se conoce muy poco sobre cómo las decisiones que toma un animal van influenciando las etapas del procesamiento neural de los sonidos. Una forma de estudiar como la cognición afecta la función sensorial es mediante el análisis de la función neural, mientras los animales utilizan sus funciones cognitivas en la realización de una tarea conductual. Es por ello que, para la presente Memoria de Título, se implementó una tarea de discriminación auditiva diseñada para investigar, en ratas, los procesos neurales involucrados en la toma de decisiones basada en información auditiva. Dicha implementación se realizó en condición de libertad de movimiento, pero se espera, en futuros estudios, implementar esta tarea en condición de fijación craneal en un aparato estereotáxico modificado, para permitir que se realicen registros neurofisiológicos estables durante su realización. Esta tarea tiene el

potencial de ser una herramienta fundamental para investigar los procesos neurales que subyacen la percepción auditiva y la toma de decisiones (Carandini y Churchland, 2013; Znamenskiy y Zador, 2013; Gronskaaya y von der Behrens, 2019).

2.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El sistema auditivo de los mamíferos se compone de dos partes principales: el oído externo, que capta las vibraciones del entorno (señal física), y el oído interno, que convierte esta señal física en un impulso eléctrico, el cual es transmitido a través de las vías y centros auditivos del sistema nervioso para que podamos percibir el sonido en el cerebro. El recorrido ascendente de este impulso eléctrico es el siguiente:

1. La señal bioeléctrica viaja inicialmente por el nervio auditivo hasta llegar al tronco cerebral. En este trayecto, pasa por los núcleos cocleares y luego por el complejo olivar superior, donde la señal se decodifica en términos de duración, intensidad y frecuencia.
2. A continuación, la señal llega al mesencéfalo, pasando por el lemnisco lateral o directamente al colículo inferior, donde se realiza la localización de la señal en el espacio.
3. Luego, se dirige hacia el tálamo, específicamente al cuerpo geniculado medial, donde se integra la información obtenida de las señales auditivas.
4. Finalmente, la señal alcanza la corteza auditiva, ubicada en el área temporal del cerebro, la cual se encarga de la percepción y discriminación de los sonidos (Biacabe *et al.*, 2000).

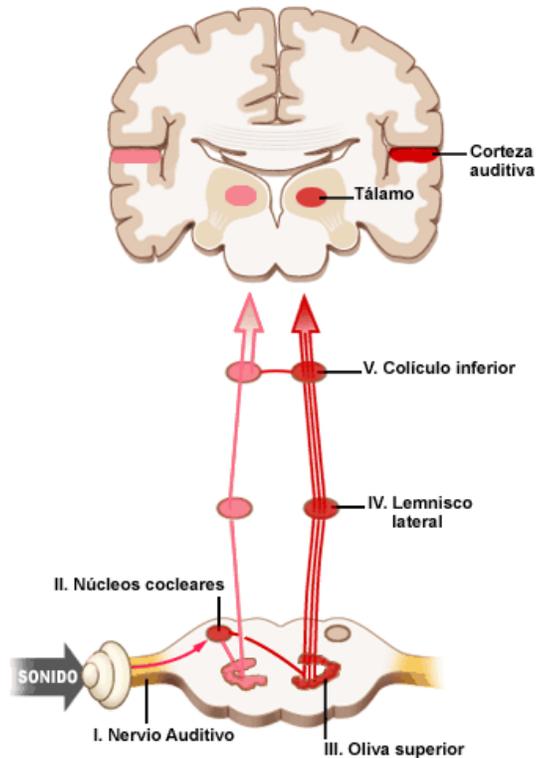


Figura 1: Esquema de las principales vías auditivas (Blatrix, 2016).

La percepción auditiva se construye mediante la integración de la información sensorial acústica con información cognitiva asociada a la experiencia, atención, decisiones y metas de un animal en un determinado contexto (Shamma *et al.*, 2011; Bizley y Cohen, 2013). Dicha integración permite que el cerebro forme objetos perceptuales auditivos que contienen información sobre los atributos físicos de los estímulos (frecuencia, intensidad, entre otros), pero también sobre propiedades cognitivas relevantes relacionadas con un estímulo, tales como su significado o importancia (Bizley y Cohen, 2013; Elgueda *et al.*, 2019).

En las últimas décadas se han realizado varios estudios sobre la neurofisiología de la corteza auditiva en mamíferos y cómo algunos procesos cognitivos, como la atención y la toma de decisiones, pueden influenciarla. Estas influencias se sustentan en una masiva interconexión del sistema auditivo con áreas del cerebro encargadas de funciones cognitivas superiores (Hackett, 2011), tales como las cortezas frontal y parietal y otras

áreas cerebrales como aquellas pertenecientes al sistema límbico (Hackett, 2011; Elgueda y Delano, 2020).

Dentro de los estudios neurofisiológicos del sistema auditivo que se han realizado en animales, se encuentran aquellos en que éstos son entrenados para realizar tareas conductuales, mientras sus respuestas neurofisiológicas son registradas. Por ello, muchas veces estos estudios se realizan tras una cirugía de implante que permite ya sea posicionar electrodos de manera crónica en una zona de interés en el cerebro (Znamenskiy y Zador, 2003) o la sujeción total de la cabeza, de manera de posibilitar la inserción de electrodos posteriormente y lograr un registro estable de las respuestas neurales de la corteza auditiva y de otras áreas del cerebro, mientras los animales realizan la tarea conductual (Schwarz *et al.*, 2010; Fritz *et al.*, 2003; Elgueda *et al.*, 2019).

Frecuentemente se ha utilizado un modelo de tareas llamado *Go/No Go* (Ir / No ir), en el que el animal aprende a reportar la detección de un sonido objetivo (también llamado “de advertencia”), presentado posterior a una serie de sonidos de referencia (o “seguros”), por lo que deben utilizar la atención selectiva para detectar de mejor manera las características acústicas que definen al sonido objetivo y diferenciarlo del sonido de referencia (Heffner y Heffner, 1995). En estos estudios los animales aprenden, mediante condicionamiento operante, a reportar la detección del sonido objetivo, absteniéndose de beber agua desde una boquilla, mientras se les permite beber agua libremente durante la presentación de los sonidos de referencia. Esta tarea se basa en la asociación del estímulo de advertencia con un refuerzo negativo, es decir, un leve castigo en aquellos casos en que los animales fallan en reportar la detección del sonido de advertencia (Heffner y Heffner, 1995). Así, en varios experimentos *Go/NoGo* que se han utilizado en la investigación del sistema auditivo, si posterior a la presentación de un sonido de advertencia, los animales no se abstenían de beber agua, éstos recibían una leve descarga eléctrica en la cola (Fritz *et al.*, 2010; David *et al.*, 2012; Atiani *et al.*, 2014; Bagur *et al.*, 2018; Elgueda *et al.*, 2019).

Los estudios basados en tareas auditivas *Go/NoGo*, han sido fundamentales para comprender cómo la atención selectiva influencia las respuestas de las diversas áreas de la corteza auditiva del hurón (Fritz *et al.*, 2003; David *et al.*, 2012; Atiani *et al.*, 2014; Elgueda *et al.*, 2019), de estructuras subcorticales como el colículo caudal o inferior (Slee y

David, 2015) e incluso la corteza frontal (Fritz *et al.*, 2010; Elgueda *et al.*, 2019). En todos estos estudios, el hallazgo general ha sido una mayor representación neural relativa de los sonidos de advertencia cuando estos son atendidos por el animal, en detrimento de la representación de los sonidos seguros. Más recientemente, estos estudios basados en tareas *Go/NoGo*, han dado pistas sobre cómo las representaciones neurales auditivas se van transformando desde lo físico a lo cognitivo en los sucesivos pasos de procesamiento cortical, desde la corteza auditiva primaria hasta las áreas corticales terciarias y la corteza frontal, mediante la incorporación de respuestas que codifican aspectos cognitivos sobre los sonidos, tales como su significado (Fritz *et al.*, 2010; Atiani *et al.*, 2014; Elgueda *et al.*, 2019). Estos estudios mostraron, por primera vez, que existe una integración de la información sensorial ascendente con la información abstracta sobre los sonidos que, como hipotetizan los autores, podría provenir de áreas de asociación de la corteza cerebral, tales como la corteza frontal. Pese a ello, la estructura temporal de las tareas *Go/NoGo*, no permite determinar si en estas representaciones de los aspectos cognitivos de los sonidos existe codificación de la decisión tomada por el animal, ya que no se puede desambiguar si los errores en las respuestas de los animales corresponden a errores perceptuales o a errores en la temporalidad de la respuesta motora (Elgueda *et al.*, 2019).

Existe también otro importante modelo de tarea de discriminación perceptual, llamado elección forzada de dos alternativas (2-AFC, *Two-Alternative Forced Choice*), que consiste en entrenar al animal para que aprenda a discriminar y asociar dos posibles estímulos objetivos con dos respuestas motoras (Znamenskiy y Zador, 2013; Tsunada *et al.*, 2016). Por su estructura con dos alternativas, los protocolos experimentales basados en tareas 2-AFC, son los más utilizados en las investigaciones relacionadas con los mecanismos neurales asociados a la toma de decisiones perceptuales. Mediante este tipo de tarea, se ha podido descubrir que existen circuitos entre la corteza auditiva y el cuerpo estriado, encargados de codificar las decisiones de ratas mientras realizaban una tarea de discriminación auditiva. Asimismo, el rol causal de estas neuronas sobre las decisiones fue demostrado usando técnicas de estimulación optogenética (Znamenskiy y Zador, 2013).

En primates, se demostró que, si bien las áreas auditivas primarias y secundarias codifican fielmente las propiedades acústicas de los sonidos, sólo un área secundaria en

especial (llamada *belt* anterolateral), presentó modulaciones en sus respuestas que se correlacionaron con la decisión tomada por el animal. Asimismo, al realizar microestimulación de esta área, se pudo influenciar la decisión tomada por los animales experimentales, demostrando un rol causal en la elección tomada por los primates (Tsunada *et al.*, 2016). Estudios en que se entrenaron a ratas en una tarea 2-AFC de discriminación espectral y espacial, permitieron establecer que los sonidos asociados a una respuesta correcta, causan respuestas de mayor amplitud en la corteza auditiva primaria, lo que además fue sensible a la historia de estimulación previa al estímulo objetivo (Gronskaya, 2017; Gronskaya y von der Behrens, 2019).

Los paradigmas *Go/NoGo* y 2-AFC, son dos de los modelos más usados hasta ahora, para estudiar la influencia de la cognición en el sistema auditivo, de los cuales el más indicado para el estudio de la toma de decisión es el método 2-AFC, debido a que el modelo *Go/No Go*, sólo comprende una posible respuesta y puede presentar ambigüedad en la interpretación de las respuestas incorrectas (Carandini y Churchland, 2013; Elgueda *et al.*, 2019).

Sin embargo, como aún no se ha demostrado cómo las decisiones que toma un animal se incorporan en las sucesivas etapas de procesamiento cortical auditivo, para esta Memoria de Título se diseñó un modelo de tarea auditiva 2-AFC, que permitirá continuar con la investigación sobre las transformaciones de las representaciones neurales en la jerarquía cortical auditiva (Elgueda *et al.*, 2019), pero en el contexto de la toma de decisiones. En dicha tarea, modificada de Znamenskyi y Zador (2013), se entrenó ratas para que compararan y discriminaran entre dos tipos de sonidos y reportaran su decisión eligiendo una de dos posibles respuestas motoras. Estos dos sonidos, uno de baja y otro de alta frecuencia promedio, se asociaron con una recompensa en una de las dos boquillas de agua que se ubicaron a la izquierda y a la derecha (respectivamente), de la cabeza del animal. La implementación de dicha tarea, primero en libertad de movimiento, y luego en condición de fijación craneal, permitirá realizar estudios neurofisiológicos mientras las ratas realizan la conducta, para estudiar cómo los aspectos cognitivos relacionados con la toma de decisiones van incorporándose sucesivamente en las etapas de procesamiento

neural de los sonidos, para ir generando objetos perceptuales auditivos que conduzcan a la producción de cambios adaptativos del comportamiento.

Durante el desarrollo de la presente Memoria de Título se realizó el entrenamiento de los animales en una condición de libertad de movimiento, lo que tiene por finalidad establecer que las ratas poseen la capacidad sensorial y cognitiva para percibir las diferencias acústicas entre los sonidos de la tarea y asociarlas con las dos posibles respuestas. Esto permitirá, prontamente, implementar esta tarea en condición de fijación craneal, haciendo posible que en futuros experimentos se obtenga un preciso registro neurofisiológico en condiciones altamente controladas, mediante el uso de metodologías como la medición de imágenes de Ca^{2+} de 2 fotones, electrofisiología intracelular o extracelular, resonancia magnética funcional o ultrasonido funcional, entre otros, e incluso incorporando técnicas de manipulación de actividad neurofisiológica como la optogenética y quimiogenética, permitiendo la integración de circuitos neuronales y su simultáneo registro a diferentes niveles de observación (Schwarz *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2014; Bjerre y Palmer, 2020).

Comprender cómo y dónde se integra la información cognitiva con la información sensorial en la vía auditiva, es uno de los mayores desafíos actuales en la investigación en neurociencia del Sistema Auditivo, y los avances que se puedan obtener en esta disciplina tienen el potencial de proveer valiosa información sobre los mecanismos de la cognición en el organismo sano y en patologías tales como la dislexia, sordera y déficit atencional, entre otras.

3.OBJETIVO GENERAL

Implementar una tarea de discriminación auditiva con dos alternativas, para el estudio de procesos neurales involucrados en la toma de decisiones perceptuales auditivas en ratas.

