



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura En Biomedicina

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neurofisiología Integrativa

**“Desarrollo y montaje de un sistema de discriminación auditiva en
el ratón en libre movimiento”**

Para obtener el grado de Licenciado en Biomedicina

Presenta:

Héctor Halin Carbajal Guevara

Director de tesis:

Dr. Elias Manjarrez López

Noviembre 2020

Agradecimientos	I
Dedicatoria	II
Abreviaturas	III
Resumen	IV
1. Antecedentes generales	1
1.1. Conductismo	1
1.1.2. Aprendizaje asociativo	2
1.1.2.1 Teoría del aprendizaje asociativo	4
1.1.3. Condicionamiento clásico	5
1.1.3.1. Fenómenos excitatorios básicos	6
1.1.3.2. Fenómenos inhibitorios básicos	8
1.1.4. Condicionamiento operante	9
1.1.4.1. Procedimientos del condicionamiento operante	13
1.1.4.2. El método experimental del condicionamiento operante	14
1.1.4.3. Técnicas modificadas del condicionamiento operante	18
1.1.4.4. Adquisición de la respuesta condicionada bajo un entrenamiento de recompensa	18
1.1.4.5 Programas de reforzamiento	19
1.1.5. Centro de la recompensa cerebral	21
1.1.6. Vía auditiva del ratón	24
1.2. Antecedentes específicos	27
1.2.1. MATLAB	27

1.2.1.1. Psychtoolbox	28
1.2.2. ARDUINO	30
1.2.1.2. ARDUINO -UNO	32
1.2.2.1. MATLAB- ARDUINO	33
2. Justificación	34
3. Planteamiento del problema	36
5. Objetivos	38
5.1. Objetivo general	38
5.2. Objetivos específicos	38
6. Materiales y métodos	39
6.1. Ubicación espacio-temporal	39
6.2. Estrategia de trabajo	40
6.3. Tipo de estudio	41
6.3.2. Selección de la muestra	41
6.4. Criterios de selección de las unidades de muestreo	42
6.4.1. Criterios de inclusión	42
6.4.2. Criterios de exclusión	42
6.4.4. Tamaño de la muestra	42
6.5. Técnicas y procedimientos	42
6.5.1. Fase de entrenamiento general	42
6.6. Estandarización de los programas computacionales y estímulos auditivos	44

6.7. Prueba conductual	44
6.4.2. Prueba conductual discriminación de tonos puros	45
7. Análisis de datos	46
7.1. Diseño estadístico	47
7.2. Hipótesis estadística	48
8. Logística	48
8.1. Recursos humanos	49
8.2. Recursos materiales	49
8.3. Recursos financieros	50
9. Resultados	51
9.1 Hardware	51
9.2 Software	56
9.2.1 Tarea de discriminación auditiva. Tonos puros	56
9.2.2 Programación del software de entrenamiento	62
9.2.2.1 Código de la Fase 1	62
9.2.2.2 Código de la Fase 2	64
9.2.2.3 Código de la Fase 3	66
9.2.2.4 Código de la Fase 4	66
9.2.3 Software de análisis de datos	68
9.3 Aprendizaje	70
10. Discusión	81

11. Conclusión	84
12. Bioética	84
12.1. Aclaraciones bioéticas	84
13. Anexos	85
13.1 Tabla de evaluación de privación de agua	85
13.2 Diagrama de flujo de evaluación de salud de los sujetos de experimentación	86
13.3 Tarea de discriminación auditiva .Tonos puros y ruido	Error!
Bookmark not defined.	
12. Bibliografía	87

Without supernatural assistance, our fellow creatures can tell us the most beautiful stories, and that means *true* stories, because the truth about nature is always far more beautiful even than what our great poets sing of it, and they are the only real magicians that exist.

-Konrad Lorenz

Agradecimientos

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y al Instituto de Fisiología, sus académicos, administrativos y todo el personal, por haberme permitido realizar mis estudios universitarios y la realización de mi proyecto de tesis.

Al Doctor Elias Manjarrez por permitirme realizar la presente tesis en su laboratorio, por ser un excelente guía y maestro, así como por cada una de las enseñanzas brindadas, por la atención y su constante apoyo.

A mi comité de revisores, la Doctora Amira Flores y el Doctor Celso Cortés, por su gran apoyo y orientación, por sus comentarios, aportaciones y revisiones durante la realización de ésta tesis.

Al Dr. Fatuel Tecuapetla por las enseñanzas brindadas y por su paciencia durante mi estancia en su laboratorio, por todas las enseñanzas y consejos brindados para la realización de la fase experimental de la presente tesis.

A la Dra. Nayeli Huidobro por todas las atenciones brindadas desde mi primer momento en el Laboratorio de Neurofisiología Integrativa, por cada enseñanza brindada y por ser una constante guía para mí.

Al Dr. Otto Braulio García Garibay, colaborador externo de la presente tesis, por todas las enseñanzas brindadas y su constante apoyo.

Al M.C Pedro Mabil y el L.C.G Ivan Zea por compartir conmigo sus conocimientos, el aprendizaje que recibí de ustedes es invaluable.

A la M.P.S.S. Jessica Roldán por su gran apoyo en la realización de la fase experimental, por su gran disciplina, responsabilidad y compromiso.

Al M.C Abraham Méndez, por su amistad y sus consejos, por cada una de las enseñanzas brindadas.

A la M.C. Mayra Moreno, agradezco sus comentarios y enseñanzas durante todo el proceso de la realización de ésta tesis

A mis amigos y compañeros de laboratorio de Neurofisiología Integrativa, Anai, Frida, Jesús, Ángel, Victoria, Felipe y Jorge por el apoyo brindado

A mis amigos, Marcela, Sujey, Kenya Luis, Enilio, Irving, Mauricio, René, y Paola por su apoyo y su cariño.

Dedicatoria

Quiero dedicar lo aquí escrito a mi motor y mi motivación, a quiénes siempre han creído en mí y me han impulsado para lograr siempre lo que anhelo, a mis padres, Héctor y Horte, mis tíos Dante, Cony, Rogelio y Lucy y a mi abuelito Celso, gracias por ser un ejemplo a seguir y por ser los pilares en mi formación profesional y humana, gracias por toda su paciencia, comprensión y amor.

A mis hermanas Ditzia y Astrid por ser mi apoyo fundamental a diario, por siempre ayudarme a cumplir mis metas y objetivos, por sus consejos, por su amor, por ser una fuente inagotable de motivación y por ser para mí una gran inspiración.

A toda mi familia por su gran amor y por su constante apoyo durante ésta etapa de mi vida.

Abreviaturas

dB.	Decibeles
EC.	Estímulo condicionado
ENC.	Estímulo no condicionado
RC.	Respuesta condicionada
AVT.	Área ventral tegmental
NAc.	Núcleo accumbens
CPF.	Corteza pre-frontal
ABL.	Amígdala baso-lateral
Hip.	Hipocampo
Ami.	Amígdala
nTDL.	Núcleo talámico dorso-lateral
HbL.	Habénula lateral
HL.	Hipotálamo lateral
CA.	Corteza auditiva
CI.	Colículo inferior
CGM.	Cuerpo geniculado medial
CAA.	Campo auditivo anterior
A1.	Corteza auditiva primaria
A2.	Corteza auditiva secundaria
UF.	Campo ultrasónico
FC.	Frecuencia característica
FFI.	Imágenes de fluorescencia de flavoproteína
Cb.	Cerebelo
ACM.	Arteria cerebral medial
BO.	Bulbo olfatorio
FR.	Fisura final
CSS.	Corteza someto-sensorial
CV.	Corteza visual

Resumen

El propósito de ésta tesis fue diseñar y montar un sistema basado en Matlab y Arduino, para la obtención en tiempo real de curvas psicométricas correspondientes al aprendizaje de una tarea de discriminación auditiva en el ratón en libre movimiento. La justificación de elaborar este sistema, es que nos permitirá diseñar futuros experimentos de electrofisiología y optogenética, para el estudio de la actividad neuronal asociada a la discriminación de tonos puros en roedores en diversas condiciones experimentales; en particular, en ambientes con diversos tipos de ruido eléctrico y de estimulación ruidosa optogenética en el cerebro.

1. Antecedentes generales

1.1. Conductismo

El conductismo es el nombre que se le da a varios enfoques de la psicología, especialmente al estudio del aprendizaje, que surgió y prosperó durante el siglo XX. Estos enfoques rechazaron el uso de métodos introspectivos (en los que los individuos informaron sobre sus experiencias subjetivas). En cambio, se basaron en el estudio del comportamiento, su modificación, sus antecedentes y consecuencias observables, que se consideraron las únicas fuentes de datos científicamente objetivas. En consecuencia, los conductistas rechazaron las caracterizaciones de la psicología que se hicieron en términos del estudio de los eventos mentales, o de la conciencia. En su lugar, definieron la psicología como el estudio de la conducta y su modificación, tanto en animales como en humanos.

La psicología, según el punto de vista conductista, es una rama experimental puramente objetiva de las ciencias naturales. Su objetivo teórico es la predicción y el control del comportamiento. La introspección no forma parte esencial de sus métodos, ni el valor científico de sus datos depende de la disponibilidad con que se prestan a la interpretación en términos de conciencia (Watson, 1913).

La aparición del conductismo como corriente psicológica, se remonta a una variedad de fuentes bibliográficas que datan de los siglos dieciocho y diecinueve. El filósofo empirista John Locke sostuvo que las “ideas simples” surgían solo de la experiencia sensorial, pero que la “mente” humana tenía la capacidad de combinarlas

de varias maneras para formar “ideas complejas” (Locke, 1968). Esta filosofía llevó finalmente a un estudio más detallado de los mecanismos específicos de la "asociación de ideas". Por lo tanto, al nacimiento de la escuela psicológica de asociacionismo.

En la segunda mitad del siglo XIX, algunos psicólogos comparativos propusieron que el aprendizaje en animales ocurría a través de estímulos y respuestas, denominadas acciones reflejas (Romanes y Morgan, 1883). Para muchos investigadores, desde la época de Descartes hasta la de Pavlov, los reflejos se consideraban la unidad psicológica básica y los animales se concebían como "autómatas".

Pavlov descubrió que un estímulo visual producía la secreción de líquido digestivo en un animal hambriento. Por otra parte, demostró que al adicionar un estímulo sonoro en la presentación de la comida, los animales también secretaban dicho líquido. A lo que denominó *estímulo condicionado* (Fantino, 2012).

1.1.2. Aprendizaje asociativo

El aprendizaje asociativo, es la habilidad de todos los organismos vivos de percibir relaciones de contingencia entre los distintos eventos en su ambiente. Se considera como un proceso muy elemental de asociación entre estímulos-respuesta y estímulos que formarían el pilar de actividades más complejas (Hull, 1950).

El principio central del condicionamiento, es la modificación de la respuesta de un organismo por los eventos ambientales. Los dos principales procedimientos experimentales para el estudio del aprendizaje asociativo, son el *condicionamiento Pavloviano* o *condicionamiento clásico*, y el *condicionamiento operante* o *condicionamiento instrumental*.

El condicionamiento Pavloviano implica el aprendizaje de una relación de contingencia entre dos estímulos. En la mayoría de los procedimientos experimentales uno de estos estímulos es biológicamente relevante y se denomina estímulo no condicionado. Éste estímulo puede ser positivo (alimento, agua... etc.) o aversivo (choque eléctrico), mientras que el otro es un estímulo biológicamente neutral o estímulo condicionado.

El aprendizaje de la relación *Estímulo condicionado-Estímulo no condicionado* (EC-ENC) se evalúa midiendo la respuesta condicionada (RC), que el estímulo condicionado desencadena como consecuencia de su emparejamiento con el estímulo no condicionado. Además, el estímulo no condicionado es necesario en estudios animales, para inducir cambios en la conducta que permite evaluar el desarrollo del aprendizaje asociativo.

El condicionamiento operante involucra el aprendizaje de la relación entre una respuesta y un estímulo, la respuesta se denomina “operante” y al estímulo “refuerzo” o “castigo”, dependiendo si el aprendizaje promueve un incremento o un decremento de la probabilidad de la emisión del operante.

1.1.2.1 Teoría del aprendizaje asociativo

En 1972, Rescorla y Wagner, propusieron que las condiciones específicas bajo las cuales la fuerza asociativa se acumula en un estímulo se producen cuando hay emparejamientos EC-ENC. Específicamente, ¿bajo qué condiciones la contigüidad de EC y ENC da lugar a la formación de una asociación? El modelo se basa en el supuesto de que el efecto de un reforzador (el ENC) depende no solo de ese reforzador en sí mismo, sino también, de la relación entre ese refuerzo y el refuerzo anticipado por el organismo. Es decir, las expectativas existentes del organismo forman un contexto que modula la efectividad de los EC.

Los supuestos esenciales del modelo Rescorla-Wagner son:

1. Cualquier ENC puede soportar solo una cantidad dada de condicionamiento. Después de este punto, otras presentaciones en ENC no producirán cambios de comportamiento adicionales. En este parámetro, la asíntota del aprendizaje, difiere para cada uno de los ENC, dando origen a un límite en la magnitud de los cambios en la fuerza asociativa.
2. Cuando los estímulos condicionados (EC) ocurren en el compuesto, la fuerza asociativa total es igual a la suma de las fuerzas asociativas de cada elemento del compuesto.