4.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Entrenar ratas para que comparen y discriminen sonidos complejos (nubes de tonos), en categorías de mayor o menor frecuencia.
- 2.** Cuantificar y analizar el rendimiento de las ratas en la tarea de discriminación auditiva.
- 3.** Determinar qué y cómo los parámetros de estimulación y temporalidad, modulan el rendimiento conductual de los animales, en el desarrollo de la tarea experimental.

5.MATERIALES Y MÉTODOS

Los sujetos experimentales correspondieron a ratas adultas, machos, de la cepa *Sprague-Dawley*, que fueron adquiridos en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina y en el Bioterio de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile. En la presente Memoria de Título se utilizaron 4 ratas de 1 mes de edad, correspondientes a cantidades similares a las utilizadas en estudios previos (Jaramillo y Zador, 2010, 2014; Jaramillo *et al.*, 2014; Znamenskiy y Zador, 2013). Estas ratas fueron denominadas con los siguientes nombres: *Brie*, *Cheddar*, *Gouda* y *Tofu*.

Los procedimientos experimentales se realizaron en el Laboratorio Centralizado de Investigación Veterinaria (LaCIV), que se encuentra en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Los animales fueron mantenidos en la Unidad de Mantención de Animales (UMA) del Departamento de Medicina Preventiva, la cual se encuentra acondicionada para estos fines con control de temperatura y humedad ambiente (Figura 1A). Los animales sólo fueron manipulados por los investigadores del proyecto. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA), de la Universidad de Chile (Protocolo 19317-VET-UCH-e3).

5.1 Mantención

Una vez que las ratas ingresaron por primera vez a la UMA, fueron monitoreados diariamente para asegurar un adecuado estado de salud, mediante el protocolo de supervisión respectivo (Anexo 1) y se registraba en la planilla de evaluación de salud (Anexo 2). Se registró el peso de las ratas de manera diaria. Durante la fase de crecimiento de los animales, se estableció como peso base aquel registrado después de un periodo de 3 días de acceso libre al agua cada semana. Una vez que las ratas alcanzaron un peso adulto (500 - 580 g, Brower *et al.*, 2015) durante un mes, se estableció como peso basal el promedio de pesos en condiciones de acceso libre al agua, el cual se reajustó mensualmente. El peso basal fue usado como referencia para evaluar diariamente la condición de las ratas cuando éstas se encontraban en periodos de restricción de acceso al agua.

Las ratas se mantuvieron en cajas de policarbonato (AnCare R20), en pares durante los primeros días y luego fueron mantenidas de manera individual para evitar agresiones entre ellas. Fueron provistas en todo momento de alimento *ad-libitum* (LadDiet ProLab RMH3000) y, además, fueron provistas de tubos de PVC en sus cajas a modo de enriquecimiento ambiental, y periódicamente eran puestas en grupos en una jaula de juego (Prevue Pet 528), siempre y cuando esto no implicara algún riesgo para el bienestar de los animales (Figura 1B). Las ratas fueron mantenidas con un ciclo invertido de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (horas luz entre las 8:00 y 20:00 hrs). La UMA se mantuvo con una humedad relativa entre 30 y 70% y una temperatura entre 20-26 °C (*National Research Council*, 2011), lo que fue controlado con un equipo de aire acondicionado de 9000 BTU y monitoreado constantemente mediante un termómetro e higrómetro digital.

Las ratas fueron entrenadas 4 días por semana en las mañanas (de martes a viernes), para discriminar estímulos y recibir recompensa en forma de agua. Para mantener la motivación de los animales en la recompensa de la tarea conductual, fueron sometidos a un régimen de restricción de acceso al agua en el que se les retiraba la botella de agua el día lunes a las 11 hrs (Anexo 3). Los animales que por algún motivo se encontraran fuera de estudio, fueron marcados con una tarjeta de color verde en su caja, y tuvieron acceso *ad-libitum* a agua y alimento, en cambio, los que se encontraban en estudio (entrenamiento), fueron marcados con una tarjeta de color naranja, y tuvieron acceso restringido a agua de lunes a viernes, pero con alimento *ad-libitum* (Anexo 4). Todos los animales tuvieron acceso libre al agua y comida durante los fines de semana; proveyéndolos de agua desde el día viernes, después del entrenamiento, hasta el siguiente día lunes, y los días festivos, en los cuales no fueron entrenados, se les proveyó de suficiente agua para suplir sus necesidades diarias de consumo de agua. Durante las sesiones de entrenamiento se procuró que cada animal consumiera agua hasta la saciedad, y en los casos en que los animales desistieran de realizar la tarea, fueron provistos de agua en su caja hasta que alcanzaran la saciedad.

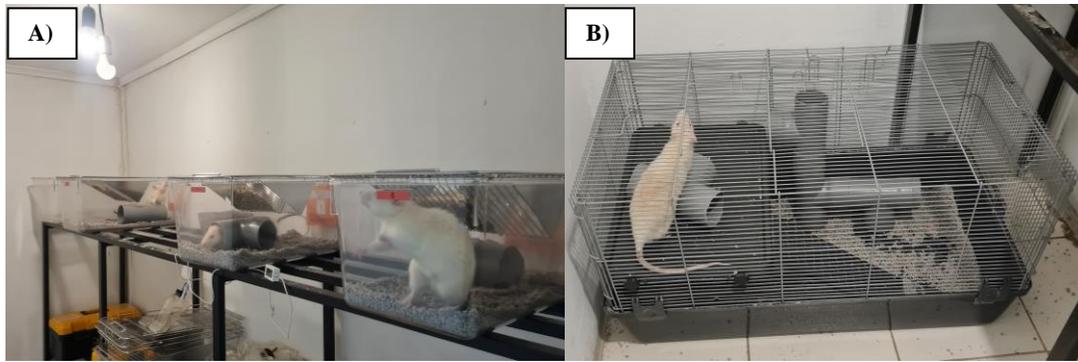


Figura 2: Mantenimiento de las ratas en la Unidad. A) Unidad de mantención animal (UMA). B) Jaula de enriquecimiento.

5.2 Adaptación

La primera semana se dejó que las ratas se habituaran a la UMA, para disminuir el estrés por el viaje desde los Bioterios de origen hasta la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

La segunda semana en la UMA, las ratas fueron familiarizadas progresivamente a los investigadores a cargo de su manipulación (entre 30 - 60 minutos diarios), a la caja de transporte (acondicionada para tales fines), a la cámara de condicionamiento operante, la que se encuentra dentro de una cabina acústica, y a los sonidos de entrenamiento. Esta etapa fue realizada en 5 días, en donde cada día se le fue agregando nuevos estímulos para su adaptación.

- Día 1: se le colocó las manos de los manipuladores dentro de la caja donde está la rata durante 5 minutos para que la rata se habituara, luego pasado este tiempo, se intentó acariciar a las ratas durante 30 minutos, permitiendo que se acercara y se alejara, sin sujetarla.
- Día 2: se repitió el procedimiento del primer día, y se agregó la manipulación mediante la cola y con el uso de tubos (*tail handling* y *tunnel handling*) (Figura 2A y 2B).
- Día 3: se repitió lo del segundo día y además fueron colocadas en la caja de transporte durante 10 minutos (Figura 2C).

- Día 4: se repitió lo del tercer día, pero una vez que se colocaron en la caja de transporte, fueron llevadas a LaCIV, para que se habituaran al aparato de entrenamiento durante unos 10 minutos (Figura 2D).
- Día 5: se repitió el procedimiento del cuarto día, pero cuando estuvieron en el aparato de entrenamiento, se les presentó los sonidos de entrenamiento para su habituación, sin sobrepasar los 60 dB SPL.

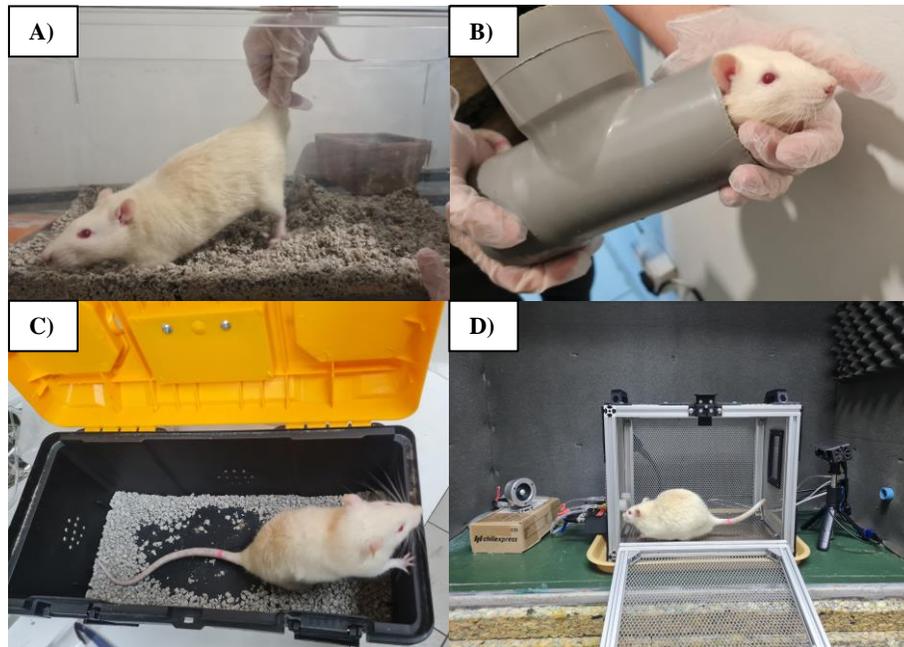


Figura 3: Adaptación. A) Manejo desde la cola de la rata. B) Manejo de la rata con tubo. C) Adaptación de la rata en la caja de transporte. D) Adaptación al aparato de entrenamiento.

La tercera semana fueron sometidas a la restricción de agua (4 días), previo al entrenamiento conductual, con la finalidad de generar la adaptación del animal a esa condición y mantener la motivación del animal por obtener agua en condiciones experimentales. En este periodo, los animales aprendieron a obtener agua exclusivamente desde el aparato de entrenamiento. Durante este período se monitoreaba diariamente la hidratación (estimado mediante retorno de pliegue cutáneo) y el peso de los animales (antes y después del entrenamiento), además de su estado de salud general y conducta (Guo *et al.*, 2014). Diariamente se completó una ficha de supervisión de la condición de los animales, adaptada de Morton y Griffiths (1985) (Anexo 2).

5.3 Entrenamiento conductual de discriminación auditiva

Las ratas fueron entrenadas en una cámara de condicionamiento operante (Caja de Skinner modificada), construida de aluminio, (35 cm largo, 28 cm ancho, 27 cm alto) que tenía 2 boquillas en su panel principal, una a la izquierda y otra a la derecha, la cual les permitía la conducta en libertad de movimiento (Figura 3A). Los animales fueron entrenados siempre en la misma caja y sala, y también por el mismo equipo de investigadores, para disminuir las condiciones que pudieran causar estrés. La caja operante se encontraba dentro de una cabina acústica construida para estos fines, que aísla la caja de condicionamiento de los sonidos externos no controlados (aproximadamente 42 dB SPL a 1000-6000 Hz), además dentro de esta cabina acústica había un parlante de alta frecuencia que generaba los sonidos de entrenamiento (Tucker-Davis Technologies [TDT], MF1), un micrófono que captaba estos sonidos, lo que permitía escucharlos fuera de ésta y una cámara infrarroja (Raspberry Pi Camera Module 2 NoIR), que permitía ver el comportamiento de la rata desde una computadora (Figura 3, B).

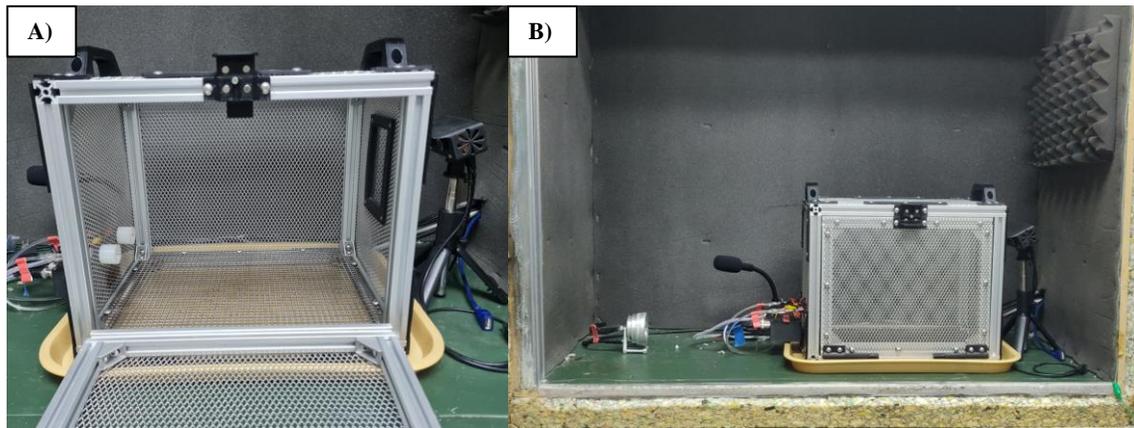


Figura 4: Lugar de entrenamiento. A) Cámara de condicionamiento operante, dentro de esta jaula al lado izquierdo presenta 2 boquillas por donde sale el agua en forma de recompensa, que actúa como refuerzo positivo, y al lado derecho presenta una ventana de acrílico para poder ver al animal a través de una cámara. B) Cabina acústica, dentro de esta se encuentra la cámara de condicionamiento operante, el parlante que emite los sonidos de entrenamiento, un micrófono que capta estos sonidos de entrenamiento, una cámara infrarroja que graba la conducta del animal en la oscuridad.

El período de entrenamiento fue de aproximadamente de 4 meses, el cual consistió en enseñar al animal a reportar si un sonido objetivo era de mayor o menor frecuencia

promedio, respecto a una presentación previa de un sonido de referencia. El animal debía aprender a asociar los sonidos objetivos de menor frecuencia promedio con la boquilla ubicada a la izquierda y los sonidos de mayor frecuencia promedio con la boquilla de la derecha. Tanto los sonidos de referencia como los sonidos objetivos consistieron en “nubes de tonos”, es decir, en una secuencia (0,2 – 1 s) de tonos asincrónicos, de frecuencias centradas respecto a una frecuencia promedio (1 – 50 kHz) (Figura 4). Se trabajó dentro de este rango de frecuencias debido a que las ratas tienen un rango de audición que va entre 250 – 80.000 Hz (Budelsky *et al.*, 2020).

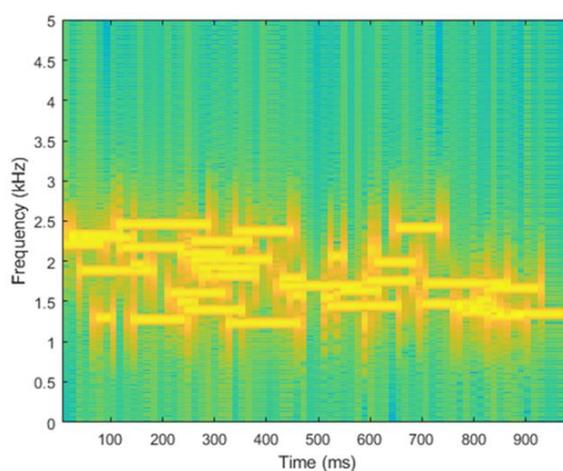


Figura 5: Espectrograma de una nube de tonos. Es una representación gráfica de una nube de tonos. En donde, el eje Y representa las frecuencias y el eje X representa el tiempo. Cada barra amarilla representa un tono y al conjunto de esos tonos se le llama “nube de tonos”.

Los estímulos sonoros fueron generados utilizando un dispositivo multifunción DAQ de *National Instruments*® (PCI – 6251) a 200.000 puntos/s, amplificados con un amplificador (*TDT* modelo SA1), atenuados con un atenuador programable (*TDT*, modelo PA5) y suministrados con el altavoz *TDT* MF1. El parlante se ubicó siempre a 20 cm de la línea media de la pared frontal de la jaula de entrenamiento. Los sonidos de referencia y objetivo se presentaron a intensidades moderadas (60 – 70 dB SPL). Las intensidades de los sonidos generados fueron calibradas con un sonómetro (*Uni-T* UT353). Las respuestas correctas, es decir, aquellas en que la rata contactó la boquilla correspondiente (izquierda o derecha), al sonido objetivo (de menor o mayor frecuencia promedio, respectivamente),

fueron recompensadas con 30 a 90 μL de agua, que fueron suplementados por una bomba de dos jeringas construida para estos fines y controlada remotamente mediante *software*. Las respuestas incorrectas fueron castigadas con un período sin estimulación acústica ni agua (3 – 12 s), evitando así el uso de penalizaciones que causaran daño o dolor en el animal. Las omisiones no fueron castigadas, y fueron continuadas tras 3 s por el siguiente ensayo (Figura 5). Los contactos del animal con las boquillas fueron captados mediante la conexión de las boquillas de acero inoxidable a un circuito sensor capacitivo (Arduino TTP226), el cual enviaba una señal de 5 VDC al dispositivo DAQ al detectar contacto.

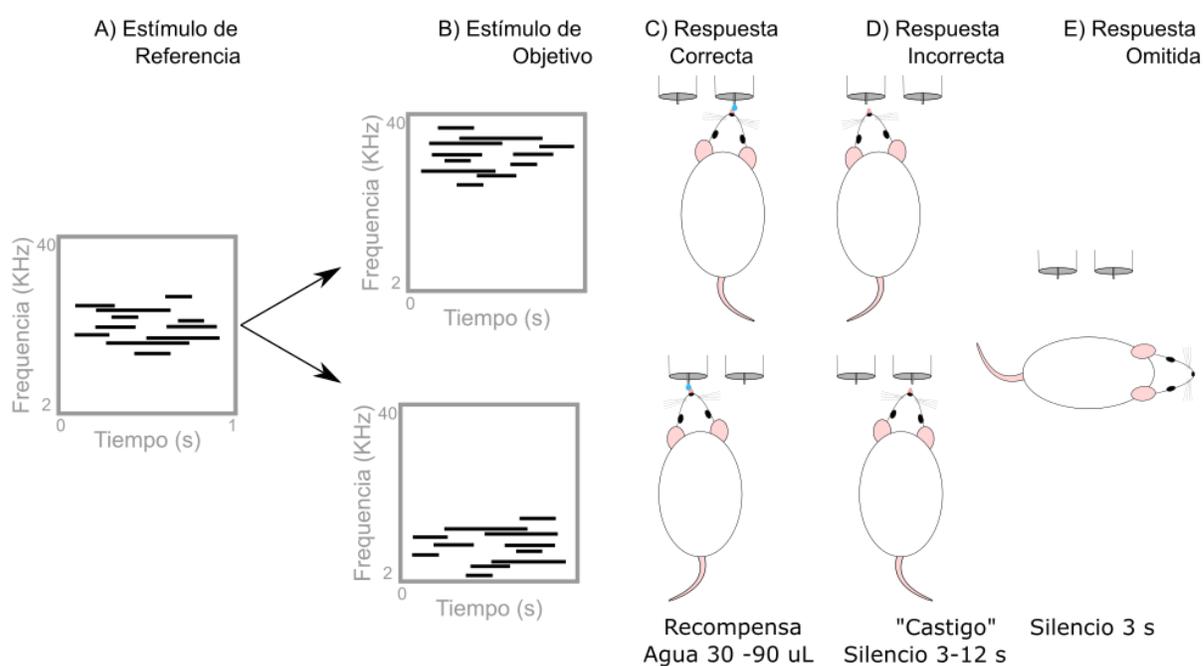


Figura 6: Entrenamiento. A) Primero se presenta el sonido de referencia, B) luego se presenta un sonido objetivo que podía ser de mayor o menor frecuencia respecto al sonido de referencia, C) si el sonido objetivo es de mayor frecuencia, la respuesta correcta corresponde al contacto con la boquilla del lado derecho, si el sonido objetivo es de menor frecuencia, la respuesta correcta es el contacto de la lengua con la boquilla del lado izquierdo y será recompensado con agua. D) La respuesta incorrecta es la acción contraria a lo mencionado anteriormente y será “castigado” con un tiempo de silencio, sin recompensa ni presentación de sonidos. E) Si el animal no contacta una boquilla en respuesta a los sonidos, se considera respuesta omitida. Los contactos con una boquilla durante la presentación de un sonido de referencia se consideran “Respuestas Tempranas” y son castigados con un tiempo de silencio.

Un ensayo consistió en una secuencia de 2 sonidos (referencia y objetivo) y una ventana de respuesta de 3s, para que el animal realizara algún contacto con la boquilla. Si el animal respondía en ese tiempo (ventana de respuesta), se evaluó su respuesta en correcta o incorrecta. Si el animal respondía antes del sonido objetivo o al inicio de este (200 ms), se consideró respuesta temprana. Y si la rata respondía después de la ventana de respuesta o no respondía se consideró una respuesta omitida (Figura 6).

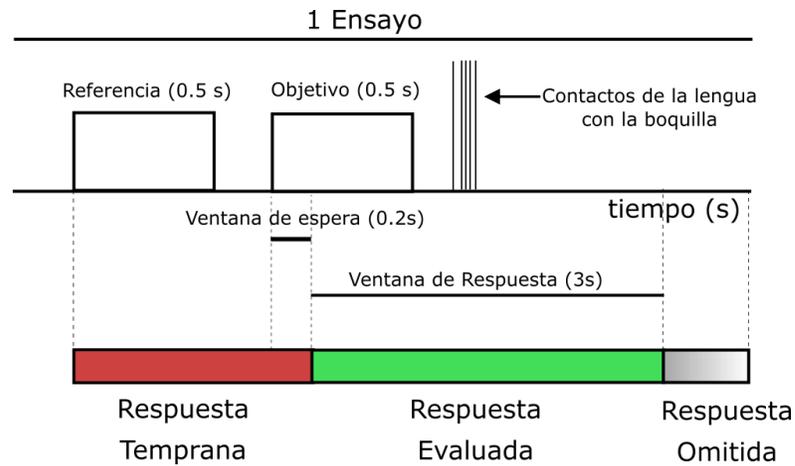


Figura 7: Estímulos auditivos y eventos en un ensayo. Un ensayo está compuesto de una secuencia de 2 sonidos (referencia y objetivo), representados gráficamente por dos rectángulos. Los contactos de la lengua con la boquilla son representados por líneas verticales que marcan la temporalidad de las respuestas. Abajo, una barra con 3 colores representa las ventanas de tiempo en que las respuestas son consideradas tempranas (rojo), evaluadas (verde) u omitidas (gris) siguiendo el esquema temporal de los sonidos.

La dificultad de la tarea fue controlada variando la duración de los estímulos y la diferencia en las frecuencias centrales de las nubes de tonos objetivo y de referencia, la cual se midió en octavas. Así, una tarea de menor dificultad consistió en sonidos objetivo y de referencia con frecuencias distantes (>1 octavas). Asimismo, se controló la dispersión de las frecuencias de cada nube de tonos (octavas relativas a la frecuencia central), lo que permitió controlar el grado de solapamiento de las frecuencias presentes en los sonidos de referencia y objetivo. El paradigma experimental, al igual que la generación de sonidos y la adquisición de datos fueron controlados por un dispositivo multifunción *National Instruments*® (PCI- 6251) y controlados en un PC por *software* escrito en *Matlab*®.

Cada sesión de entrenamiento estuvo constituida por varios ensayos, y su duración estaba determinada por el momento en que la rata alcanzaba la saciedad por ingesta de agua (60-90 minutos, generalmente). Se aseguró una ingesta de agua diaria de aproximadamente 10 – 15 mL, la cual fue recibida durante el entrenamiento o suplementado luego de la sesión de entrenamiento (Schwarz et al., 2010).

Aquellos animales que alcanzaron un alto rendimiento en la tarea, es decir, un índice de discriminabilidad igual o mayor al 70% por sesión, de manera consistente (durante una semana), se les consideró que aprendieron la tarea (Guo *et al.*, 2014) y fueron destinados a una cirugía de implante para realizar entrenamiento y registros neurofisiológicos en condición de cabeza fija, en el marco del proyecto de investigación que financia la presente Memoria de Título.

5.4 Parámetros de estimulación y temporalidad de la tarea

Los parámetros de estimulación y de temporalidad de la tarea, que fueron modificados para observar su influencia en el rendimiento conductual de los animales en la tarea experimental fueron:

Parámetros espectrales:

- Variedad de posibles frecuencias centrales para la generación de nubes de tonos
- Octavas de separación del sonido objetivo con respecto al sonido de referencia
- Ancho de banda de las nubes de tono

Parámetros temporales:

- Duración de los sonidos de referencia y objetivo
- Intervalos inter-ensayos
- Tiempo de castigo para respuestas erróneas
- Ventana de tiempo en que se evalúan las respuestas del animal

Estos parámetros fueron variando, dependiendo del rendimiento de los animales, para guiar el aprendizaje de éstos en el entrenamiento, de manera de llevarlos desde una tarea de baja dificultad hasta condiciones de mayor dificultad, que requieran un uso más intensivo de las capacidades cognitivas de las ratas en la tarea. Así, una tarea con una dificultad baja, tenía una menor variedad de posibles frecuencias centrales, bajo ancho de banda de nubes de tonos, separación espectral entre el sonido de referencia y objetivo mayor a 1 octava y 0% de solapamiento entre sí. Una tarea de mayor dificultad tenía una alta variedad de posibles frecuencias centrales, mayor ancho de banda de la nube de tonos y una menor separación entre el sonido de referencia y el objetivo (< 1 octava), posibilitando que incluso exista solapamiento en las frecuencias utilizadas en los sonidos de referencia y objetivo.

5.5 Obtención y análisis de datos (Psicofísica)

Los datos de comportamiento en la tarea fueron adquiridos mediante el uso de sensores capacitivos (módulo de sensor táctil TTP226), los cuales fueron modificados y conectados a cada boquilla de acero inoxidable mediante un cable, permitiendo registrar el tiempo de cada contacto de la lengua de los animales con las boquillas. Dichas señales fueron adquiridas mediante el dispositivo multifunción DAQ y almacenados en archivos de datos. Los registros adquiridos durante las sesiones de entrenamiento fueron también almacenados en una base de datos SQL (MariaDB 10.4.20) y en un servidor de almacenamiento de datos en computadores alojados en la Facultad. El análisis de los datos de comportamiento fue realizado en tiempo real y posterior a las sesiones experimentales usando *software* desarrollado en *Matlab*® (*Mathworks*).