3. Los cambios en la fuerza asociativa que se producen con la experiencia adicional están determinados por la diferencia entre la fuerza actual del compuesto y la asíntota de aprendizaje. Por lo tanto, los incrementos en la fuerza asociativa con cada emparejamiento sucesivo de EC-ENC se harán cada vez más pequeños, ya que cada cambio adicional asegura que menos cambios son potencialmente posibles. Esta suposición final describe sucintamente cómo se modificará la fuerza asociativa de un EC durante el curso del condicionamiento.

1.1.3. Condicionamiento clásico

El condicionamiento Pavloviano hace referencia a los ajustes que presentan los organismos en respuesta a la observación de las relaciones temporales entre los estímulos ambientales o propioceptivos. Es una forma de aprendizaje asociativo que permite a los organismos predecir eventos futuros (Gottlieb, 2012). La forma más conocida de condicionamiento clásico implica el emparejamiento de un estímulo condicionado neutro (EC) con un estímulo no condicionado (ENC) que provoca una respuesta no condicionada (RNC). Lo que lleva al EC a provocar una respuesta condicionada cualitativa similar a la RNC. El primer experimento reportado de Pavlov empleó perros como sujetos experimentales, un metrónomo (EC), alimento (ENC) y salivación (RNC y RC) (Pavlov, 1927), ([Figura 1](#)).

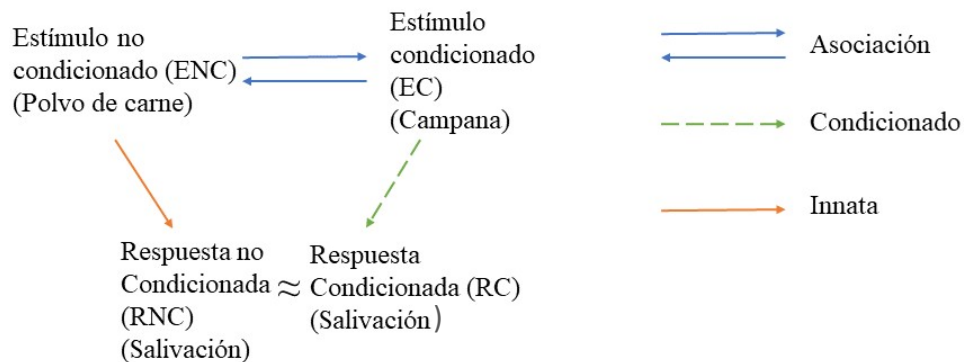


Figura 1. Paradigma del condicionamiento clásico de Pavlov (Modificado de Fantino y Logan, 1979).

1.1.3.1. Fenómenos excitatorios básicos

La *adquisición* es el fenómeno principal del condicionamiento Pavloviano y se refiere al aumento de la respuesta condicionada, como resultado del emparejamiento del EC y el ENC a través del tiempo (Pavlov, 1927). Un EC que produce una respuesta condicionada se conoce como excitador. Un ejemplo de un excitador es un tono breve, debido a la repetición con el emparejamiento de un expulsor del aire (*airpuff*), que produce un parpadeo anticipatorio.

Un animal que aprende a parpadear en un tono también puede hacerlo cuando se le presenta un estímulo auditivo novedoso. La magnitud de esta respuesta generalizada es una función de la similitud del nuevo estímulo con el EC previamente aprendido (Pavlov, 1927). Las funciones de generalización pueden modificarse mediante el aprendizaje de discriminación, en el que algunos estímulos se refuerzan mientras otros no. Por ejemplo, la respuesta generalizada de un tono, a una ráfaga de ruido blanco, puede reducirse intercalando presentaciones del ruido solo. Un tono combinado con una expulsión de aire cerca del ojo produce una respuesta mayor que la generada por un parpadeo anticipatorio. También, desarrolla la capacidad de funcionar como un refuerzo condicionado para otro EC de segundo orden (Pavlov, 1927). El condicionamiento de segundo orden tiende a conducir a niveles más bajos de respuesta que el condicionamiento de primer orden. Por lo tanto, una luz combinada con un tono excitador probablemente provocará un parpadeo menos condicionado que el tono mismo.

Los reforzadores condicionados se contrastan con los reforzadores primarios que no necesitan capacitación previa para poder establecer una respuesta condicionada. A diferencia del condicionamiento instrumental, los reforzadores pavlovianos se refieren a estímulos que pueden ser apetitosos o aversivos.

1.1.3.2. Fenómenos Inhibitorios básicos

Los fenómenos inhibitorios son aquellos que se manifiestan en oposición a la respuesta condicionada. Es decir, al presentarse simultáneamente los estímulos, éstos reducen las respuestas de los excitadores, en comparación a las respuestas que producen los estímulos neutros (Rescorla, 1969). Éste tipo de inhibición se conoce como inhibición operacional.

Por otra parte, el término extinción se refiere a la pérdida de la respuesta condicionada que ocurre cuando un excitador se presenta subsecuentemente para disrumpir en la relación EC-ENC (Pavlov, 1927). Por ejemplo, el tono excitatorio dejará de producir los parpadeos condicionados si se presenta solo repetitivamente. Aunque la extinción se explica apelando a los mecanismos inhibitorios, los estímulos que se extinguen no se convierten en inhibidores operativos (Rescorla, 1969a).

La supresión de la respuesta también se puede observar cuando un estímulo no reforzado se intercala entre los ensayos reforzados de otro EC y un ENC. Por ejemplo, si las presentaciones de ruido solo se intercalan entre los emparejamientos de aire y tono, se reducirá la respuesta generalizada al ruido. La supresión de la respuesta en un procedimiento de discriminación se conoce como inhibición diferencial. A diferencia de los estímulos extinguidos, los estímulos condicionados diferencialmente pueden convertirse en inhibidores operativos (Pavlov, 1927).

Una forma particularmente poderosa de inhibición diferencial resulta de un procedimiento de inhibición condicionada. Esto ocurre cuando un estímulo no se refuerza en presencia de un excitador. Por ejemplo, si el tono se acompaña de un *airpuff*, excepto cuando se presenta de manera conjunta a un estímulo luminoso, ésta señal será un inhibidor condicionado capaz de pasar las pruebas operativas de inhibición (Pavlov, 1927). Tal vez no sea sorprendente que con un entrenamiento prolongado, los organismos puedan negarse a responder a un EC hasta que se acerque más el tiempo de la ENC. La disminución en la respuesta temprana de un EC que puede resultar de un entrenamiento prolongado y se conoce como inhibición del retraso (Pavlov, 1927).

1.1.4. Condicionamiento operante

El comportamiento operante cumple dos condiciones: la primera es que se emite libremente por un animal, y la segunda, es que se refuerza y castiga por sus consecuencias, de manera que se puede hacer que aumente o disminuya la frecuencia, respectivamente (Toates, 2012).

Las respuestas operantes condicionadas comprenden aprendizajes semicomplejos y corresponden a las respuestas “voluntarias” de un animal después de que han sido seguidas, en ocasiones previas, por la presentación de una recompensa o la retirada de un castigo. Las respuestas operantes condicionadas se construyen sobre la actividad “azarosa”, generalmente asociada a los “motivos” y se distinguen de las respuestas clásicamente condicionadas construidas sobre reflejos innatos provocados por estímulos externos específicos. Los animales superiores

presentan más respuestas emitidas que reflejos provocados y por tanto exhiben más condicionamiento operante que clásico (Cohen, 1969).

Morgan en 1984 especuló que la conducta de los animales, que superficialmente indica procesos elevados de pensamiento, podía explicarse adecuadamente por el aprendizaje de “ensayo y error”. La interpretación de la conducta animal debe hacerse al nivel más bajo y consistente con la observación. Esto constituye un axioma psicológico y se conoce como “*El canon de Lloyd Morgan*”.

Por otra parte, Thorndike en 1911 realizó experimentos en gatos privados de alimento, los cuales colocaba en una caja-jaula. Cabe señalar que fuera de la caja-jaula colocó alimento para explorar el comportamiento del sujeto experimental. En la mayoría de los casos el gato podía escapar y alimentarse ejecutando una respuesta “mecánicamente orientada” (jalar una cuerda o presionar un botón, lo que abría automáticamente la caja) (Figura 2) o una respuesta “personalmente orientada” (rascarse o lamerse, el experimentador abría la puerta). Dichos experimentos lo llevaron a formular la “*Ley del Efecto*”. De las diversas respuestas que se producen en una misma situación, aquellas que se acompañan o siguen inmediatamente, por la satisfacción del animal (dejando constante lo demás) se conectarán más firmemente con la situación. De tal manera, que al reaparecer la situación, éstas tendrán mayor probabilidad de aparecer nuevamente. Mientras que otras que se acompañan, o siguen inmediatamente, de incomodidad para el animal (todo lo demás constante) verán debilitada su conexión con la situación. Por lo cual, cuando

reaparezca la situación, éstas tendrán una menor probabilidad de reaparecer (Thorndike, 1927).

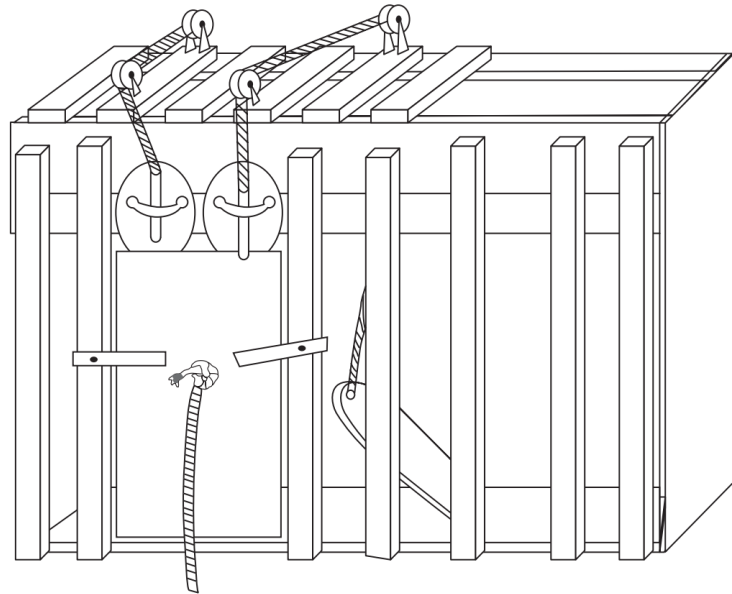


Figura 2. Caja-jaula empleada por Thorndike para estudiar la adquisición de nuevos comportamientos en los gatos deprivados de alimento (Modificado de Thorndike, 1911).

Fue hasta 1937 que Skinner acuña el término de *condicionamiento operante* en el contexto de la fisiología reflexiva, para diferenciar lo que le interesaba (comportamiento que afecta el medio ambiente) del tema relacionado con el reflejo de los pavlovianos.

El comportamiento operante, aunque Skinner lo define como un comportamiento "controlado por sus consecuencias" en la práctica es poco diferente de lo que antes se denominaba "aprendizaje instrumental" y lo que la mayoría de las personas llamarían hábito. Cualquier "agente" bien entrenado es en efecto un hábito.

La aportación novedosa del método de Skinner era el entrenamiento automatizado con refuerzo intermitente y los ejercicios de entrenamiento a los que conducía. Skinner y sus colaboradores descubrieron en décadas subsiguientes una gama completamente insospechada de ordenados efectos de programación que proporcionaron nuevas herramientas para comprender los procesos de aprendizaje y nuevos fenómenos. Un programa de refuerzo es cualquier procedimiento que entrega un refuerzo a un organismo según alguna regla bien definida. El reforzador habitual es alimento para una rata o paloma hambrienta, el horario habitual es uno que entrega el reforzador para un cierre de interruptor provocado por un *peck* o presionando una palanca (Staddon y Cerutti, 2003).

Skinner postuló dos clases de respuestas conductuales, *operante* y *respondiente*. Las respuestas operantes no son reflejas o voluntarias, dado que se emiten (como fragmentos de la conducta agitada que acompaña una necesidad) sin relación precisa a los estímulos externos. La respuesta operante no está innatamente asociada a ningún estímulo previo que se pueda identificar. Por otro lado, las respuestas respondientes son reflejas, dado que se producen por estímulos externos precisos. La asociación de entre el estímulo previo y la respuesta respondiente es innata y no se modifica. Por ello, las respuestas operantes son la base del condicionamiento operante y las respuestas respondientes lo son del condicionamiento clásico (Cohen, 1969).

1.1.4.1. Procedimientos del Condicionamiento Operante

Cuatro métodos lógicos de entrenamiento construyen una respuesta operante condicionada, y cuatro métodos lógicos de entrenamiento que destruyen una respuesta operante condicionada ya existente (Kimble, 1961).