El rendimiento de los animales en la tarea auditiva fue evaluado calculando diferentes valores, como el porcentaje de respuestas incorrectas, porcentaje de omisiones (ensayos en los cuales el animal no respondió después de un sonido objetivo), porcentaje de respuestas tempranas (respuestas durante la presentación del sonido de referencia, sin esperar a la presentación del sonido objetivo, una estimación de la impulsividad del animal en su acción motora) y el índice de discriminabilidad ($[\text{respuestas correctas} / (\text{respuestas correctas} + \text{respuestas incorrectas})] \times 100$, Delano et al., 2007), que representa el porcentaje de respuestas correctas entre los ensayos en que el animal fue presentado con los dos

estímulos y reportó una decisión. Por lo tanto, para analizar el progreso de los animales con el entrenamiento (es decir, el aprendizaje de la tarea), se analizaron estos índices (eje Y), con el número de sesión de entrenamiento (eje X).

Además, se analizó y comparó la latencia de las respuestas, definida como el tiempo desde la presentación del sonido objetivo y el primer contacto de la lengua con una boquilla. Se analizó y comparó la latencia de las respuestas correctas e incorrectas de cada rata por separado para analizar la diferencia entre ambas respuestas, y para esto, se utilizó la prueba de *t* de *Student* para muestras pareadas. Se utilizó, además, el coeficiente de variación para evaluar la dispersión de los datos. Para los análisis mencionados anteriormente se utilizaron 4 ratas y se realizaron 400 sesiones, en donde cada sesión tenía entre 200 – 320 ensayos aprox. Por otra parte, el índice de discriminabilidad fue contrastado para diferentes parámetros de estimulación y temporalidad para observar cuáles son los parámetros que determinan e impactan mayormente en el rendimiento de las ratas en la tarea conductual. Con los datos obtenidos de este análisis, se realizó un ajuste polinomial de curva de segundo o tercer grado con una herramienta de *Matlab*® llamada *Curve Fitting*, el cual además permitió calcular el coeficiente de determinación (R^2) para así evaluar de la influencia de los parámetros de la tarea en el índice de rendimiento de los animales. Para este análisis solo se utilizó una rata, la cual realizó 50 sesiones con 60 ensayos cada sesión aproximadamente (McDonald, 2014).

6.RESULTADOS

En la presente Memoria de Título, 4 ratas fueron entrenadas en la tarea 2-AFC, observándose que 3 ratas aprendieron a discriminar los sonidos presentados, analizando sus propiedades espectrales para reportar su decisión mediante una respuesta motora adecuada.

En este entrenamiento se realizaron, en general, entre 200-320 ensayos diariamente. Para conocer el detalle de la distribución de éstos, revisar el Anexo 5, donde se puede ver un gráfico que muestra el número de ensayos por día y el promedio general de ensayos durante todo el entrenamiento.

En general, las ratas fueron capaces de realizar la tarea con diferentes niveles de dificultad y altos niveles de rendimiento, y presentaron un buen estado de salud general durante el proceso, lo que sugiere que lograron consumir un adecuado volumen de agua durante las sesiones de entrenamiento (Anexo 6) y tuvieron un crecimiento adecuado a su especie (Anexo 7).

6.1 Rendimiento de las ratas

Durante el entrenamiento se pudo observar una mejora progresiva en el rendimiento de las ratas, de manera que, en un periodo de 3 meses y medio aproximadamente, que equivale a 56 sesiones de entrenamiento, alcanzaron grupalmente un 70% de respuestas correctas.

Es importante tener en consideración que, durante el primer mes de entrenamiento, en muchas ocasiones se guió a las ratas proveyéndoles de agua por la boquilla correcta cuando se les presentaba un sonido objetivo, con la finalidad de ayudar a las ratas a comprender las reglas de la tarea. Transcurrido este periodo, se les dejó de dar la ayuda, para evitar que esperaran la recompensa sin escuchar los sonidos. Además, se les realizaron repasos de entrenamiento, que consistieron en colocar solamente un posible sonido objetivo (mayor o menor frecuencia respecto al sonido de referencia), para que solamente tuvieran que tocar una boquilla (una opción), con la finalidad de que asociaran el sonido objetivo de mayor frecuencia con la boquilla derecha y el sonido objetivo de menor a la boquilla

izquierda y además para que adquirieran la temporalidad esperada en sus respuestas durante la tarea.

Para el análisis de las respuestas se excluyeron los datos obtenidos de sesiones en las que se realizó un repaso unilateral, es decir, solamente se analizaron aquellas sesiones en que el entrenamiento fue realizado con dos opciones presentadas aleatoriamente. Se incluyeron al análisis solamente las sesiones donde se realizaron más de 50 ensayos, de manera de excluir sesiones cortas donde se introdujo algún cambio en los parámetros o que fueron interrumpidas tempranamente para corregir algún problema.

En la Figura 9 se observa que las ratas fueron entrenadas durante 10 meses (160 sesiones), aunque algunas fueron entrenadas menos tiempo debido a que, al alcanzar niveles altos de rendimiento, algunas ratas se dejaban de entrenar para destinarlas a cirugía y pasar a la siguiente etapa del proyecto en que se enmarca esta Memoria de Título. En los gráficos, cada punto corresponde a una sesión de entrenamiento de una rata y cada rata está representada por un color, en este caso, *Brie* es rojo, *Cheddar* es verde, *Gouda* es amarillo y *Tofu* es azul. Además, la línea azul de cada gráfico corresponde a la tendencia grupal de las ratas (ajuste polinomial de curva, de segundo o tercer grado) y la línea punteada negra horizontal señala el 70% del índice de discriminabilidad, un rendimiento que se consideró suficientemente alto para esta tarea (Delano et al., 2007).

En la Figura 9A se logra apreciar como la tendencia grupal del Índice de Discriminabilidad aumenta a medida que incrementa el número de sesiones de entrenamiento, alcanzando grupalmente el 70% de las respuestas correctas en la sesión 56 (3,5 meses), lo que nos indica que las ratas efectivamente estaban aprendiendo a discriminar correctamente los sonidos de la tarea.

Los datos también sugieren que 1 rata de las 4 no logró aprender la tarea (*Tofu*), ya que su rendimiento variaba entre el 50 - 60% de respuestas correctas. Por otra parte, se aprecia una gran dispersión de los puntos, lo cual puede deberse a que en cada día de entrenamiento se fue aumentando la dificultad de la tarea a medida que se observaban rendimientos altos, es decir, en múltiples ocasiones se comenzaba con una baja variedad de

frecuencia y/o una gran separación de octavas entre el sonido de referencia y objetivo y, al observarse un rendimiento mayor en la tarea, se cambiaban los parámetros hacia una alta variedad de frecuencias y menor separación de octavas entre los sonidos de referencia y objetivo (Figura 9A).

Asimismo, al ir aumentando el índice de discriminabilidad, fue disminuyendo el porcentaje de respuestas incorrectas a medida que avanzaban los días de entrenamiento (Figura 9B). Junto con esto, las respuestas tempranas, es decir aquellas respuestas en las que las ratas contactaron una boquilla durante el sonido de referencia o antes del sonido objetivo, también fueron disminuyendo, ya que con el entrenamiento las ratas comenzaron a comprender las reglas de la tarea, aprendiendo que debían esperar la presentación de los dos sonidos (referencia y objetivo) para poder seleccionar una de las dos boquillas y así recibir la recompensa de agua (Figura 9C).

Junto con esto, y en consecuencia de lo anteriormente mencionado, las respuestas omitidas también fueron disminuyendo, lo que sugiere que las ratas, al comprender cada vez mejor la tarea y estar motivadas por la restricción de acceso al agua, prefieren contestar con mayor frecuencia.

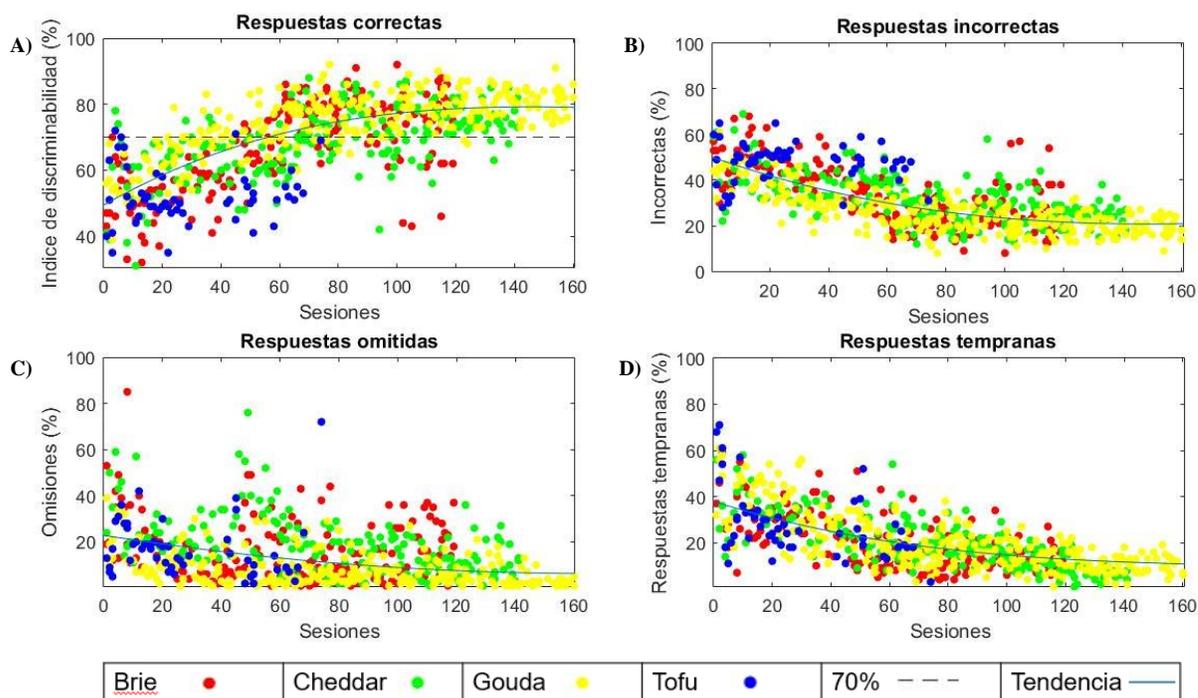


Figura 8: Rendimiento de las ratas en la tarea de discriminación auditiva 2-AFC durante un periodo de 10 meses. A) Respuestas correctas ($R^2=0,4718$). B) Respuestas incorrectas ($R^2=0,4715$). C) Respuestas omitidas ($R^2=0,1441$). D) Respuestas tempranas ($R^2=0,4877$). La tendencia graficada corresponde a un ajuste de curva polinomial de tercer (correctas, incorrectas) o segundo grado (omitidas, tempranas).

6.2 Latencias de las respuestas

Las decisiones perceptuales tomadas por las ratas pueden ser analizadas evaluando la preferencia por una boquilla (correcta o incorrectamente) tras la presentación de los sonidos experimentales, pero también examinando la temporalidad de las respuestas. Un parámetro que se puede analizar es la latencia de las respuestas, esto es, el período de tiempo entre la presentación de un estímulo hasta que la rata reporta su decisión.

Específicamente, se midió el tiempo, en segundos, entre el inicio de la presentación del sonido objetivo y el primer contacto de la rata con una boquilla en las respuestas correctas e incorrectas. Esta medición permite estimar la confianza de la rata en su decisión, por lo que al enfrentar una tarea difícil se deberían observar mayores latencias en las respuestas. De la misma manera, se esperaría observar latencias menores en las respuestas correctas, sugiriendo que las respuestas incorrectas fueron reportadas con una menor certeza.

Para el análisis, se realizaron gráficos de caja comparando las distribuciones de las latencias de las respuestas correctas e incorrectas de cada una de las ratas, lo que indicó que las latencias de las respuestas correctas fueron, en general, menores que las de las respuestas incorrectas (Figura 10).

Para determinar si las diferencias fueron significativas, primero se realizó la prueba de normalidad de *Lilliefors*, la cual permite saber si los datos provienen de una distribución normal, y elegir una prueba estadística paramétrica o no paramétrica. La prueba de *Lilliefors* se aplicó a todos los resultados obtenidos de la latencia de las respuestas correctas e incorrecta, dando como resultado que la hipótesis (h) era 0 ($p = 0,5$), es decir, aceptando la hipótesis nula de que los datos provienen de una distribución normal.

Posteriormente, se utilizó la prueba *t-Student* para los datos de latencia de cada rata individualmente, que fue calculado a través de *Matlab*®. Los resultados obtenidos se

muestran en la Tabla 1. En este caso, todas las ratas mostraron una diferencia significativa entre las latencias de las respuestas correctas e incorrectas (Prueba *t-Student*, $p < 0,05$). En otras palabras, las 4 ratas presentaron una latencia significativamente menor en sus respuestas correctas con respecto de las respuestas incorrectas, lo que sugiere que éstas tienden a responder con mayor seguridad cuando responden correctamente, y con mayor inseguridad en las respuestas incorrectas.

Para evaluar la dispersión de los datos de la latencia de las respuestas correctas e incorrectas se calculó el coeficiente de variación. Este se calcula dividiendo la desviación estándar con el valor absoluto de la media de la latencia de las respuestas:

$$CV = \frac{S_x}{|\bar{X}|}$$

CV: Coeficiente de variación
S_x: Desviación estándar de la latencia de las respuestas.
|\bar{X}|: Valor absoluto de la media de la latencia de las respuestas.