Los procedimientos del condicionamiento operante derivan de la “*Ley del efecto*” (Thorndike, 1927) que compara el condicionamiento operante con la doctrina del hedonismo, en la que cada acto está motivado por un deseo o placer y/o por una aversión al displacer. Se define a la presentación de la recompensa o retirada del castigo como *reforzamiento positivo* y al castigo presentado o a la recompensa retirada como *reforzamiento negativo*.

En el contexto del cuadro de Skinner, un reforzador se define como aquello que le da al experimentador el control sobre el comportamiento operante, en el sentido de que la tendencia a exhibir un comportamiento particular se refuerza. Dicho refuerzo puede llevar el comportamiento hasta un nivel máximo o mantenerlo en este nivel a lo largo del tiempo (en ausencia de alimento, el animal tendería a retardar su respuesta). Los alimentos normalmente serán un refuerzo positivo, ya que la respuesta que exhibe un animal hambriento antes de que éstos lleguen aumenta. Como no hay un estímulo desencadenante antes de la emisión de un operante, el modelo de *estímulo-respuesta* del comportamiento provocado parece ser inadecuado

para Skinner, el cual le permite describir el comportamiento que muestran los sujetos en estas condiciones (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación en una tabla de doble entrada (Modificada de Cohen, 1969).

	Presentado		Retirado	
Recompensa	Reforzamiento Positivo	Reforzamiento negativo		
	-	+	-	+
Castigo	Reforzamiento negativo	Reforzamiento Positivo		
	-	+	-	+

1.1.4.2. El método experimental del condicionamiento operante

Skinner diseñó un aparato que se denominó caja de Skinner. Típicamente, un animal hambriento se colocaría en una caja de Skinner, como resultado de una manipulación, obtiene una porción de comida. Para una rata, el objeto de manipulación es normalmente una palanca, que presionan con sus extremidades anteriores. Si una paloma, necesita desplazar una llave, lo hace picoteando. La caja de Skinner es un ejemplo de condicionamiento instrumental, debido a que el comportamiento es fundamental en el resultado, obtener alimentos.

El comportamiento que se muestra en el cuadro de Skinner se define como "*condicionamiento operante*", lo que significa que el animal opera en su entorno realizando operantes. En contraste con el comportamiento provocado, este se define como "*comportamiento emitido*". Los operantes se emiten libremente por el animal, y la frecuencia de su realización es sensible a sus consecuencias. Por otra parte, Skinner describió el "*estímulo discriminativo*", el cual es diferente del estímulo tal como aparece en la expresión "*estímulo-respuesta*".

Una característica del estímulo discriminativo es que este no ganará refuerzo. Por ejemplo, supongamos que una paloma gana comida solo cuando hay una luz roja encendida. Con el tiempo, llegará a responder solo en presencia de la luz roja y se abstendrá de responder cuando la luz no esté encendida ([Figura 3](#)) (Toates, 2012).

Una caja de Skinner típica, diseñada para la presentación de una recompensa, tiene seis componentes: 1) un estímulo discriminativo (como un tono o una luz o algún aspecto visual de la caja misma), que es percibido por el animal, 2) un *operandum* la cual es una herramienta para ser manipulada por el animal (un disco circular que sirve de blanco a los picotazos de la paloma o la palanca que el roedor presiona), 3) una cámara o caja que contiene que contiene el estímulo, el *operandum* y el animal, 4) un administrador de recompensa el cual es un mecanismo que almacena y dispensa la recompensa (alimento, agua), 5) un registro que suma y registra gráficamente las respuestas del animal registradas por el *operandum* y 6) un control electrónico del programa y presentación de los estímulos discriminativos y de aquellas contingencias en las que los reforzadores siguen a las respuestas.

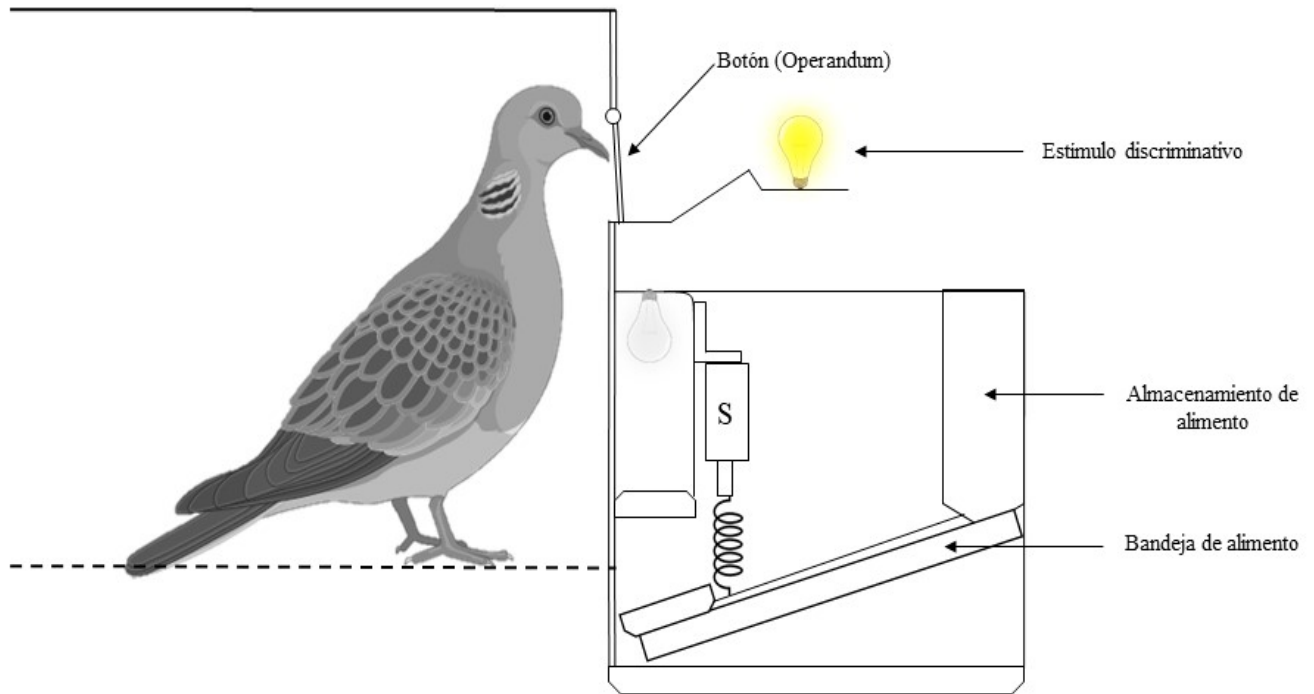


Figura 3. Caja de Skinner adaptado a la paloma. La paloma, en una caja de Skinner aprende a picar el *operandum* que levantará una válvula solenoide (S), con ella la bandeja para obtener alimento (una respuesta operante condicionada). Esta picará solo cuando se lo señala el estímulo discriminativo (Modificado de Ferster y Skinner, 1957).

La respuesta operante debe ejecutarse del tipo todo o nada, debe ocurrir con poca frecuencia antes del condicionamiento y debe ocurrir frecuentemente después del condicionamiento. Así también, la tasa de la respuesta operante, se refiere como, el número de respuestas operantes por unidad de tiempo ([Figura 4](#)).

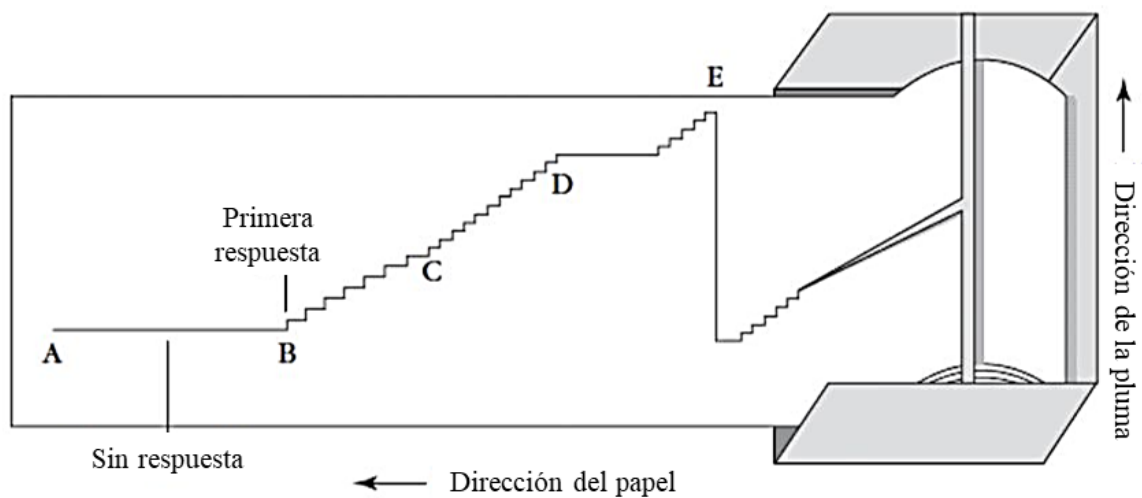


Figura 4. Construcción de un registro acumulado. El papel se mueve hacia la izquierda a una velocidad constante. Cada respuesta causa que la pluma se mueva hacia arriba un paso. En el esquema se muestra que ninguna respuesta ocurrió entre el punto A y B. En el punto B ocurre la adquisición de la operante condicionada. Ocurrió entre los puntos B y C una tasa moderada de respuestas mientras que en los puntos C y D una rápida tasa de respuestas. Entre los puntos B y D se denominan la emisión de la respuesta condicionada. En el punto E, la pluma se reinicia al borde inferior de la página, en dicho punto ocurre la extinción de la operante condicionada (Modificado de Skinner, 1956).

1.1.4.3. Técnicas modificadas del condicionamiento operante

Posterior a los experimentos realizados por Skinner diversos psicofisiólogos desarrollaron aparatos para la investigación de las diversas respuestas operantes condicionadas en animales de casi toda la escala filogenética.

Algunas de las técnicas modificadas emplean aparatos similares a cajas de Skinner y se adaptan a la respuesta operante y tamaños de los sujetos experimentales. Por ejemplo, ratas que se mantienen en la obscuridad aprenden a presionar palancas para obtener cinco segundos de luz (Hurwitz, 1956), ratas con temperaturas muy bajas para obtener diez segundos de calor, ratas sujetas a sonidos muy fuertes para obtener diez segundos de silencio. Algunas ratas presionaban palancas para obtener inyecciones de morfina y así aminorar la dependencia fisiológica (Weeks, 1962). Por otra parte, algunos perros oprimían *operandums* de gran tamaño, para obtener reforzamientos de comida especial (Waller, 1960). Además, los chimpancés también aprendieron a presionar palancas para obtener fichas que después cambiaron por alimento.

Existen también técnicas modificadas que se diseñaron para usarse en el agua, como en los pulpos, que golpean con sus tentáculos para obtener pescado como reforzamiento (Dews, 1959).

1.1.4.4. Adquisición de la respuesta condicionada bajo un entrenamiento de recompensa

La respuesta condicionada permite que el reforzamiento siga a la ejecución de la respuesta operante. Por ello, el animal aprende la respuesta operante para obtener el estímulo deseado.

El estudio moderno de aprendizaje por un sistema de recompensa puede rastrear sus raíces hasta la clásica *Ley del Efecto de Thorndike* de la psicología del aprendizaje animal. La cual establece que las respuestas seguidas de resultados satisfactorios (es decir, gratificantes) tienen más probabilidades de repetirse (Sutton y Barto, 1998).

El marco teórico del aprendizaje por recompensa puede verse como una formalización de esta perspectiva, mediante la cual las recompensas alteran la propensión de los sujetos experimentales a seleccionar diferentes acciones. Las acciones que son seguidas consistentemente por mayores recompensas tenderán a seleccionarse con mayor frecuencia a través de un proceso de prueba y error.

Las ideas del aprendizaje por recompensa han ganado importancia como modelo computacional del aprendizaje, así como, la toma de decisiones de los animales y sus sustratos neurales. Además, el ambiente generalmente se divide en un agente y entorno que interactúan. El agente (o animal) elige acciones, recibe recompensas y otras observaciones del entorno (Seel, 2011).

1.1.4.5 Programas de reforzamiento

Un programa de refuerzo se organiza mediante un sistema de programación que puede especificarse en términos físicos. Se introduce un reloj en el circuito entre la llave y el cargador para que se refuerce la primera respuesta hecha a la clave después de un intervalo de tiempo dado. Un contador introducido en el circuito establece una contingencia en términos de número de respuestas emitidas por refuerzo. Varios ajustes de reloj y contador, y combinaciones de éstos generan posibilidades casi ilimitadas (Skinner, 1958).

Un programa seleccionado generalmente produce un rendimiento característico, el cual se expresa en términos de tasa de respuesta y cambios en ésta. Una vez que esto sucede, el organismo se refuerza característicamente al final de un patrón particular de respuesta. Su comportamiento en el momento del refuerzo y durante el período anterior es parte del entorno estimulante, cuyos aspectos adquieren control sobre el comportamiento posterior. Por ejemplo, si un organismo responde de manera característica a un ritmo alto en el momento del refuerzo, el comportamiento a ese ritmo se convierte en una condición estimulante óptima, comparable a la presencia del estímulo reforzado en una discriminación, y la probabilidad de mayor respuesta es máximo. Cuando el organismo no responde en absoluto, la probabilidad es mínima. Otras tasas y patrones de cambios en la tasa tienen funciones discriminativas similares.

Una respuesta condicionada establecida no necesita mantenerse con reforzamiento continuo, en el que se refuerza cada una de las respuestas operantes, sino más bien con el programa de reforzamiento intermitente, algunas veces llamada

reforzamiento parcial. Los programas de reforzamiento intermitente dependen del número de respuestas precedentes y de la longitud del intervalo de tiempo precedente. Si el reforzamiento depende del número de respuestas que ha dado el animal desde que recibió el último reforzamiento se está bajo un programa de razón porque el número de respuestas reforzadas siempre es una proporción del número de respuestas no reforzadas. Si el reforzamiento depende del intervalo de tiempo desde la última vez que se reforzó (independientemente del número de respuestas) se está siguiendo un programa de intervalo, porque siempre hay un intervalo entre reforzamientos.

Los programas de razón e intervalo a su vez se dividen en programas fijos, cuando el número de respuestas e intervalo es siempre el mismo y programas variables, cuando el número de respuestas o intervalo se dejan al azar y son diferentes (Ferster y Skinner, 1957).

Todas las aproximaciones a estudios conductuales, como el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante, así como sus programas de reforzamiento positivo o negativo subyacen en procesos fisiológicos conocidos, principalmente en el circuito de recompensa neuronal.

1.1.5. Centro de la recompensa cerebral

Las recompensas son objetos cruciales que inducen el aprendizaje, abordan el comportamiento, las elecciones y las emociones. Mientras que las emociones son difíciles de investigar en animales, la función del aprendizaje está mediada por señales de error de predicción de recompensa neuronal que implementan construcciones básicas de la teoría del condicionamiento operante.

Estas señales se encuentran en las neuronas dopaminérgicas, que emiten una señal de recompensa global al cuerpo estriado y la corteza frontal, y en neuronas específicas del cuerpo estriado, la amígdala y la corteza frontal que se proyectan para seleccionar poblaciones neuronales. El enfoque y las funciones de elección implican un valor subjetivo, que se evalúa objetivamente mediante elecciones de comportamiento que provocan preferencias de recompensa. Aunque todas las variables de recompensa, refuerzo y decisión son construcciones teóricas, sus señales neuronales constituyen implementaciones físicas medibles y, como tales, confirman la validez de estos conceptos. Las señales de recompensa neuronal proporcionan orientación para el comportamiento al tiempo que restringen el libre albedrío para actuar.

El circuito de recompensa mejor caracterizado en el cerebro comprende neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral (AVT) que se proyectan al núcleo accumbens (NAc), que es parte del cuerpo estriado ventral. Las neuronas principales del NAc son las neuronas espinosas medianas GABAérgicas (NEM). Este circuito AVT-NAc es crucial para el reconocimiento de recompensas en el medio ambiente y para iniciar su consumo, pero estas regiones también responden a estímulos aversivos.

Las neuronas dopaminérgicas AVT también inervan varias regiones de la corteza prefrontal (CPF), la amígdala central, la amígdala basolateral (ABL) y el hipocampo, así como otras áreas (Figura 5). Estas "regiones de recompensa cerebral" están interconectadas de formas complejas. Por ejemplo, el NAc recibe una innervación glutamatérgica densa de la CPF, la amígdala y el hipocampo. La CPF, la amígdala y el hipocampo forman conexiones glutamatérgicas recíprocas entre sí. La producción funcional de cada una de estas regiones está modulada por varios tipos de interneuronas GABAérgicas y, en la NAc, también por interneuronas colinérgicas.

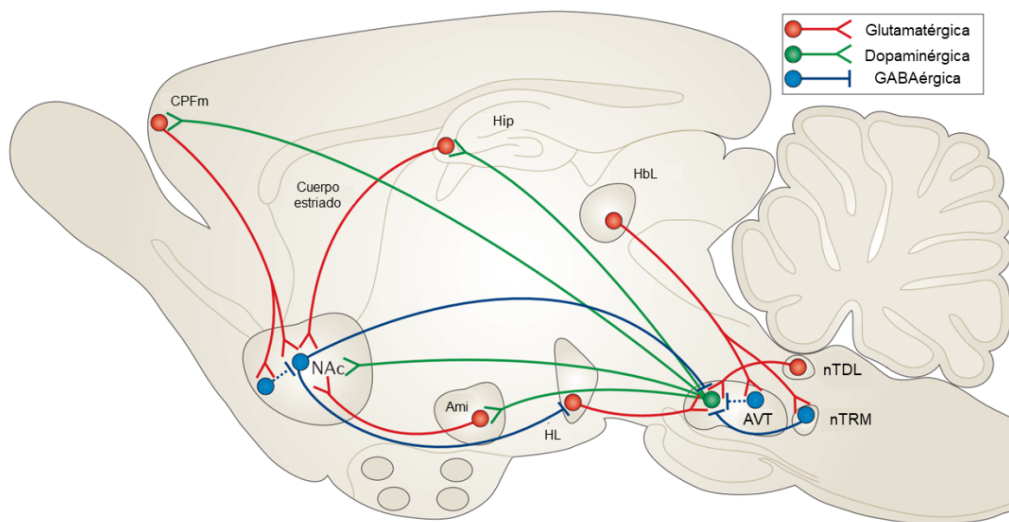


Figura 5. Esquema simplificado de las principales conexiones dopaminérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas hacia y desde el área ventral tegmental (AVT) y el núcleo accumbens (NAc) en el cerebro de roedores. El circuito primario de recompensa incluye proyecciones dopaminérgicas del AVT al NAc, que liberan dopamina en respuesta a estímulos relacionados con la recompensa (y en algunos casos, estímulos relacionados con la aversión). También hay proyecciones GABAérgicas de NAc a AVT, las proyecciones a través de la vía directa (mediada

por neuronas espinosas medianas de tipo D1 (NEM)) inervan directamente el AVT, mientras que las proyecciones a través de la vía indirecta (mediada por MSN de tipo D2) inervan el VTA a través de neuronas GABAérgicas que intervienen (continúa) en el pálido ventral. El NAc recibe una inervación densa de los circuitos monosinápticos glutamatérgicos de la corteza prefrontal medial (CPFm), el hipocampo (Hip) y la amígdala (Ami), así como otras regiones. El AVT recibe dichos aportes desde núcleo tegmental dorso-lateral (nTDL), la habénula lateral (HbL) y el hipotálamo lateral (HL), así como las conexiones GABAérgicas y glutamatérgicas de la amígdala extendida. Estas diversas entradas glutamatérgicas controlan aspectos de la percepción y memoria relacionadas con la recompensa. Las líneas discontinuas indican proyecciones inhibitorias internas. El circuito glutamatérgico del HL a la AVT también está mediado por orexina (Modificado de Russo y cols., 2013).

1.1.6. Vía Auditiva del ratón

La vía ascendente auditiva es un sistema importante que transmite información sonora a la corteza auditiva (CA) en los mamíferos. La vía que se origina en el oído se denomina vía lemniscal, que pasa a través del núcleo central (NcCI) del colículo inferior (CI) en el mesencéfalo y la división ventral (MGv) del cuerpo geniculado medial (CGM) en el tálamo en dirección hacia la corteza auditiva (Lee y Sherman, 2010; Lee y cols., 2011; Winer y Schreiner, 2011). Para comprender la audición en mamíferos, es crucial revelar uno por uno los roles funcionales de estos núcleos auditivos en los distintos relevos de ésta vía. Por ejemplo, se ha revelado una función

distinta del CI, como detectar la localización del sonido por referencia a las diferencias de tiempo interaural (Fujita y Konishi, 1991; Grothe y cols., 2010).

Hoy en día, los estudios de neurociencia se realizan de acuerdo con la teoría de la especialización funcional. El cerebro de los mamíferos se divide en módulos funcionales por ubicación (Kanwisher, 2010; Zilles y Amunts, 2010). Teniendo en cuenta este principio, la corteza auditiva se divide en varias subregiones, cada una de las cuales debe tener una función regional distinta para el procesamiento de sonido. La disposición espacial de estas subregiones generalmente se representa e ilustra como un mapa cortical auditivo. Por lo tanto, un mapa de la corteza auditiva proporciona una mejor plataforma para investigar distintas funciones regionales porque todas las investigaciones fisiológicas se realizan sobre la base de este mapa.

El mapa de la corteza auditiva del ratón se describió por primera vez hace aproximadamente dos décadas (Stiebler y cols., 1997). Esta descripción es muy importante porque los investigadores identificaron, a través del registro extracelular unitario, múltiples regiones auditivas sin ningún conocimiento previo al investigar la distribución de una frecuencia característica, una frecuencia para la cual una neurona tiene su umbral excitador más bajo. Este mapa representaba la corteza auditiva con cinco subregiones: dos regiones tonotópicas, el campo auditivo anterior (CAA) y la corteza auditiva primaria (A1) y tres regiones no tonotópicas: el campo auditivo secundario (A2), el campo ultrasónico y el campo dorsoposterior (DP). Sorprendentemente, “*el campo ultrasónico*” (UF) se estableció como una región en la esquina dorsorostral de la CA donde se localizaron las neuronas con una frecuencia característica (FC) de más de 40 kHz, mientras que la tonotopía de la

CAA y A1 se limitó a menos de 40 kHz. La presencia del campo ultrasónico segregado podría considerarse como una característica o símbolo de la CA en ratones que usan sonidos ultrasónicos de más de 40 kHz en la comunicación vocal (Ehret, 1987; Holy y Guo, 2005; Asaba y cols., 2014) (Figura 6).

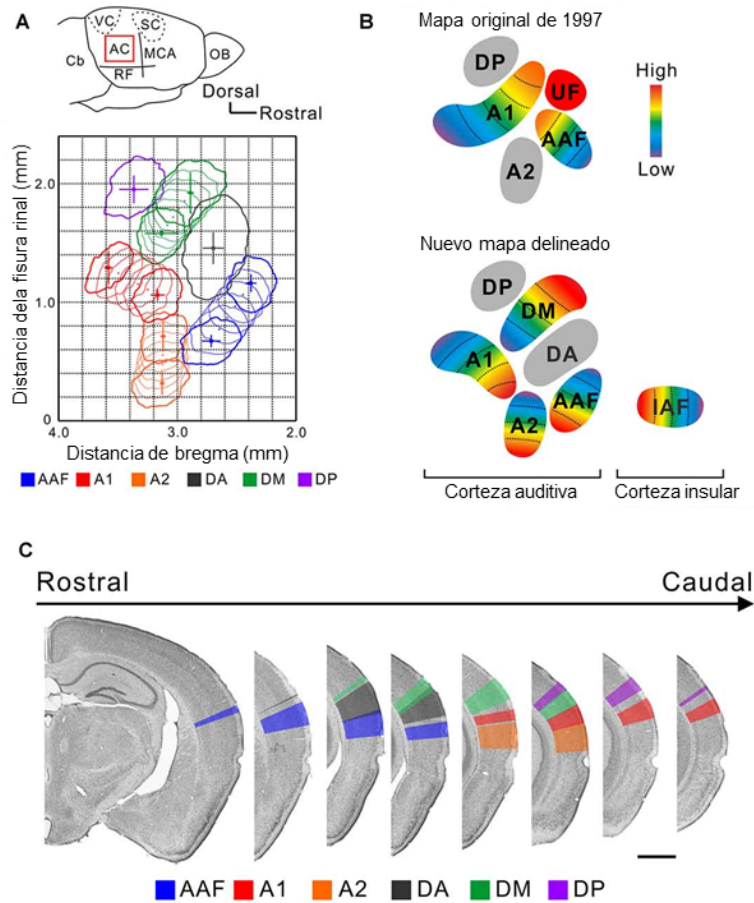


Figura 6. Mapa de la corteza auditiva del ratón utilizando imágenes de fluorescencia de flavoproteína (FFI). A. Mapa cuantitativo de la superficie de las seis subregiones de la corteza auditiva del ratón revelado usando FFI. B. Ilustración del mapa original de Stiebler y cols., 1997 y un mapa basado en los resultados de estudios recientes de imágenes ópticas C. Delineación de las seis subregiones auditivas en la vista coronal. Barra, 1 mm AC, corteza auditiva; Cb, cerebelo; MCA, arteria cerebral media; OB,

bulbo olfativo; RF, fisura rinal; SC, corteza somatosensorial; VC, corteza visual (Modificado de Tsukano et al. 2017).

1.2. Antecedentes específicos

1.2.1. *MATLAB*

MATLAB es un entorno de programación de alto rendimiento para aplicaciones numéricas y técnicas. La primera versión fue escrita en la Universidad de Nuevo México en la década de 1970. El programa "MATrix LABoratory" fue creado por Cleve Moler para proporcionar una forma simple e interactiva de escribir programas utilizando las bibliotecas Linpack y Eispack de las subrutinas FORTRAN para la manipulación de matrices.