Para esto, se eliminaron algunos datos que estaban fuera de la ventana de respuesta de 3 segundos que se había definido anteriormente. El coeficiente de variación se calculó para cada rata por separado y dió como resultado que las ratas *Brie*, *Cheddar* y *Gouda* tuvieron una menor variación en la latencia de las respuestas correctas que la latencia de las respuestas incorrectas (entre 6-8% de diferencia), mientras que *Tofu*, la rata que no alcanzó rendimientos altos en la tarea, tuvo un mayor coeficiente de variación de la latencia de las respuestas correctas con respecto a la latencia de las respuestas incorrectas (Tabla 2). Estos resultados indican que 3 ratas presentaron una menor dispersión en la latencia de las respuestas correctas respecto a las respuestas incorrectas, lo que sugiere que, en general, las ratas responden con mayor precisión y certeza las respuestas correctas que las incorrectas. En cambio, *Tofu* obtuvo una mayor dispersión de las latencias de las respuestas correctas que de las incorrectas, y además presentó un coeficiente de variación entre 50-60%, lo que nos indica, que la temporalidad de sus respuestas fueron más heterogéneas que en las otras ratas. Estos resultados sugieren que esta rata no aprendió la tarea, demostrando mayor inseguridad en el reporte de sus decisiones.

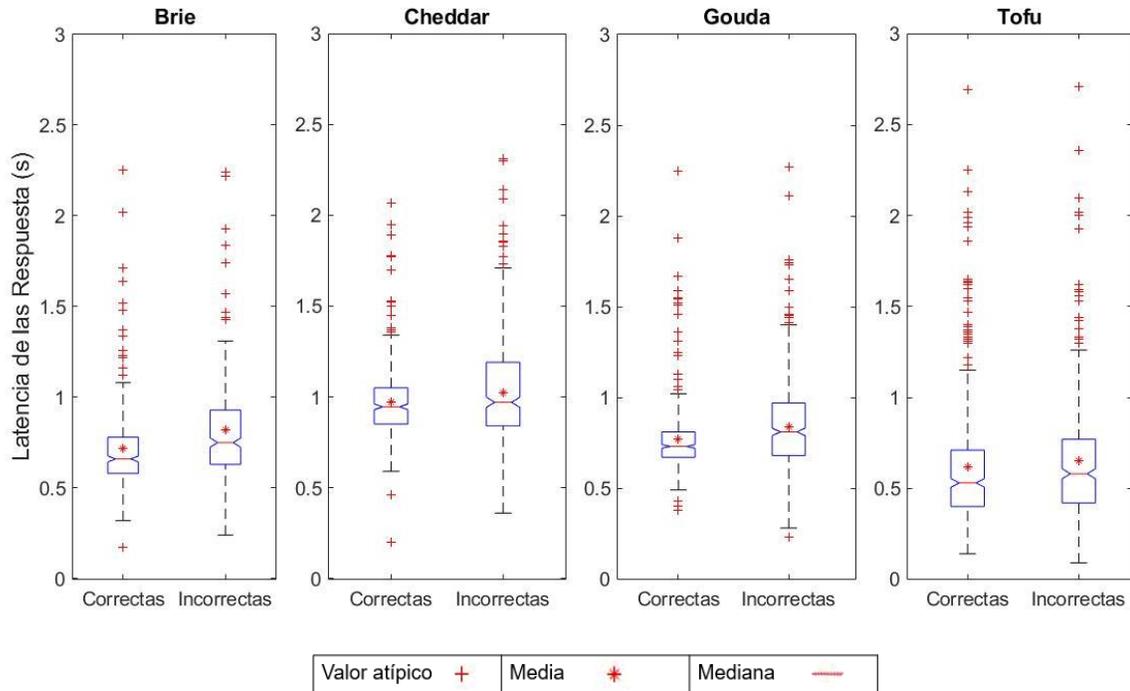


Figura 9: Comparación de las distribuciones de latencias de respuestas correctas e incorrectas para cada rata. Los gráficos muestran 2 cajas, una de la latencia de las respuestas correctas y otras de las incorrectas. Cada caja representa al 50% de los datos obtenidos de cada respuesta (correcta e incorrecta). Dentro de cada caja hay una línea roja que nos indica la mediana de las latencias. La muesca en cada caja corresponde al intervalo de confianza de un 95%. Esta muesca nos permite saber si las latencias de las respuestas correctas e incorrectas fueron significativamente diferentes entre sí, es decir, si las muescas no se solapan entre sí, el resultado es significativamente diferente, mientras que si están en el mismo rango de latencia el resultado no es significativamente diferente.

Tabla 1: Resultados de la prueba de *t-Student* de cada rata para evaluar la significancia de las diferencias entre las latencias de las respuestas correctas e incorrectas.

Rata	Brie	Cheddar	Gouda	Tofu
<i>t-Student</i>	h = 1 p = 1,59 x 10 ⁻⁷	h = 1 p = 0.0017	h = 1 p = 3.48 x 10 ⁻¹⁰	h = 1 p = 0.0187

Tabla 2: Resultados de la Mediana, Media, Desviación estándar y Coeficiente de variación de las latencias de las respuestas correctas e incorrectas de cada rata.

Ratas	Latencia de las respuestas	Mediana	Media	Desviación estándar	Coeficiente de variación
<i>Brie</i>	Correctas	0,66	0,71	0,23	33
	Incorrectas	0,75	0,81	0,30	38
<i>Cheddar</i>	Correctas	0,94	0,97	0,22	23
	Incorrectas	0,97	1,02	0,32	31
<i>Gouda</i>	Correctas	0,73	0,77	0,19	25
	Incorrectas	0,81	0,84	0,27	32
<i>Tofu</i>	Correctas	0,53	0,62	0,36	58
	Incorrectas	0,58	0,65	0,35	54

6.3 Influencia de los parámetros de la tarea en el rendimiento del animal

Se evaluaron 2 parámetros, uno de estimulación y otro de temporalidad, para ver la influencia que tenían con respecto al rendimiento de la rata. Estos parámetros solamente fueron evaluados con una rata (*Gouda*).

6.3.1 Separación de los sonidos objetivo con respecto al sonido de referencia:

Al considerar que la rata debe discriminar entre dos sonidos y decidir si el segundo sonido fue presentado con una menor o mayor frecuencia central respecto al primer sonido, se evaluó cómo la distancia espectral entre los sonidos de referencia y objetivo pueden influenciar el rendimiento del animal en la tarea de discriminación auditiva. Se hipotetizó que una mayor diferencia en las frecuencias utilizadas debería hacer más clara la diferencia entre los sonidos referencia y objetivo, facilitando la discriminación realizada por la rata. Este parámetro se modificó aumentando o disminuyendo las octavas de separación entre las frecuencias centrales de las “nubes de tonos” de referencia y objetivo (Figura 11).

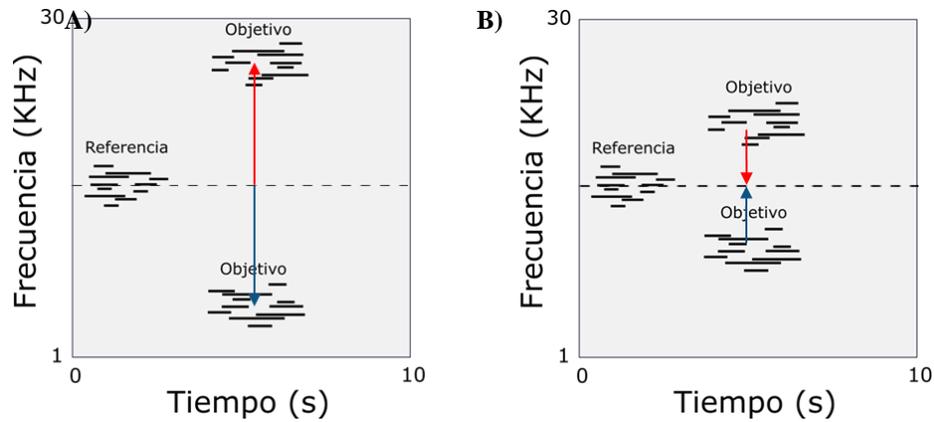
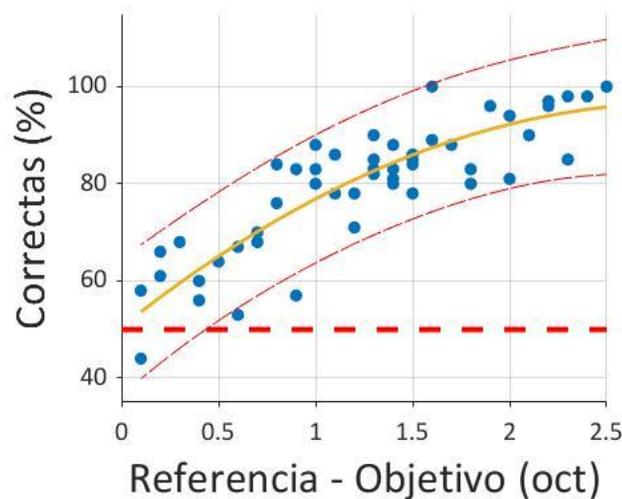


Figura 10: Representación gráfica de la modificación del parámetro de estimulación. A) Valor mayor de octavas de separación entre el sonido de referencia y objetivo. B) Menor valor de octavas de separación entre el sonido de referencia y objetivo.

La influencia de este parámetro de estimulación en el rendimiento de la rata se puede observar en la Figura 12. Los resultados indican que a menor valor de octavas de separación entre ambos sonidos, hay un menor porcentaje de respuestas correctas (peor rendimiento), debido a que los sonidos se hacen más similares en frecuencia, dificultando su comparación; mientras que al aumentar las octavas de separación, se ve un aumento del porcentaje de respuestas correctas (mejor rendimiento), debido a que los sonidos se hacen más diferentes en frecuencia, facilitando la discriminación realizada por la rata (Figura 12).



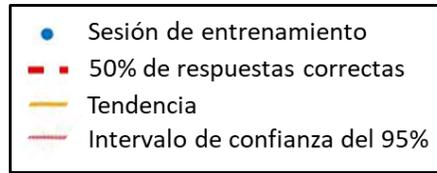


Figura 11: Influencia del parámetro de estimulación en el rendimiento en la tarea de una rata. En este gráfico, se compara el porcentaje de respuestas correctas (rendimiento del animal) v/s las octavas de separación entre el sonido de referencia y objetivo (dificultad de la tarea). Cada punto azul corresponde a una sesión de entrenamiento de 60 ensayos aprox. La línea punteada roja corresponde al 50% de respuestas correctas. La línea amarilla corresponde a la tendencia del conjunto de los puntos azules, la cual fue calculada mediante un ajuste polinomial cúbico. Las líneas burdeos corresponden al intervalo de confianza del 95% del ajuste, y muestran que aproximadamente el 78% de la variación observada en el porcentaje de respuestas correctas es explicada por el modelo ($R^2= 0,782$, $p = 6,51 \times 10^{-22}$).

6.3.2 Duración de los estímulos de la tarea:

Dada la naturaleza temporal de los sonidos, se puede asumir que la percepción auditiva es acumulativa. Las ratas, al realizar la tarea, deben analizar y almacenar en memoria de trabajo ambos sonidos, para luego compararlos y tomar una decisión. Por ello, se evaluó cómo la duración de los sonidos presentados en la tarea puede influenciar el rendimiento de la rata en la tarea 2-AFC. Así, se esperó ver que duraciones menores proveen de menos información y tiempo para realizar la comparación a los animales. Asimismo, duraciones muy prolongadas pueden resultar en una degradación de los objetos perceptuales auditivos almacenados en la memoria de trabajo, lo que puede afectar la comparación de estos sonidos que debe realizar el animal para reportar una decisión correcta.

Para realizar esta evaluación, se varió la duración de los sonidos referencia y objetivo, usando una misma duración para ambos sonidos (Figura 13).

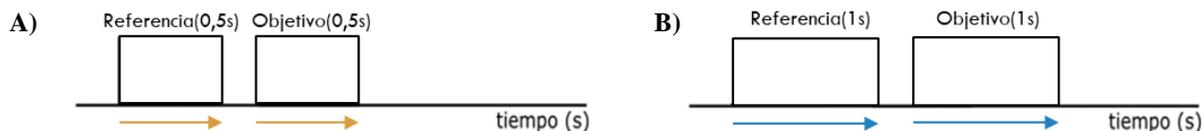


Figura 12: Representación gráfica de la duración de los estímulos (sonido de referencia y objetivo) en el tiempo. A) Menor duración de ambos sonidos B) Mayor duración de ambos sonidos.

Para evaluar la influencia del parámetro de temporalidad (duración de los estímulos) con el rendimiento de la rata, se utilizó una rata ya entrenada y que alcanzó altos niveles de rendimiento (*Gouda*). Durante su entrenamiento fue expuesta a diferentes duraciones y finalmente fue entrenada con estímulos de 0.5s, valor representado con una cruz roja (Figura 14). En la figura 14 se observa que, a medida que las duraciones se alejan de 0.5s, el rendimiento de la rata disminuyó, ya que, probablemente, los sonidos se hacen perceptualmente diferentes. Cuando la duración de los estímulos fue menor, los sonidos se hacen muy cortos y rápidos, por lo que la rata tuvo que procesar más rápido la información, concentrando su atención en un breve período de tiempo. Por el contrario, cuando la duración de los estímulos es mayor, los sonidos se hacen más largos y lentos, por lo que la rata tuvo, en principio, más tiempo para procesar la tarea, por lo que se esperaría que la tarea fuese más fácil de realizar. Sin embargo, como las ratas eran mantenidas en un régimen de privación de agua para mantenerlas motivadas, la rata presentó un comportamiento impaciente, por lo que intentó responder antes de escuchar los dos estímulos, sin recibir recompensa. Esto se suma a la posibilidad de que, al aumentar el tiempo de presentación, aumente también la dificultad de mantener la información de los sonidos en la memoria de trabajo necesaria para que el animal realice la comparación de los sonidos. Al no recibir la recompensa, además, la rata alteró su comportamiento, provocando que aumentara el número de respuestas incorrectas, afectando en el rendimiento de la tarea experimental.