MATLAB evolucionó para convertirse en una herramienta eficaz y poderosa para la programación, visualización y análisis de datos, educación, ingeniería e investigación. Las fortalezas de *MATLAB* incluyen amplias capacidades de manejo de datos y gráficos, herramientas de programación poderosas y algoritmos altamente avanzados. Además de los números rápidos para el álgebra lineal y la disponibilidad de una gran cantidad de funciones y bibliotecas integradas específicas del dominio (por ejemplo, para estadísticas, optimización, procesamiento de imágenes, desarrollo de *software*). Otra característica útil de *MATLAB* es su capacidad para generar fácilmente varios tipos de visualizaciones de sus datos.

Para cada característica de *MATLAB* en general, y para los gráficos en particular, la utilidad de *MATLAB* se debe principalmente a la gran cantidad de funciones y bibliotecas integradas.

MATLAB es esencialmente una herramienta sofisticada que, nos permite expresar y resolver problemas computacionales y analíticos en una amplia variedad de dominios. Su entorno combina computación, visualización y programación en torno al concepto central de la matriz y sus manipulaciones matriciales.

1.2.1.1. Psychtoolbox

Psychophysics Toolbox es un conjunto gratuito de funciones *MATLAB* y GNU Octave para la investigación y la neurociencia. Facilita la síntesis y muestra estímulos visuales y auditivos controlados con precisión e interactúa con el observador.

Los programas para ejecutar experimentos a menudo se escriben en un lenguaje de bajo nivel (por ejemplo, C o Pascal) con el objetivo de lograr el control total del *hardware* para una visualización precisa de estímulos. Aunque estos lenguajes de bajo nivel proporcionan potencia y flexibilidad, no conducen al desarrollo rápido de programas. Los lenguajes interpretados (por ejemplo, BASIC, LISP, Mathematica y *MATLAB*) resumen detalles de *hardware* y proporcionan entornos de desarrollo más amigables, pero no proporcionan el control de *hardware* necesario para una visualización precisa de estímulos. *Psychophysics Toolbox* es un

paquete de *software* que agrega esta capacidad a la aplicación *MATLAB* y Octave en computadoras Macintosh, Linux y Windows.

MATLAB es un lenguaje interpretado de alto nivel con amplio soporte para cálculos numéricos. *Psychtoolbox* interactúa entre *MATLAB* y el *hardware* de la computadora. Las rutinas en el núcleo de *Psychtoolbox* proporcionan acceso al búfer del marco de la pantalla y la tabla de búsqueda de color. Además, permiten la sincronización con el retroceso vertical, admiten temporizaciones por debajo de milisegundos, exponen comandos sin procesar, permiten la reproducción y captura de video. Asimismo, audio de baja latencia o disparadores de *hardware* y facilitan la recolección de respuestas de observadores a través de dispositivos de entrada regulares y especializados.

Los usuarios nuevos que nunca hayan programado antes descubrirán que están aprendiendo tres cosas cuando comienzan a usar la caja de herramientas: *MATLAB*, cómo crear estímulos y medir respuestas, y cómo organizar un experimento. Sin embargo, para la presentación de dichos estímulos es necesario complementar toda la programación en dichos *softwares* con herramientas de *hardware*.

1.2.2. *ARDUINO*

ARDUINO es una plataforma electrónica de código abierto basada en *hardware* y *software* fácil de usar. Las placas *ARDUINO* pueden leer entradas (luz en un sensor, un dedo en un botón, por ejemplo) y convertirlo en una salida: activar un motor, encender un LED, etc.

Podemos indicarle a la placa qué hacer si enviamos un conjunto de instrucciones al microcontrolador de ésta. Para hacerlo, se usa el lenguaje de programación *ARDUINO* (cuya base es el cableado) y el *software ARDUINO* (IDE), basado en el procesamiento.

Con los años, *ARDUINO* se convirtió en el cerebro de miles de proyectos, desde objetos cotidianos hasta instrumentos científicos complejos. Una comunidad mundial de creadores (estudiantes, aficionados, artistas, programadores y profesionales) se ha reunido en torno a esta plataforma de código abierto, sus contribuciones se han sumado a una increíble cantidad de conocimiento accesible.

ARDUINO nació en el Instituto de Diseño de Interacción Ivrea como una herramienta fácil para la creación rápida de prototipos, dirigida a estudiantes sin experiencia en electrónica y programación. Tan pronto como llegó a una comunidad más amplia, la placa *ARDUINO* comenzó a cambiar para adaptarse a las nuevas necesidades y desafíos, diferenciando su oferta de placas simples de 8 bits a productos para aplicaciones IoT, dispositivos portátiles, impresión 3D y entornos

integrados. Todas las placas *ARDUINO* son completamente de código abierto, lo que permite a los usuarios construirlas de forma independiente y eventualmente adaptarlas a sus necesidades particulares. El *software* también es de código abierto y está creciendo a través de las contribuciones de los usuarios de todo el mundo. (Badamasi, 2014)

ARDUINO se emplea para construir instrumentos científicos de bajo costo, para probar los principios de la química y la física, o para comenzar con la programación y la robótica. Existen otros microcontroladores y plataformas de microcontroladores disponibles para la computación física: Parallax Basic Stamp, Netmedia's BX-24, Phidgets, MIT's Handyboard y otros que ofrecen una funcionalidad similar. Todas estas herramientas toman los detalles desordenados de la programación del microcontrolador y lo envuelven en un paquete fácil de usar. *ARDUINO* también simplifica el proceso de trabajar con microcontroladores, pero ofrece las siguientes ventajas: 1) Bajo costo, las placas *ARDUINO* son relativamente baratas en comparación con otras plataformas de microcontroladores. 2) Multiplataforma, el *software ARDUINO* (IDE) se ejecuta en los sistemas operativos Windows, Macintosh OSX y Linux. La mayoría de los sistemas de microcontroladores están limitados a Windows. 3) Entorno de programación simple y claro, el *software ARDUINO* (IDE) es fácil de usar y está convenientemente basado en el entorno de programación de procesamiento, 4) *Software* de código abierto y extensible, el *software ARDUINO* se publica como herramientas de código abierto, disponibles para su extensión por programadores experimentados. El lenguaje se puede ampliar a través de las bibliotecas de C ++, y las personas que deseen comprender los detalles técnicos pueden dar el salto de *ARDUINO* al lenguaje de programación AVR-C en el que se basa. Del mismo modo, puede agregar el código

AVR-C directamente en sus programas *ARDUINO* si lo desea. 5) *Hardware* de código abierto y extensible, los planos de las placas *ARDUINO* se publican bajo una licencia Creative Commons, por lo que los diseñadores de circuitos experimentados pueden hacer su propia versión del módulo, extenderlo y mejorarlo. Incluso los usuarios relativamente inexpertos pueden crear la versión del módulo de prueba para comprender cómo funciona y ahorrar dinero.

1.2.1.2. *ARDUINO* -UNO

ARDUINO-Uno es una placa de microcontrolador basada en ATmega328P. Tiene 14 pines de entrada / salida digital (de los cuales 6 se pueden usar como salidas PWM), 6 entradas analógicas, un cristal de cuarzo de 16 MHz, una conexión USB, un conector de alimentación, un encabezado ICSP y un botón de reinicio, sus dimensiones son 68.6 mm de longitud, 53.4 mm de ancho y un peso de 25 g. (Figura 7).

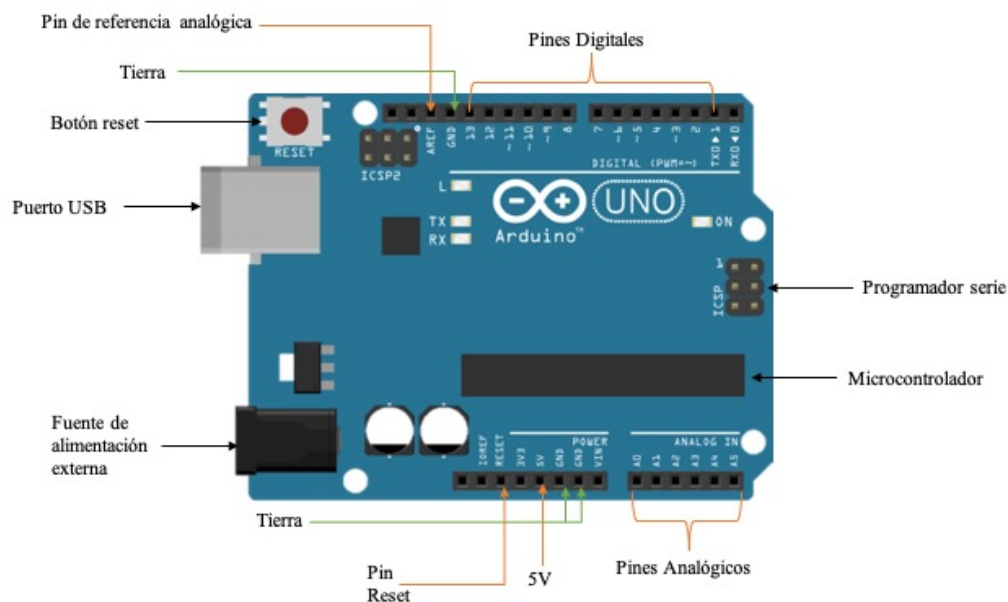


Figura 7. Placa de *hardware ARDUINO* -UNO y sus componentes.

1.2.2.1. *MATLAB- ARDUINO*

Existe una paquetería de soporte *MATLAB*® para *hardware ARDUINO*, dicha paquetería nos permite usar *MATLAB* para comunicarse interactivamente con una placa *ARDUINO*.

La paquetería nos permite realizar tareas como: 1) Adquirir datos de sensores analógicos y digitales de su placa *ARDUINO*. 2) Controlar otros dispositivos con salidas digitales y PWM. 3) Controlar motores de corriente continua, servo y paso a paso (también es compatible con Adafruit Motor Shield). 4) Acceder a dispositivos periféricos y sensores conectados a través de I2C o SPI. 5) Acceder y comunicar con una placa *ARDUINO* a través de un cable USB. 6) Crear complementos personalizados para interactuar con bibliotecas de *hardware* y *software* adicionales.

Debido a que *MATLAB* es un lenguaje interpretado de alto nivel, puede ver los resultados de las instrucciones de entrada y salida de inmediato, sin compilar. *MATLAB* incluye miles de funciones integradas de matemática, ingeniería y trazado que puede usar para analizar y visualizar rápidamente los datos recopilados de la placa *ARDUINO*.

2. Justificación

Los circuitos neuronales están compuestos por grupos de células conectadas de una manera específica. Un objetivo central de la neurociencia moderna es vincular la dinámica de estos circuitos neuronales con el comportamiento (O'Connor y cols. 2009). Descifrar la lógica de los circuitos neuronales requiere, por tanto, la neurofisiología y manipulación específicas de tipo celular (Luo y cols., 2009). En los últimos cincuenta años, los experimentos conductuales en primates han liderado el camino para separar la causalidad de la correlación en los experimentos neurofisiológicos.

Distintas técnicas conductuales, como el libre movimiento, facilitan el control del estímulo. Diversas tareas en primates no humanos son capaces de aislar funciones específicas del cerebro. Los ensayos repetidos, cientos por día, desencadenan métodos estadísticos poderosos para relacionar el comportamiento y las mediciones neurofisiológicas (Evarts, 1968; Turner y DeLong, 2000).

Sin embargo, los ratones también tienen un rico repertorio de comportamientos que involucran funciones sensoriales, cognitivas y motoras. La organización de los microcircuitos del cerebro, por lo que se conoce, es similar en

ratones y otros mamíferos superiores. Esto permite estudiarlos en el campo de la neurofisiología, imagenología y optogenética (Ferezou y cols. 2007; Guo y cols. 2014).

Por otra parte, los ratones en libre movimiento se entrenan para discriminar los olores, los estímulos visuales, las señales táctiles y los estímulos auditivos.

Como en la mayoría de los estudios de primates, en este tipo de experimentos los ratones están motivados por la sed.

Los procedimientos de comportamiento disponibles para evaluar la audición en ratones se dividen en dos tipos: los que comprenden el entrenamiento para responder a estímulos auditivos a través del condicionamiento operante y los que emplean condicionamiento clásico. Cabe señalar, que las tareas de condicionamiento operante son más sensibles que las de condicionamiento clásico. Además, estas tareas se adaptan fácilmente para probar la capacidad de los animales para discriminar, así como, para detectar sonidos.

3. Planteamiento del problema

Los estudios conductuales, que tienen como base el condicionamiento operante, así como el entrenamiento de sujetos experimentales y su aprendizaje, demuestran ser una herramienta muy valiosa para realizar experimentos altamente específicos y controlados.

En el presente trabajo nos proponemos desarrollar un sistema de “*hardware*” y “*software*” que pueda usarse posteriormente para dilucidar la capacidad discriminatoria y de sensibilidad auditiva del ratón en tareas en libre movimiento. La idea es desarrollar una tarea diseñada en el *software* algebraico computacional MATLAB y el sistema *ARDUINO*. El sistema permitirá el entrenamiento y discriminación de estímulos auditivos del sujeto experimental, que son necesarios para el aprendizaje asociativo y el condicionamiento operante.

4. Hipótesis científica

El diseño y montaje de un equipo, en conjunto con el desarrollo computacional de una tarea para el aprendizaje de ratones en libre movimiento, nos brindará herramientas que nos permitirá dilucidar la capacidad de discriminación auditiva de dichos sujetos experimentales en trabajos futuros.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Desarrollar un sistema de “*hardware*” y “*software*” para caracterizar la capacidad de discriminación auditiva en ratones en libre movimiento.

5.2. Objetivos específicos

1. Desarrollar un sistema de entrenamiento y aprendizaje en ratones utilizando *software* del sistema algebraico computacional *MATLAB*, en combinación con una placa de desarrollo de *hardware ARDUINO*.

2. Diseñar un *software* que permita realizar curvas de aprendizaje correspondientes a cada sujeto de experimentación.
3. Obtener curvas psicométricas correspondientes al aprendizaje de discriminación de las tareas auditivas.

6. Materiales y métodos

Para comprobar la hipótesis planteada, realizamos un trabajo experimental en el que se diseñó un plan de entrenamiento en ratones C57/BL6. Diseñamos un *set* experimental, en el cual, los animales realizaron una tarea de discriminación auditiva de tonos puros.

Cabe señalar que todos los protocolos se realizaron con apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-ZOO-062-1999, que incluye las especificaciones y recomendaciones para uso y cuidado de animales del laboratorio.

6.1. Ubicación espacio-temporal

Todos los experimentos se realizaron en el laboratorio de Neurofisiología Integrativa en el Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

6.2. Estrategia de trabajo

Se desarrollaron y equiparon los elementos necesarios para el montaje de una tarea de discriminación auditiva en “libre movimiento”. Se diseñó una caja de aislación acústica e iluminada independientemente, manteniendo un ciclo de luz-oscuridad 12am-12pm. Todos los experimentos se realizaron durante la fase oscura, en un horario de 8 am a 11 am, con control de humedad y temperatura (23°C).

Enseguida, los sujetos de experimentación se introdujeron dentro de la caja de aislación, la cual incluye un tubo de acrílico de 38.1 mm de diámetro para brindar soporte a su cuerpo durante la tarea. En dicho tubo se encuentra una palanca de acero inoxidable de una longitud de 30 milímetros colocada a ~15 mm de las extremidades anteriores del sujeto experimental. También se encuentra un puerto de recompensa,

del cual se expulsaron los líquidos correspondientes al sujeto experimental. Dicho puerto se encuentra a 0.5 mm por debajo del labio inferior del ratón.

La prueba consistió en presentar al ratón distintos estímulos auditivos, de misma frecuencia pero intensidad variable para su categorización. En caso de ser acertada su respuesta, el ratón presionó la palanca para obtener aproximadamente 6.25µl de agua. De lo contrario, no se le brindó una recompensa de agua y se le añadió un retraso en el reinicio de la prueba (2 segundos).

6.3. Tipo de estudio

Experimental básico

6.3.1. Definición de la unidad de población

Se emplearon ratones macho de la cepa C57BL/6, adultos, en el rango de 23 a 35 gramos de peso y de 2 a 6 meses de edad. Estos se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (23°C), humedad (20%) y ciclos de 12 horas luz por 12 horas oscuridad.

6.3.2. Selección de la muestra

La muestra se seleccionó de manera no probabilística o dirigida, en función de los criterios de selección de las unidades de muestreo.

6.4. Criterios de selección de las unidades de muestreo

6.4.1. Criterios de inclusión

No aplica.

6.4.2. Criterios de exclusión

No aplica.

6.4.3. Criterios de eliminación

No aplica.

6.4.4. Tamaño de la muestra

Dos ratones C57/BL6 machos, en un rango de 2 a 7 meses de 23 y 35g de peso.

6.5. Técnicas y procedimientos

6.5.1. Fase de entrenamiento general

El ratón se pesó e identificó. Posteriormente se inició la “restricción de agua”, proporcionando sólo 1 ml diario, lo cual corresponde al 35% del consumo de agua *ad libitum*.

Tres días posteriores a la restricción de agua, comenzamos la manipulación del sujeto experimental, con el objetivo de que este explorara los diversos elementos que conforman la caja de entrenamiento y se acostumbrara al manejo del experimentador. Los ratones jamás se tomaron de la cola, esto con el objetivo de reducir altamente sus niveles de estrés (Hurst y West, 2010).

En el día 1, tomamos al ratón durante periodos de 10-15 minutos, enseguida ofrecimos recompensas de agua de 0.2 ml y posteriormente dejamos que explorara el tubo de acrílico, sin forzarlo. Repetimos este procedimiento de 4 a 5 veces. En el día 2, continuamos con el mismo procedimiento del día uno. Al tercer día, introducimos al ratón en la caja de aislamiento con recompensas de agua o agua azucarada (0.2 ml, hasta completar 1 ml). Al cuarto día, repetimos los procedimientos del tercer día.

Posteriormente, continuamos con el entrenamiento de la tarea de discriminación auditiva. Esta tarea consistió en presentar al ratón un estímulo auditivo de diferentes intensidades y darle una recompensa de 6.25 μ l de agua, solo en el caso de identificar la ocurrencia de dicho estímulo. Lo anterior, con el objetivo de determinar la intensidad a la cual el ratón no tiene respuesta ante el estímulo, y

repetimos el protocolo aleatorizando las diferentes intensidades a presentar y hasta completar 1ml.

Durante todo el proceso de restricción de agua los ratones se calificaron con la tabla de evaluación de salud y el diagrama de flujo (Anexo 12.1) para prevenir y evitar deshidratación en cualquiera de los sujetos de experimentación.

6.6. Estandarización de los programas computacionales y estímulos auditivos

Se creó un programa computacional para la tarea de discriminación auditiva de los sujetos experimentales, por medio del sistema algebraico computacional *MATLAB*. Dicho programa, comandó a una placa de desarrollo de *hardware ARDUINO*. Los estímulos a discriminar consistieron de una frecuencia de 2500 Hz y una duración de 75 ms. El código del programa incluyó el control de la recompensa, que consta en la apertura de una válvula solenoide (*Cole-Parmer*), normalmente cerrada, durante 8ms y lo cual equivale al suministro de 6.25 μ l de líquido. Asimismo, dicho código, permitió el control de aplicación de los respectivos tonos de inicio de prueba, tono de acierto, tono de castigo y la presentación del estímulo tipo ruido blanco.

6.7. Prueba conductual

Los sujetos experimentales se colocaron en una caja de entrenamiento de acrílico transparente (35cm x 25cm x 30cm). Dentro de esta caja, se incluyó un sistema de restricción de movimiento, el cual consta de un tubo de acrílico de 38.1 mm de diámetro, con un corte longitudinal de 20 mm. Dentro de dicho tubo se colocó una palanca de acero inoxidable de una longitud de 25 milímetros, colocada de forma longitudinal al tubo. Finalmente, se colocó un puerto de recompensa, el cual consistió de un sensor óptico de barrera y una boquilla de 1.5 mm de acero inoxidable conectada a la válvula solenoide normalmente cerrada (*Cole-Parmer*).

6.4.2. Prueba conductual de discriminación de tonos puros

En la Fase 1, se llevó a cabo la adecuación del sujeto experimental (*Véase* Fase de Entrenamiento general), para que este explorara la caja y todos sus elementos.

En la Fase 2, se colocaron reforzadores en el *operandum*, para facilitar la acción de éste, así como el reforzamiento de las conductas que semejan la conducta final. La proporción activación del *operandum* y recompensa fue 1:1. Cada activación del *operandum* corresponde a la activación de la válvula solenoide normalmente cerrada (*Cole-Parmer*), durante 8 ms, correspondientes a la administración de 6.25 µl, de agua acompañados de un tono de recompensa (4500 Hz, 50 ms).

En la Fase 3, se introdujo a la primera acción del *operandum* un tono que indicará el inicio de la prueba de discriminación auditiva (2500 Hz, 100 ms). Seguido

de ésta acción, se introdujo el estímulo auditivo (5000 Hz, 66 dB, 75 ms). La segunda acción del *operandum*, corresponde a la activación de la válvula solenoide normalmente cerrada (*Cole-Parmer*), durante 8 ms, correspondientes a la administración de 6.25 µl de agua acompañados de un tono de recompensa (4500 Hz, 50 ms).

En la Fase 4, introducimos una ventana de respuesta que corresponde al intervalo de tiempo transcurrido desde la presentación del estímulo hasta la posible segunda acción del *operandum*. Si el sujeto experimental accionaba el *operandum* durante dicha ventana, ésta activaría la válvula solenoide normalmente cerrada (*Cole-Parmer*), durante 8 ms, correspondientes a la administración de 6.25 µl de agua acompañados de un tono de recompensa (4500 Hz, 50 ms). En caso contrario, se introdujo un tono de error (4500 Hz, 63.6 dB, 1s) y un retraso en el reinicio de la prueba (2 segundos).

En las fases siguientes definimos las variables (GO-NoGO) introduciendo estímulos de mayores decibeles como la condición GO (53 y 61 dB) y de menores decibeles como la condición NO-GO (42 Y 50 dB). De ésta forma nos fue posible construir curvas psicofísicas.

7. Análisis de datos

De la primera y segunda fase experimental obtuvimos la duración del sujeto dentro de la caja experimental, así como las trayectorias que realizó. Asimismo, se

obtuvieron las latencias de la activación del *operandum*, y se compararon con las de la sesión del día siguiente.

De la Fase 3, obtuvimos la duración del sujeto experimental durante la sesión en la caja de entrenamiento y se obtuvo el valor en porcentaje del desempeño de la prueba, lo que corresponde a la activación del *operandum* dentro de la ventana de tiempo establecida.

De la Fase 4 y sub-fases, determinamos los porcentajes del desempeño del sujeto durante la prueba de discriminación auditiva por cada nivel de estímulo, incluyendo las respuestas que corresponden a los estímulos NO-GO, lo que permitió la construcción de curvas psicométricas.

7.1. Diseño estadístico

Para probar alguna diferencia significativa en la *Discriminación auditiva de tonos puros*, cuantificamos los distintos *Tiempos de palanqueo* y los comparamos en distintos días. Debido a que nuestros datos no se distribuyeron normalmente (Prueba Kolmogorov-Sminov, $P < 0.05$), y no mostraron homogeneidad en su varianza (Prueba de Levene, $P < 0.05$), realizamos la prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis, bajo la hipótesis nula que las diferencias en las variables dependientes fueron las mismas. Posteriormente, aplicamos varias pruebas *post hoc* U de Mann-Whitney

y empleamos la corrección de Bonferroni. Todos los efectos fueron reportados como significativos si $P < 0.0014$.

7.2. Hipótesis estadística

H₁: El desarrollo e implementación de un sistema de adecuación y el entrenamiento de ratones en libre movimiento generan herramientas y datos experimentales para el estudio del aprendizaje y la vía auditiva de los sujetos experimentales.

H₀: El desarrollo e implementación de un sistema de adecuación y el entrenamiento de ratones en libre movimiento no generan herramientas y datos experimentales para el estudio del aprendizaje y la vía auditiva de los sujetos experimentales.

8. Logística

8.1. Recursos humanos

- 1) Un experimentador.
- 2) Dos especialistas en los temas para supervisar los experimentos.

8.2. Recursos materiales

- 1) Cuarto aislado con las condiciones necesarias para el mantenimiento de los ratones (control de humedad, control de temperatura, ciclo luz-oscuridad de 12 horas).
- 2) Computadora con el *software* algebraico computacional *MATLAB*.
- 3) *Software SOLID-WORKS* para el diseño de piezas en 3D.
- 4) Bocinas para la presentación de estímulos.
- 5) Material de acrílico para la construcción de la caja de condicionamiento, tubo de 38.1 mm de diámetro.
- 6) Tarjeta de *hardware ARDUINO*.

- 7) Sensores Opto-acopladores de Barrera.
- 8) Palanca de acero inoxidable.
- 9) Válvula solenoide normalmente cerrada (*Cole-Parmer*).
- 10) Material quirúrgico para ratón.

8.3. Recursos financieros

Para la realización de este estudio no se requirieron recursos financieros, ya que los recursos materiales fueron provistos por el Laboratorio de Neurofisiología Integrativa del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Asimismo, los ratones fueron brindados por el bioterio Claude-Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

9. Resultados

9.1 *Hardware*

Se equipó y adaptó una habitación en el laboratorio de Neurofisiología Integrativa, la cual cuenta con material de aislamiento acústico, así como control de temperatura mantenida a 23°C y humedad al 20%. Dicha habitación se iluminó independientemente, manteniendo un ciclo de luz-oscuridad 12am-12pm (todos los experimentos se realizaron durante la fase oscura, en un horario de 8 am a 11 am).

El sistema de entrenamiento de ratones en libre movimientos se desarrolló con el *software* “SolidWorks” CAD (diseño asistido por computadora, por sus siglas en inglés) para modelado mecánico en 2D y 3D. Construimos una caja de condicionamiento operante con las medidas (30x35x25 cm) ([Figura 8](#)), y un tubo de acrílico de 38.1mm. Lo anterior, para la adecuación del sujeto experimental al condicionamiento, el facilitamiento del entrenamiento del sujeto y para brindar soporte. En dicho tubo se encuentra una palanca de acero inoxidable de una longitud de 30 milímetros y a ~15 mm de las extremidades anteriores del sujeto experimental.