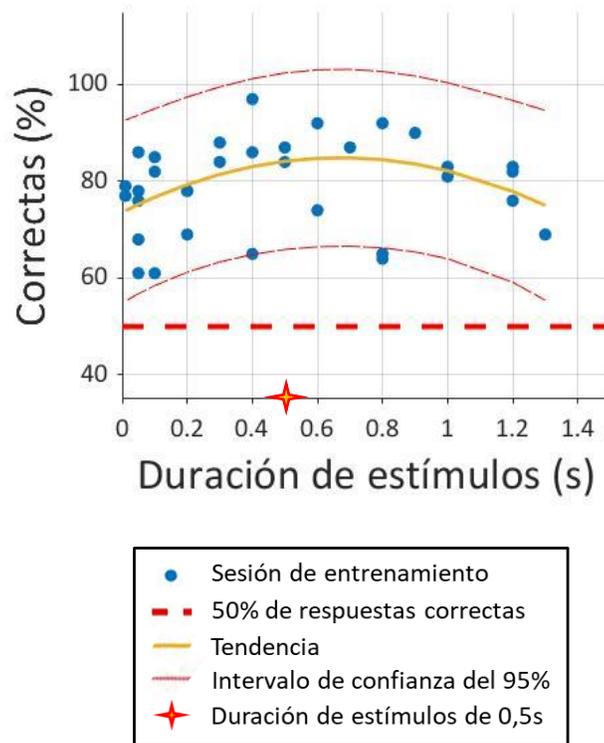


Figura 13: Influencia de la duración de los sonidos en el rendimiento en la tarea de una rata. Se compara el porcentaje de respuestas correctas (rendimiento del animal) con la duración de ambos estímulos (referencia y objetivo). Cada punto azul corresponde a una sesión de entrenamiento de 60 ensayos aprox. La línea punteada roja corresponde al 50% de respuestas correctas. La línea amarilla corresponde a la tendencia del conjunto de los puntos azules. Las líneas burdeos corresponden al intervalo de confianza del 95% y muestran un ajuste polinomial cúbico que indica que aproximadamente el 16% de la variación observada en el porcentaje de respuestas correctas es explicada por el modelo ($R^2= 0,162$, $p = 0,0419$). La cruz roja marca los 0,5s de duración de ambos estímulos.

7. DISCUSIÓN

En la presente Memoria de Título, se describe un procedimiento de adaptación y entrenamiento de las ratas en libertad de movimiento en una tarea auditiva 2-AFC. Para ello, primero los animales tuvieron que pasar por un proceso de habituación a la UMA, luego a los investigadores a cargo y finalmente al material de entrenamiento. Posterior a eso, las ratas fueron sometidas a restricción de agua con el objetivo de que estuvieran motivadas por la sed para realizar la tarea, ya que en el entrenamiento se les recompensaba con agua. Se procedió con el entrenamiento de discriminación auditiva, en donde fueron colocadas en la cámara de condicionamiento operante y se les expuso a estímulos acústicos (“nube de tonos”). Tuvieron que aprender a discriminar y comparar entre un sonido de referencia y un sonido objetivo. Si el sonido objetivo era de mayor frecuencia respecto al sonido de referencia, la rata debía responder realizando un contacto de la lengua con la boquilla ubicada al lado derecho, en cambio, si el sonido objetivo era menor frecuencia respecto al sonido de referencia, la rata debía responder realizando un contacto de la lengua con la boquilla ubicada al lado izquierdo. Las ratas pasaron por múltiples sesiones de entrenamiento de martes a viernes que duraron entre 40-60 min diarios por cada una.

7.1 Rendimiento de las ratas

Los resultados obtenidos demuestran que, pese a haber utilizado sonidos sintéticos en un contexto conductual que no es fácil de homologar a la vida silvestre, las ratas pudieron realizar esta tarea de discriminación auditiva, y que la metodología de entrenamiento utilizada fue exitosa, ya que de las 4 ratas que fueron entrenadas en esta tarea, 3 aprendieron la tarea, es decir, alcanzaron más del 70% de respuestas correctas en 4 meses de entrenamiento (Figura 10).

En este caso sólo una rata (*Tofu*), no logró a aprender esta tarea, teniendo un rendimiento que se encontraba entre un 50 y 60% de respuestas correctas y con baja dificultad (baja variedad de frecuencias y alta separación de octavas entre el sonido objetivo y de referencia). Una posibilidad que podría explicar este bajo rendimiento es que el animal haya tenido niveles de sensibilidad auditiva anormales. Al no contar con métodos

diagnósticos para realizar una evaluación auditiva, se recurrió a la evaluación de la respuesta de sobresalto auditivo, la que consistió en emitir sonidos de alta intensidad y de manera sorpresiva cerca de la rata y así provocar una contracción rápida de músculos esqueléticos y faciales. Al realizar esta evaluación de manera rutinaria se pudo observar que el animal que no aprendió la tarea (*Tofu*), presentó niveles menores a las otras ratas, presentando en ocasiones incluso ausencia de respuesta. Por ello, es probable que esta rata no haya podido percibir los sonidos de la tarea de manera óptima, acercando su rendimiento a uno explicado por las respuestas al azar (50% en el Índice de Discriminabilidad).

Se observó en los entrenamientos que las respuestas omitidas y las respuestas tempranas estaban muy relacionada con la sed del animal, ya que al principio de las sesiones estaban muy motivados con realizar la tarea y tendían a realizar un mayor porcentaje de respuestas tempranas y, a medida que se iban saciando, disminuía su motivación y aumentaba el porcentaje de respuestas omitidas. Según esto, es muy importante distribuir de una manera estratégica el volumen de agua a entregar a la rata, en cada recompensa, durante la sesión. Así, se observó que al comienzo de una sesión, un volumen bajo (30-50 uL) de agua facilita que la rata pueda realizar más ensayos durante la sesión y permite que no se desmotive antes de terminar el tiempo mínimo establecido para la sesión de entrenamiento. Este volumen se puede aumentar (50-100 uL) una vez que la motivación del animal empieza a disminuir. Además, es importante entregar una cantidad de agua necesaria diaria mínima (10-15 mL) a la rata, para que al otro día no tenga una sed desmedida que no le permita realizar correctamente la tarea, evitando además, la deshidratación y la desmotivación (Schwarz et al., 2010).

Por otro lado, en ocasiones se observó que las ratas presentaban un alto porcentaje de respuestas tempranas al inicio de la sesión de entrenamiento y que éstas no lograban realizar la tarea correctamente, ya que se frustraban al no conseguir recompensa rápidamente. Para estos casos, resultó útil ofrecerles entre 0,5 a 1 ml de agua antes de comenzar el entrenamiento, para así disminuir la ansiedad y las respuestas tempranas al inicio de la sesión. Esta medida logró efectivamente disminuir el problema, y se continuó aplicando durante el resto del entrenamiento para optimizar el tiempo y rendimiento de cada sesión.

7.2 Distribución de las latencias

El análisis de los datos adquiridos indica que las 4 ratas presentaron menores latencias en las respuestas correctas en relación con las latencias de las respuestas incorrectas. Esto sugiere que las ratas responden con una mayor seguridad y confianza cuando responden correctamente, pues la percepción de las dos categorías de sonidos es suficientemente diferente, y se ha acumulado suficiente información sobre la identidad de los sonidos que la rata debe discriminar. Así también, al no estar seguras de su decisión, las ratas demoran más en reportar sus decisiones, pues pueden haber dedicado menos recursos cognitivos al procesamiento y comparación de los sonidos y pueden haber acumulado una cantidad insuficiente de información para tomar su decisión. Dado que, en paralelo, los animales, al tener un acceso limitado al agua, evalúan además el riesgo de enfrentar un período de tiempo mayor sin poder obtener recompensa en caso de responder incorrectamente, se revela que la implementación de este tipo de tareas puede ser un aporte no solo para la investigación sobre los mecanismos neurales de la percepción auditiva y toma de decisiones, sino que también en estudios conductuales y neurofisiológicos sobre la evaluación del riesgo (Mohr *et al.*, 2010).

Otra posible razón por la cual la latencia de las respuestas incorrectas es mayor, es porque en ocasiones cercanas al final de una sesión de entrenamiento, las ratas presentaban periodos de distracción, como, por ejemplo, al acicalarse o explorar la jaula de entrenamiento, sin presentar mayor interés en realizar la tarea, pero al escuchar los sonidos, respondían aleatoriamente y de manera tardía, lo que muchas veces provocaba respuestas incorrectas. Esto también refleja que, en su evaluación del riesgo, y al ya tener relativamente cubiertas sus necesidades de consumo de agua, las ratas comenzaban a arriesgar respuestas sin dedicar el esfuerzo cognitivo necesario para mostrar un rendimiento alto en la tarea.

Por otra parte, en 3 de 4 ratas se observó que las latencias de las respuestas correctas tenían una menor dispersión comparado con la latencia de las respuestas incorrectas, lo que se puede observar en el gráfico de la figura 10 y Tabla 1. Esta menor dispersión de la latencia de las respuestas correctas nos indica que responden con una mayor precisión

temporal, lo que nos da un indicio de cuál sería el tiempo mínimo promedio de respuesta, cuando la rata procesa la información y toma su decisión, al conocer la respuesta correcta. En cambio, la mayor dispersión de la latencia de las respuestas incorrectas se debe a, como se describió anteriormente, respuestas tardías que pueden reflejar inseguridad, o poca atención e interés al momento de tomar una decisión, como también a respuestas tempranas más impulsivas y aleatorias que, normalmente, se observaban en animales más sedientos y al comienzo de las sesiones de entrenamiento, generando, por lo tanto, diferentes tiempos de respuestas incorrectas.

Por lo tanto, estos resultados no solamente nos muestran que las ratas aprendieron a responder a ciertos estímulos, sino que también hay una diferencia significativa en el tiempo de las respuestas correctas e incorrectas y lo que nos da un indicio de que existe un procesamiento neuronal diferente con respecto a la toma de decisiones, atención y a la audición, al momento de responder correcta o incorrectamente.

7.3 Influencia de los parámetros en el rendimiento del animal

Se encontró que algunos parámetros influyen el rendimiento de la rata en la tarea experimental. El más significativo fue el de octavas de separación entre el sonido de referencia y el sonido objetivo, en donde se puede observar una clara influencia en el rendimiento. Por ejemplo, cuando había una menor separación espectral entre ambos estímulos, el rendimiento era entre un 50 - 70% de respuestas correctas, ya que, al hacerse más similares los componentes de frecuencia de los sonidos referencia y objetivo, la decisión que debía tomar el animal requería de mayor procesamiento cognitivo. Así también, cuando la separación entre ambos estímulos era mayor, el rendimiento de los animales en la tarea era entre un 80 -100% de respuestas correctas, lo que refleja un excelente rendimiento. Esto nos muestra que a la hora de que la rata tomaba la decisión, se le hizo más fácil cuando los sonidos fueron más diferentes en frecuencia (Figura 12), lo que podría deberse a que existe una mayor separación (y menor solapamiento) entre las poblaciones neurales involucradas en el procesamiento de los sonidos que el animal debe comparar (Polley *et al.*, 2006).

Por otro lado, en la influencia del parámetro de la duración de los estímulos en el rendimiento de la rata, se observó que cuando se aumentaba o disminuía la duración de los sonidos, disminuyó el rendimiento de la rata con respecto a la duración con la que ésta había sido entrenada (0,5 s, ambos estímulos). Probablemente, al variar la duración de los sonidos, la percepción de éstos cambia. Cuando la duración era menor en ambos estímulos, la rata debía procesar e integrar más rápido la información, es decir tenía un menor tiempo para procesar la información y tomar una decisión. Por el contrario, cuando la duración del sonido era mayor, si bien la rata tenía más tiempo para procesar la información, las mayores duraciones y el ímpetu de la rata por recibir agua lo antes posible, la llevaba a responder de manera impulsiva. A pesar de lo mencionado anteriormente, este parámetro se debería estudiar en más animales de manera sistemática, y tal vez desde el comienzo del entrenamiento, ya que la estadística de los resultados de este parámetro muestra que solamente el 16% de la variación observada en el porcentaje de respuestas correctas es explicada por el modelo ($R^2= 0,162$) (Figura 14).

Con la información recopilada de estos resultados, se recomienda que, para lograr un entrenamiento óptimo, se consideren los siguientes aspectos:

En primer lugar, cuando se comienza el entrenamiento, es decir, cuando las ratas no conocen la tarea, se debe iniciar con una tarea de baja dificultad para facilitarles el aprendizaje. Una tarea de baja dificultad consistiría en una baja variedad de frecuencias centrales para la generación de las nubes de tonos y un número alto de octavas de separación entre el sonido de referencia y objetivo. A medida que el animal va aprendiendo, se puede aumentar progresivamente la dificultad de la tarea. Una tarea de mayor dificultad consistiría en una mayor variedad de frecuencias centrales y un número bajo de octavas de separación entre el sonido de referencia y objetivo, lo que llevaría a que exista solapamiento en las frecuencias utilizadas para las nubes de tonos de referencia y objetivo. Así, la variación progresiva en los parámetros de estimulación llevaría a que los animales aprendan las reglas de la tarea, generalizando para diversos parámetros temporales y espectrales.