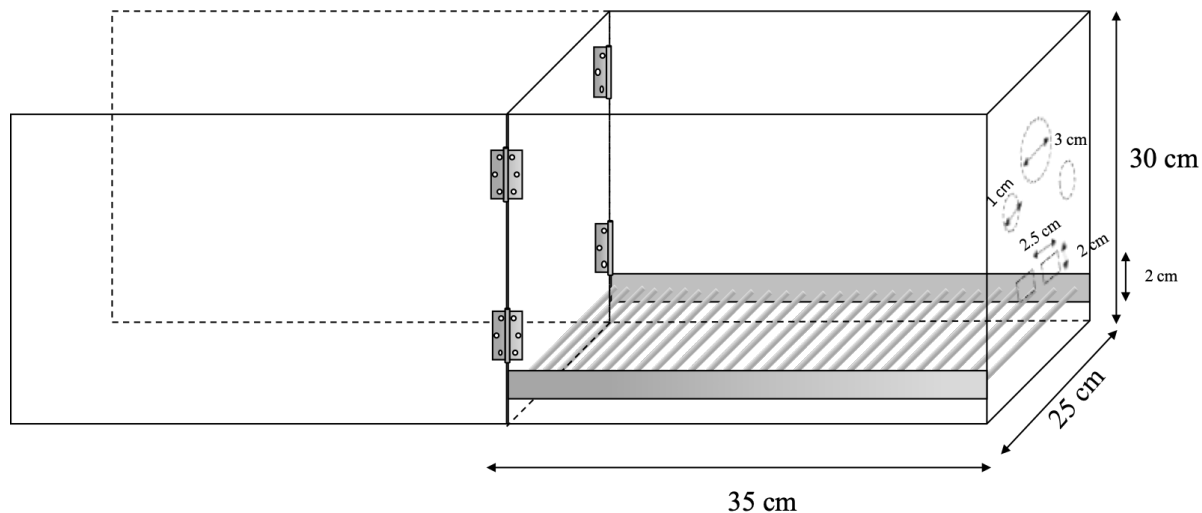


Figura 8. Diseño de caja de Skinner o caja de condicionamiento operante para experimentos de ratón en libre movimiento.

Para la administración automatizada de recompensa (agua), se usó una válvula solenoide normalmente cerrada operada por un circuito electrónico que se muestra en la [Figura 9](#). Su funcionamiento se basa en el hecho de que la válvula solenoide se abre al cargarse por una fuente de 12 volts. Se requiere, por lo tanto, un circuito electrónico que acople la señal proveniente del Arduino (5 volts) con la etapa de potencia (12 volts) que permitirá al solenoide conmutar entre abierto y cerrado.

El circuito funciona de la siguiente manera: en el momento en que el *ARDUINO* comande un 1 lógico en el pin Digital 5 (D5) activará al LED del integrado PS817C, el cual es un opto-acoplador integrado. Enseguida, envía una señal luminosa a la base del fototransistor, el cual está conectado a la base del Transistor BJT 2n2222 y a la base del transistor de potencia TIP 35C. La activación de éstos produce la energización del solenoide, y subsecuentemente el paso de agua a través de la cánula. Por lo que, la activación se hará en cascada.

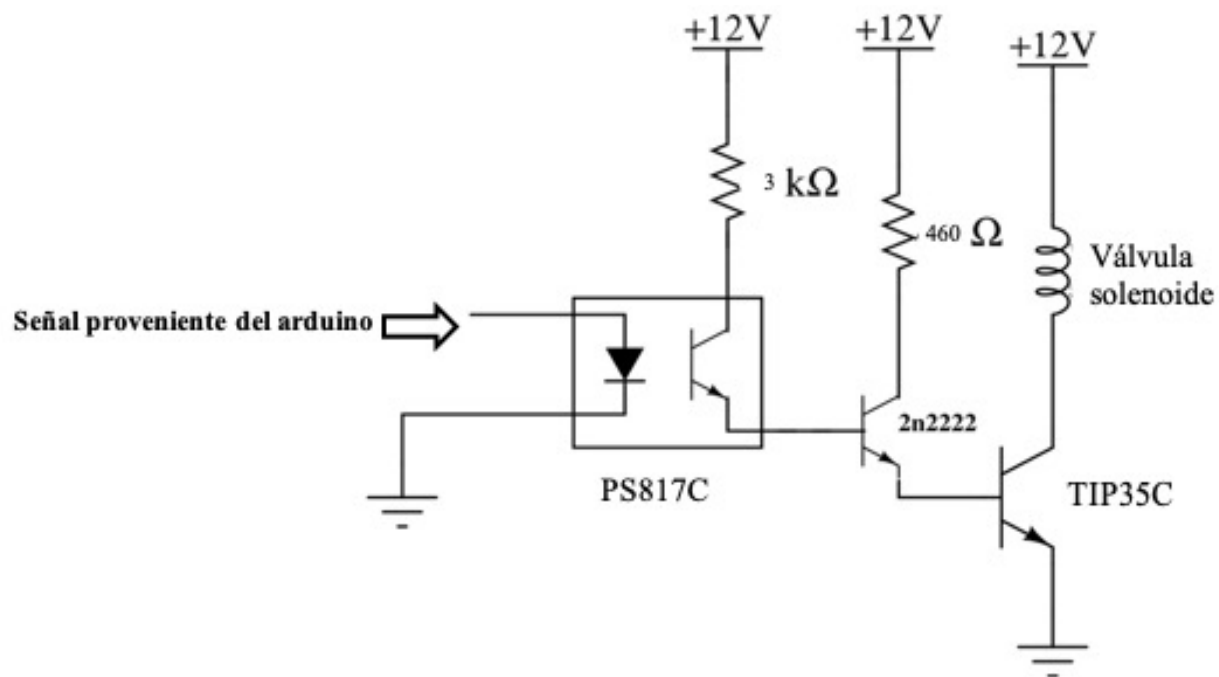


Figura 9. Circuito electrónico para la automatización de la administración de la recompensa controlada por una válvula solenoide *Cole-Parmer*.

A su vez, se habilitó un puerto de recompensa o “lickport” que está constituido por un cilindro de acero inoxidable de 1.5 mm de diámetro, conectado a la válvula solenoide. Éste se colocó aproximadamente a 0.5 mm del labio inferior del sujeto, cuando este permaneció dentro del tubo.

Para construir el sistema de liberación de recompensa adaptamos a la válvula solenoide a una cánula de 4 mm de diámetro. Dicha cánula estaba conectada a un depósito de líquido a una altura de 2.15 m y al *lickport* de acero inoxidable de 2.5 mm de diámetro. Obedeciendo la ecuación de Bernoulli el flujo volumétrico en su parte terminal fue de $2.188 \times 10^{-5} \text{ m}^3/\text{s}$

Controlamos el sistema con una placa de *Hardware ARDUINO -UNO*, la cual se conectó a la interfaz de una computadora con el *software MATLAB*, a través de la paquetería “*MATLAB- ARDUINO*” (*Arduino Support from MATLAB*). En la placa *ARDUINO* habilitamos tres salidas y dos entradas digitales. Las tres salidas corresponden a la alimentación de 5 Volts de la palanca, al circuito electrónico para la válvula solenoide y a la alimentación de la recompensa manual. Las entradas digitales corresponden a la lectura de la activación de la palanca, de la recompensa manual y los dos opto-acopladores de barrera, los cuales se localizan en la porción central del tubo de acrílico, y el otro en el puerto de recompensa.

Además, colocamos el sistema computacional en una habitación donde tuvimos control total del experimento y ajena de la habitación de experimentación. Asimismo, se colocó un botón de recompensa manual, que permitió al experimentador reforzar la conducta tras la correcta realización de la tarea discriminativa. En ésta disposición se logró evitar cualquier interferencia con las sesiones experimentales. En la [Figura 10](#) se muestra el diseño y montaje para la realización de los experimentos cognitivos conductuales.

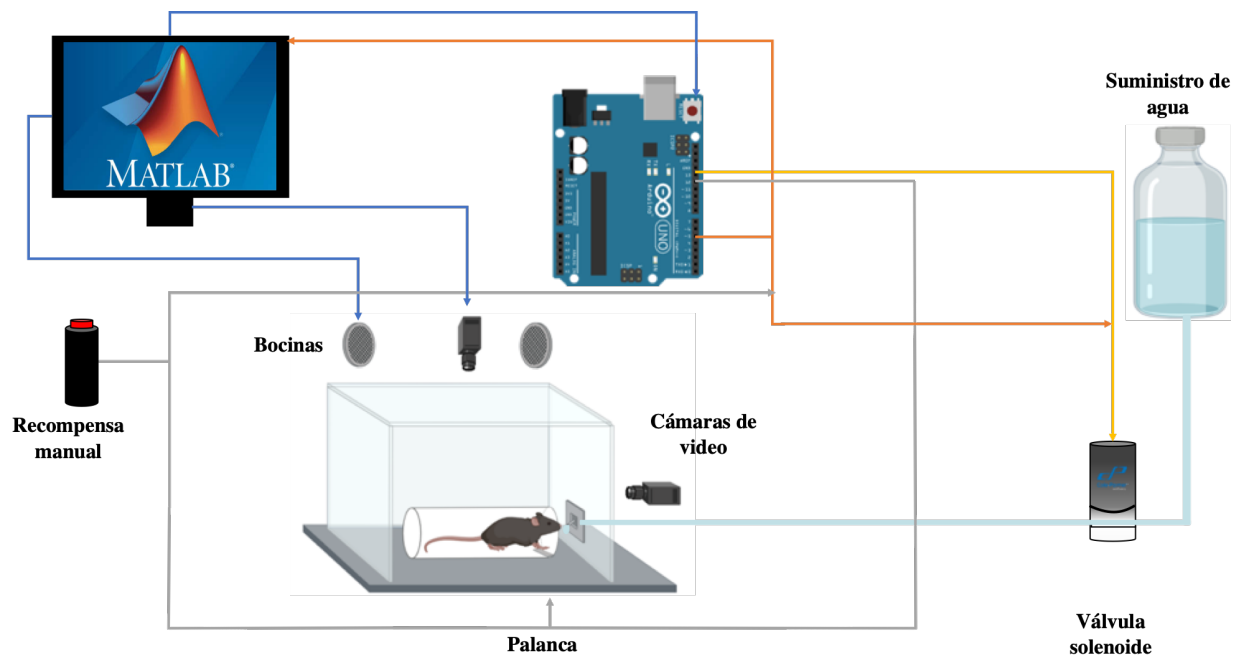


Figura 10. Representación general del diseño y montaje de la tarea cognitivo-conductual de ratones C57/BL6. El montaje incluye una computadora que contiene códigos programados en el sistema computacional *MATLAB*, que a su vez mandan señales por los canales digitales de una placa *ARDUINO-UNO* para controlar el suministro de recompensa a través de la válvula solenoide y registrar las señales de la palanca dadas por el sujeto experimental.

9.2 Software

En el *software* de sistema algebraico computacional (*MATLAB*), programamos una serie de códigos en combinación con la placa de desarrollo de *hardware* (*ARDUINO*), gracias a la paquetería de *MATLAB- ARDUINO*.

Por otra parte, se habilitó un canal digital de recompensa manual, el cual, permitió tener control externo sobre la recompensa en tiempo real del sujeto experimental. Debido a la combinación de dichas herramientas, logramos controlar los aspectos que son necesarios para el aprendizaje asociativo y el condicionamiento de los ratones de la cepa C57BL/6.

Para la grabación y monitoreo de todas las sesiones experimentales se utilizó el *software* OBS, el cual es un paquete de *software* gratuito y de código abierto para grabación y transmisión en vivo. OBS nos proporcionó captura en tiempo real de fuentes y dispositivos, composición de escenas, codificación, grabación y transmisión.

9.2.1 Tarea de discriminación auditiva. Tonos puros

La tarea de discriminación auditiva de tonos puros hace referencia a la tarea en la cual el sujeto experimental debe responder con la activación de la palanca u *operandum* ante la presencia de estímulos auditivos de la misma frecuencia (2500 Hz) pero de distintas intensidades en decibeles (42, 51, 53 y 61 dB). Para esto se propuso una tarea GO-NoGO, en la cual el sujeto al categorizar el estímulo como un tono de intensidad alta, debe activar el *operandum* (condición GO). En cambio, si el estímulo se categoriza de intensidad baja, el ratón no debe responder y no se activa el *operandum* (condición No-GO).

Como resultado de esta tesis proponemos un protocolo experimental dividido en 5 fases de entrenamiento: **1)** Fase 0 de entrenamiento, la cual corresponde a los días de adecuación del sujeto experimental al experimentador. En dicha fase se toma al ratón por intervalos de tiempo de 10 a 15 minutos, (Véase Fase de Entrenamiento General, Sección 6.5.1). Posteriormente, el ratón se indentifica, se pesa y se inicia la “restricción de agua”. Proporcionamos sólo 1 ml diario, lo cual corresponde al 35% del consumo de agua *ad libitum*. **2)** Fase 1 de entrenamiento, que corresponde a la asociación del *operandum* o palanca con la recompensa. **3)** Fase 2, asociación de los *cues* auditivos de inicio de la prueba. **4)** Fase 3 de entrenamiento, introducción del estímulo auditivo discriminativo. **5)** Fase 4 de entrenamiento, aprendizaje de las condiciones GO-NoGO.