El aumento de la dificultad de la tarea, llevando a que el animal utilice cada vez más recursos cognitivos para realizarla, tiene como objetivo el poder reclutar un mayor número

de neuronas que codifiquen aspectos de esta tarea de discriminación auditiva y toma de decisión. Es por esto que, durante el entrenamiento, se fueron añadiendo diferentes rangos de frecuencias además de los que la rata ya conocía; a pesar de que esto aumentaría la dificultad de la tarea, permitiría que los animales aprendieran las reglas de la tarea sin aprender las frecuencias de memoria, posibilitando que se pudieran realizar registros neurofisiológicos en regiones de la corteza auditiva con diferentes sensibilidades en el dominio de las frecuencias en las siguientes etapas de la investigación en la que se enmarca esta Memoria de Título.

Una de las limitaciones que tuvieron los resultados de la influencia de los parámetros en el rendimiento de los animales fue que sólo se utilizó 1 rata, lo que es un número muy bajo de sujetos experimentales para que el resultado sea totalmente representativo. Por lo que sería interesante que en otras investigaciones se realice un análisis de la influencia de los parámetros en el rendimiento del animal con una mayor cantidad de ratas y, además, evaluar otros parámetros que no fueron evaluados.

7.4 Calidad y Validez de los resultados

La tecnología y equipamiento utilizados para este experimento fueron especialmente diseñado para los fines del proyecto científico en el que se enmarca esta Memoria de Título, por lo que se contó con un amplio control en la estimulación y en la obtención de datos conductuales, favoreciendo también el análisis de los datos.

En este caso, el experimento se realizó en condiciones altamente controladas para que la rata realizara la tarea en un espacio de confianza y sin distracciones externas. Entre las medidas que se tomaron están, entre otras, la utilización de una cabina acústica para aislar los sonidos externos no controlados, la presentación de los estímulos con un altavoz de alta frecuencia para abarcar todo el rango de sensibilidad auditiva de las ratas, la calibración previa de los niveles de presión de sonido, el uso de una jaula de condicionamiento operante que opone una mínima oclusión a los sonidos experimentales, y el hecho de que las ratas siempre realizaron la tarea con ciclo diurno invertido, a la misma

hora y en condiciones de oscuridad, debido a que estos son animales nocturnos y tienen una mayor actividad durante la noche.

Cabe mencionar además que el equipamiento utilizado es de bajo costo, fácil implementación y de código libre, por lo que constituye en su conjunto una alternativa viable, económica y de un alto nivel de control experimental cuando se compara con soluciones comerciales que existen para la investigación en conducta animal y neurociencia.

Por otro lado, se utilizó un *software* específico para esta tarea de discriminación auditiva de dos alternativas, desarrollado en *Matlab*®, y los registros fueron almacenados en una base de datos SQL (MariaDB versión 10.4.20), lo que permitió analizar esta información del entrenamiento en tiempo real y de manera posterior a las sesiones experimentales de cada rata. Esto permitió el realizar un análisis eficiente gracias a la automatización de la recopilación de los datos entregados por el programa, en donde se puede destacar además, la precisión de la información recopilada, que se agrupaban en respuestas correctas, incorrectas, omitidas y tempranas, extrayendo también, la latencia de cada una de éstas. Además, el programa mostraba en la computadora, un gráfico (en tiempo real), con los porcentajes de cada respuesta y, posterior a las sesiones, se mostraba una tabla con un resumen de los datos mencionados anteriormente para cada una de las sesiones.

Los registros mencionados anteriormente se analizaron de manera grupal, mediante programas desarrollados en *Matlab*®, obteniendo como resultado todos los gráficos mostrados en esta memoria. Los datos de los resultados del rendimiento de las ratas fueron filtrados, eliminando, en primer lugar, las sesiones que tenían un número bajo de ensayos (<50), ya que no eran representativas y muchas veces las sesiones cortas fueron terminadas prematuramente para corregir algún parámetro o porque el animal no tenía la motivación suficiente para realizar la tarea. En segundo lugar, se eliminaron las sesiones de repasos unilaterales, es decir, cuando se les colocaba sólo una de las posibles opciones del sonido objetivo, como por ejemplo, cuando sólo se les colocaba sonidos de mayor frecuencia respecto al sonido de referencia para que respondieran siempre al lado derecho o viceversa. Este tipo de sesiones se utilizó para reforzar el aprendizaje o para corregir ocasiones en que las ratas sólo preferían responder a un lado.

Fue importante realizar esta filtración de datos, ya que así se obtendrían resultados fidedignos y que no se vieran afectados por sesiones incompletas, en donde, por ejemplo, con solo 10 ensayos en una sesión podría tener 100% de respuestas correctas, lo que no es representativo para decir que el animal sabía la tarea.

7.5 Proceso cognitivo

Aunque los resultados vistos anteriormente no muestran explícitamente los procesos neurales que ocurre en el cerebro de la rata, dan cuenta de que existe un proceso cognitivo tanto de aprendizaje, memoria, toma de decisión y atención, con relación a la audición. Lo que da a entender, que existe una relación y comunicación entre la corteza auditiva y otras áreas del sistema nervioso encargadas de estas funciones cognitivas (Fritz *et al.*, 2010; Elgueda *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos de esta tarea de discriminación auditiva 2-AFC son una referencia y una herramienta para las investigaciones relacionadas con los procesos neurales que subyacen la percepción auditiva y la toma de decisiones, ya que aportarán un mayor conocimiento para lograr un entrenamiento óptimo en este tipo de tareas experimentales y que les permitirá comprender cómo las decisiones que toma un animal van influenciando las etapas del procesamiento neural de los sonidos, realizando un análisis de la función neural mientras los animales realizan esta tarea conductual.

8.CONCLUSIÓN

En la presente Memoria de Título se describió un procedimiento de entrenamiento de una tarea auditiva 2-AFC en ratas, en el cual se evaluó la toma de decisiones basada en información auditiva. En esta, se obtuvieron datos del entrenamiento en libertad de movimiento durante todo el periodo experimental. A continuación, se muestran las conclusiones obtenidas de esta Memoria de Título:

- La mayoría de las ratas lograron aprender este tipo de tareas (2-AFC), con una alta dificultad (gran variedad de frecuencias entre 1-50khz y una separación <1 octavas entre el sonido de referencia y objetivo), ya que 3 de las 4 ratas obtuvieron un porcentaje mayor del 70% de respuestas correctas en un periodo de 4 meses de entrenamiento.
- Se observó que las latencias de las respuestas de cada rata variaban para las respuestas correctas e incorrectas; generalmente las respuestas correctas fueron reportadas en un menor tiempo (lo que refleja una mayor seguridad en la decisión tomada por el animal) y menor dispersión de las latencias de las respuestas correctas (una mayor precisión), con respecto a las respuestas incorrectas.
- Se encontró que algunos parámetros de estimulación y temporalidad pueden influir en el rendimiento de la rata, como, por ejemplo, las octavas de separación entre el sonido de referencia y objetivo, dado que a menos octavas de separación entre ambos estímulos el rendimiento del animal disminuía y a mayor separación, su rendimiento aumentaba. Por lo tanto, es importante tener en consideración este parámetro para poder entrenar de forma eficiente a las ratas. Por otra parte, la estadística del parámetro de la duración del sonido de referencia y objetivo, no fue lo suficientemente representativa para concluir lo que muestra la curva del resultado de este parámetro. A pesar de eso este resultado sugiere que ante duraciones bajas y altas el rendimiento empeoraba, habiendo un punto medio cercano óptimo.
- Esta Memoria de Título, quedará como referencia para investigaciones que realicen experimentos conductuales con ratas, específicamente, en tareas de discriminación

auditiva 2-AFC, para el estudio de procesos cognitivos como la toma de decisiones, memoria y atención.

Finalmente, se puede decir que esta Memoria de Título entrega las bases para, más adelante, registrar las respuestas neurofisiológicas de las áreas cerebrales involucradas en los procesos cognitivos utilizados por la rata al realizar la tarea, para así contribuir en el conocimiento específico de la relación entre la corteza auditiva y otras áreas cerebrales de asociación, pudiendo con esto avanzar en el conocimiento científico básico y traslacional, que puede ser potencialmente aplicado para mejorar importantes aspectos tanto en la salud animal, como humana.

9. BIBLIOGRAFÍA

Atiani, S., David, S. V., Elgueda, D., Locastro, M., Radtke-Schuller, S., Shamma, S. A., & Fritz, J. B. (2014). Emergent selectivity for task-relevant stimuli in higher-order auditory cortex. *Neuron*, 82(2), 486-499.

Bagur, S., Averseng, M., Elgueda, D., David, S., Fritz, J., Yin, P., Shamma, S., Boubenec, Y., & Ostojic, S. (2018). Go/No-Go task engagement enhances population representation of target stimuli in primary auditory cortex. *Nature Communications*, 9(1), 2529.

Biacabe, B., Bonfils, P., Mom, T., & Avan, P. (2000). Anatomía funcional de las vías auditivas. *EMC-Otorrinolaringología*, 29(1), 1-9.

Bizley, J. K., & Cohen, Y. E. (2013). The what, where and how of auditory-object perception. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(10), 693-707.

Bjerre, A. S., & Palmer, L. M. (2020). Probing cortical activity during head-fixed behavior. *Frontiers in molecular neuroscience*, 13, 30.

Blatrix, S. (2016). Esquema de la vía auditiva que permite identificar la localización anatómica de las diferentes ondas de los PEA [Imagen]. Viaje al mundo de la audición. <https://www.cochlea.eu/es/exploracion-funcional/metodos-objetivos/vias-auditivas-y-centros>

Brower, M., Grace, M., Kotz, C. M., & Koya, V. (2015). Comparative analysis of growth characteristics of Sprague Dawley rats obtained from different sources. *Laboratory animal research*, 31, 166-173.

Budelsky, C. L., Crisler, R., Johnston, N. A., & Sivula, C. (2020). Functional Anatomy and Physiology. In P. L. Foley, F. C. Hankenson, M. A. Suckow y R. P. Wilson (Eds.), *The Laboratory Rat* (3rd ed., pp. 91-132). Academic Press.

Carandini, M., & Churchland, A. K. (2013). Probing perceptual decisions in rodents. *Nature neuroscience*, 16(7), 824-831.

- David, S. V., Fritz, J. B., & Shamma, S. A. (2012). Task reward structure shapes rapid receptive field plasticity in auditory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(6), 2144-2149.
- Delano, P. H., Elgueda, D., Hamame, C. M., & Robles, L. (2007). Selective attention to visual stimuli reduces cochlear sensitivity in chinchillas. *Journal of Neuroscience*, *27*(15), 4146-4153.
- Elgueda, D., & Delano, P. H. (2020). Corticofugal modulation of audition. *Current Opinion in Physiology*, *18*, 73-78.
- Elgueda, D., Duque, D., Radtke-Schuller, S., Yin, P., David, S. V., Shamma, S. A., & Fritz, J. B. (2019). State-dependent encoding of sound and behavioral meaning in a tertiary region of the ferret auditory cortex. *Nature neuroscience*, *22*(3), 447-459.
- Fritz, J. B., David, S. V., Radtke-Schuller, S., Yin, P., & Shamma, S. A. (2010). Adaptive, behaviorally gated, persistent encoding of task-relevant auditory information in ferret frontal cortex. *Nature neuroscience*, *13*(8), 1011-1019.
- Fritz, J., Shamma, S., Elhilali, M., & Klein, D. (2003). Rapid task-related plasticity of spectrotemporal receptive fields in primary auditory cortex. *Nature neuroscience*, *6*(11), 1216-1223.
- Gronskaya, E. (2017). *Sound Processing in the Auditory Cortex of Rats During Sensory Decision-Making* (Doctoral dissertation, ETH Zurich).
- Gronskaya, E., & von der Behrens, W. (2019). Evoked response strength in primary auditory cortex predicts performance in a spectro-spatial discrimination task in rats. *Journal of Neuroscience*, *39*(31), 6108-6121.
- Guo, Z. V., Hires, S. A., Li, N., O'Connor, D. H., Komiyama, T., Ophir, E., Huber, D., Bonardi, C., Morandell, K., Gutnisky, D.; Peron, S., Xu, N. L., Cox, J., & Svoboda, K. (2014). Procedures for behavioral experiments in head-fixed mice. *PloS one*, *9*(2), e88678.
- Hackett, T. A. (2011). Information flow in the auditory cortical network. *Hearing research*, *271*(1-2), 133-146.

- Heffner, H. E., & Heffner, R. S. (1995). Conditioned Avoidance. En G. M. Klump, R. J. Dooling, R. Fay y W. C. Stebbins (Eds.), *Methods in Comparative Psychoacoustics* (pp. 79-93). Springer Basel AG.
- Jaramillo, S., Borges, K., & Zador, A. M. (2014). Auditory thalamus and auditory cortex are equally modulated by context during flexible categorization of sounds. *Journal of Neuroscience*, *34*(15), 5291-5301.
- Jaramillo, S., & Zador, A. (2010). Auditory cortex mediates the perceptual effects of acoustic temporal expectation. *Nature Precedings*, *14*(2), 246-251.
- Jaramillo, S., & Zador, A. M. (2014). Mice and rats achieve similar levels of performance in an adaptive decision-making task. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *8*, 173.
- McDonald, J.H. 2014. Handbook of Biological Statistics (3rd ed., pp. 180-185). Sparky House.
- Mohr, P. N., Biele, G., & Heekeren, H. R. (2010). Neural processing of risk. *Journal of Neuroscience*, *30*(19), 6613-6619.
- Morton, D. B., & Griffiths, P. H. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Veterinary Record*, *116*(16), 431-6.
- National Research Council. (2011). Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (8.^a ed.). Ediciones UC.
- Polley, D. B., Steinberg, E. E., & Merzenich, M. M. (2006). Perceptual learning directs auditory cortical map reorganization through top-down influences. *Journal of neuroscience*, *26*(18), 4970-4982.
- Schwarz, C., Hentschke, H., Butovas, S., Haiss, F., Stüttgen, M. C., Gerdjikov, T. V., Bergner, C. G., & Waiblinger, C. (2010). The head-fixed behaving rat—procedures and pitfalls. *Somatosensory & Motor Research*, *27*(4), 131-148.
- Shamma, S. A., Elhilali, M., & Micheyl, C. (2011). Temporal coherence and attention in auditory scene analysis. *Trends in neurosciences*, *34*(3), 114-123.

Slee, S. J., & David, S. V. (2015). Rapid task-related plasticity of spectrotemporal receptive fields in the auditory midbrain. *Journal of Neuroscience*, 35(38), 13090-13102.

Tsunada, J., Liu, A. S., Gold, J. I., & Cohen, Y. E. (2016). Causal contribution of primate auditory cortex to auditory perceptual decision-making. *Nature neuroscience*, 19(1), 135-142.

Znamenskiy, P., & Zador, A. M. (2013). Corticostriatal neurons in auditory cortex drive decisions during auditory discrimination. *Nature*, 497(7450), 482-485.

10.ANEXO

10.1 Anexo 1: Protocolo de supervisión para roedores de laboratorio.

PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN PARA ROEDORES DE LABORATORIO		
Variable	Rangos	Puntuación
Pérdida de peso (de 0 a3)	• Normal (no hay pérdida de peso o el animal crece normalmente).	0
	• Pérdida de peso inferior al 10%.	1
	• Pérdida de peso entre el 10% y 20%. Posible alteración en el aspecto o cantidad de heces.	2
	• Pérdida de peso superior al 20%, el animal no consume agua ni alimento.	3
Aspecto (de 0 a3)	• Normal.	0
	• Pelo en mal estado.	1
	• Pelo en mal estado y/o presencia de secreciones oculares o nasales.	2
	• Postura anormal.	3
Comportamiento espontáneo (de 0 a3)	• Normal.	0
	• Pequeños cambios.	1
	• Inactividad	2
	• Automutilación, vocalización anormales, animales muy inquieto o inmóviles.	3
Comportamiento en respuesta a manipulación (de 0 a3)	• Normal.	0
	• Pequeños cambios.	1
	• Cambios moderados	2
	• Animales agresivo o comatoso	3
Puntuación Total		

* **Nota: cuando un animal obtiene una puntuación de 3 en más de un parámetro todas las 3 pasan a 4.**

- Las medidas correctoras sugeridas en función de la puntuación obtenida para cada animal son las siguientes:
- **Puntuación:**
 - Desde 0-4: Normal
 - Desde 5-8: Supervisar cuidadosamente considerar el uso de analgésicos
 - Desde 9-13: Sufrimiento intenso: administrar analgésicos (¿eutanasia?)
 - Desde 14-16 Eutanasia

10.2 Anexo 2: Planilla de evaluación de salud, adaptada de Morton y Griffiths (1985).

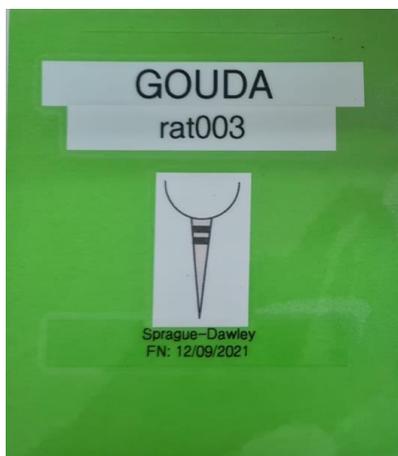
Fecha	N° Jaula	ID rata	Peso basal (g)	Peso actual (g)	Pérdida de Peso (0 a 3)	Aspecto (0 a 3)	Comportamiento Espontáneo (0 a 3)	Manipulación (0 a 3)	Observaciones	T° sala	H %

10.3 Anexo 3: Días de la semana con restricción de agua.

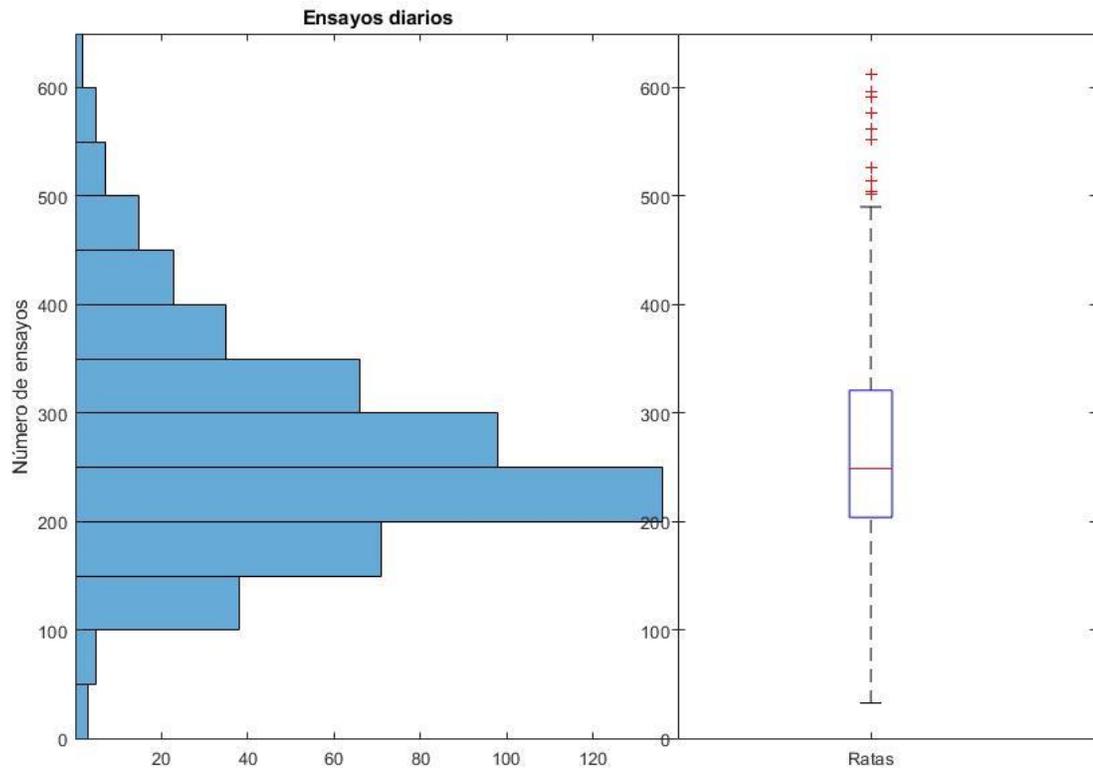
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
AM							
PM							

> Con agua
 > Sin agua

10.4 Anexo 4: Tarjeta de identificación de cada rata.

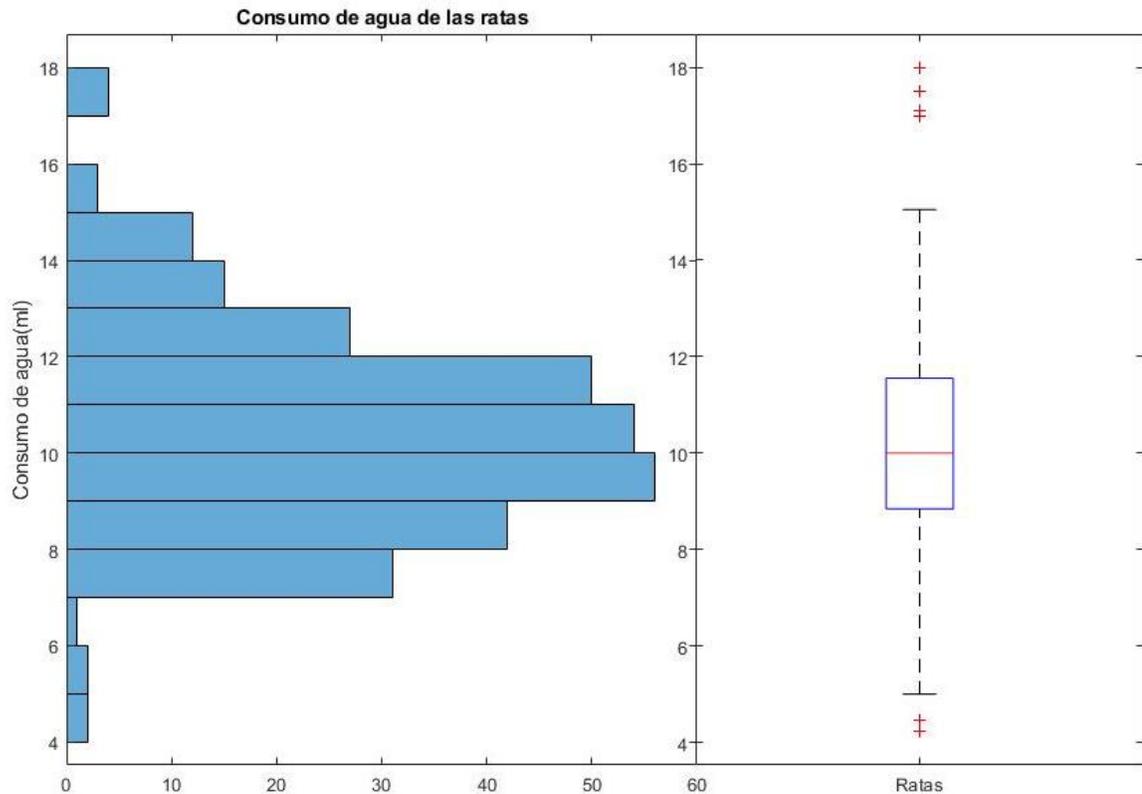


10.5 Anexo 5: Grafico de la cantidad de ensayos por día.



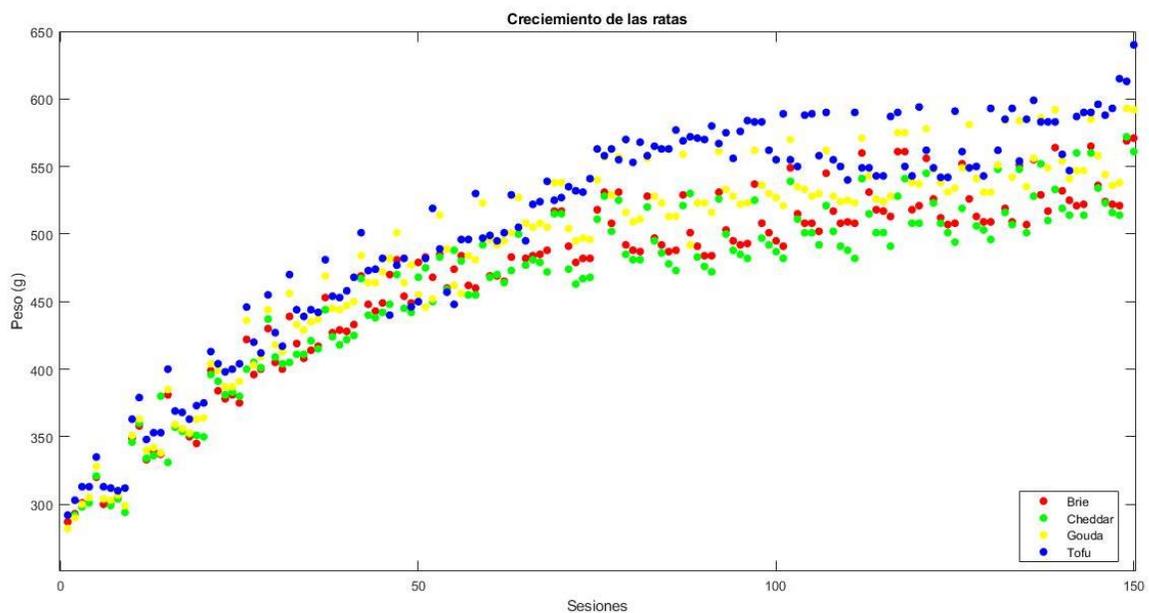
Cantidad de ensayos diarios de todas las ratas. En esta imagen se ve un histograma y un gráfico de caja que muestran la mayor proporción de ensayos realizados diariamente. Con una mediana de 249 ensayos, representados en la línea roja del gráfico de caja. El 50 % de los datos, está representado por la caja, con un mínimo de 204 y un máximo de 321 ensayos.

10.6 Anexo 6: Grafico del consumo del agua por día.



El consumo de agua diariamente de todas las ratas. En esta imagen se ve un histograma y un gráfico de caja que muestran la mayor proporción del consumo del agua en ml realizados diariamente. Con una mediana de 10ml, representados en la línea roja del gráfico de caja. El 50 % de los datos, está representado por la caja, con un mínimo de 8,8 ml y un máximo de 11,5ml de agua consumida diariamente por las ratas.

10.7 Anexo 7: Crecimiento de las ratas.



Crecimiento de las ratas durante 7,5 meses. En este gráfico cada punto corresponde a un peso de una rata y cada color corresponde a una rata en específico. *Brie* es rojo, *Cheddar* es verde, *Gouda* es amarillo y *Tofu* es azul. Las ratas fueron pesadas 5 veces a la semana de lunes a viernes. En el gráfico se puede ver unos puntos más arriba que otros, que corresponde a los días lunes, ya que son los primeros días de registro de peso durante la semana y las ratas estaban más hidratadas debido al consumo de agua *ad libitum* del fin de semana, por lo tanto, pesaban más comparado con los otros días de la semana. Además, se observa que al cuarto mes (sesión 80) lograron alcanzar un peso estable entre 500-580 g.