También presentamos como resultado un programa computacional para el control del protocolo experimental (Figura 11). Dicho programa es intuitivo, y es muy fácil de modificar, en caso de que se requiera modificar aspectos de la tarea de discriminación auditiva. Dichos cambios solo comprenden al número de ensayos por sesión experimental y los niveles auditivos que el ratón tendrá que discriminar en las fases correspondientes.

Figura 11. Código del programa para el control de la tarea discriminativa de tonos puros. Dicho código, permite modificar el número de ensayos en la línea 2, o los

```

1 function datos_experimento = DiscriminacionAuditivaFaseUno(control_arduino, N)
2 % Inicializar tiempos
3   iniciot = GetSecs();
4
5
6 % Inicializar Variables
7   inicio_prueba = nan(1,N);
8   PsychPortAudio('Open',5);
9
10 % Crear boton de terminacion de ejecucion prematura
11   fig_handle = botonTerminarEjecucion();
12   drawnow;
13   clc;
14
15   disp('Inicio Discriminación Auditiva Fase 1:');
16   disp(' ');
17
18 % Inicio Prueba
19   for nprueba = 1:N
20     presiono_palanca = 0;
21
22     while presiono_palanca == 0
23       %Checar estado de la palanca
24
25       presiono_palanca = control_arduino.readDigitalPin('D3');
26       [keyIsDown, ~, ~] = KbCheck;
27       %Recompensa manual
28
29
30       if presiono_palanca || keyIsDown == 1
31         % Tiempo de palanqueo
32         inicio_prueba(nprueba) = GetSecs() - iniciot;
33
34         % Tono correcto
35         Beeper(3000, 0.2, 0.05);
36         pause(0.2);
37         Beeper(3000, 0.2, 0.05);
38
39         % Dar recompensa
40         control_arduino.writeDigitalPin('D5', 1);
41         pause(0.05);
42         control_arduino.writeDigitalPin('D5', 0);
43         presiono_palanca = 1;
44         % Pausa de reinicio de prueba
45         pause(0.5);
46
47         disp(['N:' num2str(nprueba) '/' num2str(N) ' T:' num2str(inicio_prueba(nprueba)) ' [' datestr(datetime(), 'HH:MM:SS')
48         end
49
50         % Boton presionado
51         drawnow;
52         if fig_handle.UserData == 1
53           break;
54         end
55
56       end
57
58       % Boton presionado
59       if fig_handle.UserData == 1
60         break;
61       end
62     end
63   end

```

niveles de discriminación, así como describir las fases de entrenamiento y comandarlas.

Una vez que iniciamos el código controlador del protocolo, al experimentador se le presenta en la parte inferior derecha los datos que aparecen en la [Figura 12](#), los

cuales tendrá que completar. Dichos datos comprenden el nombre con el que se identifica el sujeto experimental y la fase de entrenamiento en la que se encuentra. De ésta forma, el código controlador compila a su vez al código de la fase experimental que desea realizar. Posteriormente, el experimentador debe pulsar la tecla “Enter”, y de ésta forma, comienza el protocolo experimental.

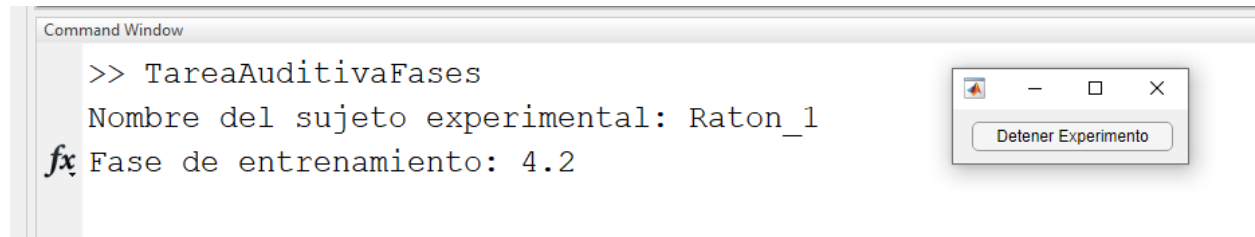
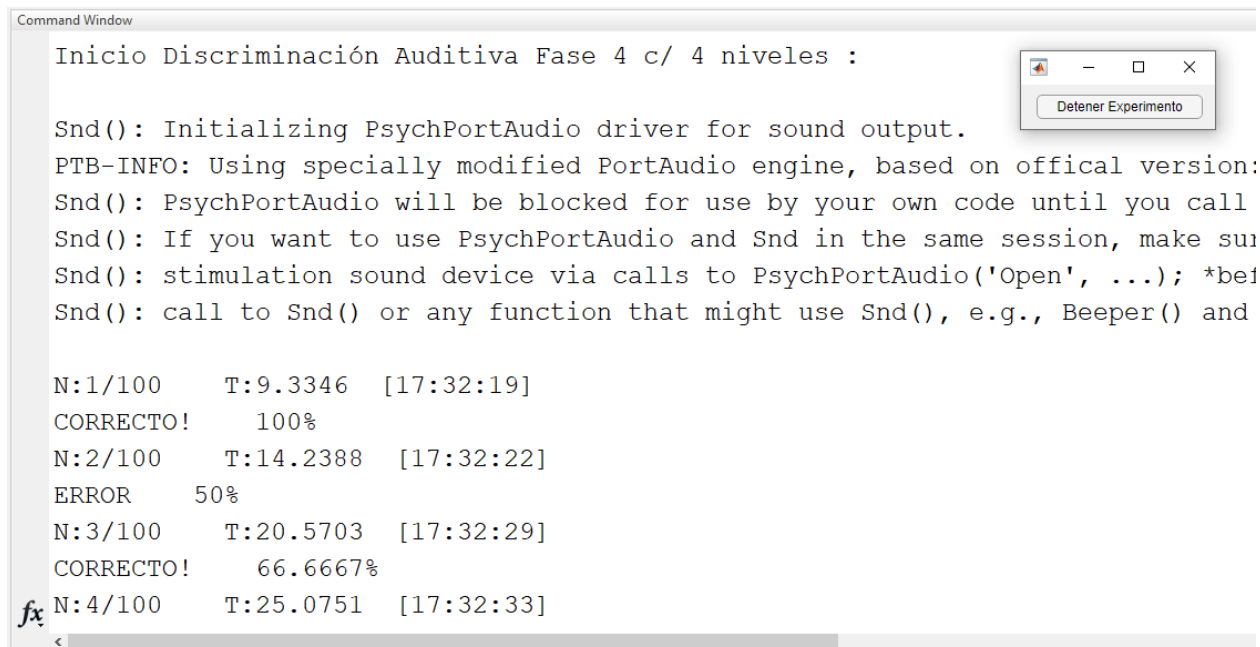


Figura 12. Pre-inicio de la tarea de discriminación auditiva de tonos puros, en la que se le pide al experimentador el nombre del sujeto experimental y la selección de la fase de entrenamiento en la que se encuentra el sujeto experimental.

Ante cada palanqueo, al experimentador se le mostrará en la parte inferior derecha cada una de las respuestas del sujeto experimental. Esto permite monitorear en tiempo real si el sujeto experimental emitió una respuesta correcta o incorrecta, así como el tiempo preciso en el que ocurre cada una de ellas. Dicha representación se muestra en la [Figura 13](#).



```
Command Window

Inicio Discriminación Auditiva Fase 4 c/ 4 niveles :

Snd(): Initializing PsychPortAudio driver for sound output.
PTB-INFO: Using specially modified PortAudio engine, based on offical version:
Snd(): PsychPortAudio will be blocked for use by your own code until you call
Snd(): If you want to use PsychPortAudio and Snd in the same session, make sur
Snd(): stimulation sound device via calls to PsychPortAudio('Open', ...); *be
Snd(): call to Snd() or any function that might use Snd(), e.g., Beeper() and

N:1/100      T:9.3346  [17:32:19]
CORRECTO!    100%
N:2/100      T:14.2388 [17:32:22]
ERROR        50%
N:3/100      T:20.5703 [17:32:29]
CORRECTO!    66.6667%
fx N:4/100    T:25.0751 [17:32:33]
```

Figura 13. Inicio de la prueba de *Discriminación Auditiva de Tonos puros* en la que se muestra en tiempo real las respuestas producidas y el porcentaje de aciertos del sujeto experimental, en este caso ratones de la cepa C57/BL6.

Al concluir el número de ensayos preestablecido, el código se detendrá automáticamente con el siguiente mensaje: “*sesión experimental terminada*”. Si el sujeto experimental no abre antes al programa, se crea una carpeta automáticamente con el nombre con el que se identifica el sujeto experimental. Dentro de ésta carpeta se generará un archivo *.mat* con el formato siguiente y sin espacios: *Nombre del sujeto experimental, fase de entrenamiento en la que se colocó al sujeto y fecha en que se realizó la sesión experimental (año, mes, día, hora, minuto, segundo)*.

Si por cualquier motivo la sesión experimental debe interrumpirse antes de que el sujeto experimental concluya los ensayos preestablecidos, solo se da *clic* en el botón de término de la sesión experimental, el cuál se muestra en la [Figura 12](#) y [Figura 13](#). Lo anterior, permite al experimentador cerrar de manera ordenada, así como, registrar y guardar cada una de las variables que se emitieron hasta ese momento.

9.2.2 Programación del *software* de entrenamiento

9.2.2.1 Código de la Fase 1

La proporción de activación del *operandum* y recompensa se programó 1:1. Es decir, cada activación del *operandum* corresponde a la activación de la válvula solenoide normalmente cerrada (*Cole-Parmer*) durante 8 ms. Esto corresponde a la administración de 6.25 µl de agua acompañados de un tono doble de recompensa (3000Hz, 50 dB, 50 ms). Un fragmento del *script* se muestra en la [Figura 14](#). El código registra y almacena automáticamente cada una de las respuestas emitidas por el sujeto experimental.


```

1 % Parametros fijos
2 N = 400;
3 directorioGuardado = 'C:\Users\Estudiante\Desktop\DatosDiscriminacionAuditiva';
4 recompensaManual=[KbName('r')];
5 RestrictKeysForKbCheck(recompensaManual);
6
7
8 % Inicializar Arduino y palanca
9 control_arduino = arduino;
10 control_arduino.writeDigitalPin('D12', 1);
11
12 % Datos experimento
13 nombre_animal = input('Nombre del sujeto experimental: ', 's');
14
15 fase_entrenamiento = 0;
16 tipofases = [1 2 3 4.1 4.2 4.3];
17
18 while ~ismember(fase_entrenamiento, tipofases)
19     fase_entrenamiento = input('Fase de entrenamiento: ');
20 end
21
22 % Checar que fase es
23 switch fase_entrenamiento
24     case 1
25         datos_experimento = DiscriminacionAuditivaFaseUno(control_arduino, N);
26     case 2
27         datos_experimento = DiscriminacionAuditivaFaseDos(control_arduino, N);
28     case 3
29         datos_experimento = DiscriminacionAuditivaFaseTres(control_arduino, N);
30     case 4.1
31         min_volumen = 0.0003;
32         max_volumen = input('Volumen Maximo: ');
33         lista_volumenes = [min_volumen max_volumen]; % 2 discriminantes/niveles
34         datos_experimento = DiscriminacionAuditivaFaseCuatro(control_arduino, N, lista_volumenes);
35     case 4.2 % 4 discriminantes/niveles
36         min_volumen = 0.0003;
37         max_volumen = 0.3;
38         discriminante_NoGo = 0.075;
39         discriminante_Go = 0.225;
40         lista_volumenes = [min_volumen discriminante_NoGo discriminante_Go max_volumen]; % 4 discriminantes/niveles
41         datos_experimento = DiscriminacionAuditivaFaseCuatro(control_arduino, N, lista_volumenes);
42     case 4.3 % 6 discriminantes/niveles
43         min_volumen = 0.0003;
44         max_volumen = 0.3;
45         discriminante_NoGo_1 = 0.075;
46         discriminante_NoGo_2 = 0.1125;
47         discriminante_Go_1 = 0.15;
48         discriminante_Go_2 = 0.225;
49         lista_volumenes = [min_volumen discriminante_NoGo_1 discriminante_NoGo_2 discriminante_Go_1 discriminante_Go_2 max_volumen];
50         datos_experimento = DiscriminacionAuditivaFaseCuatro(control_arduino, N, lista_volumenes);
51     case 4.4
52         lista_volumenes = []; % 8 discriminantes/niveles
53         datos_experimento = DiscriminacionAuditivaFaseCuatro(control_arduino, N, lista_volumenes);
54     case 4.5
55         lista_volumenes = []; % 10 discriminantes/niveles
56         datos_experimento = DiscriminacionAuditivaFaseCuatro(control_arduino, N, lista_volumenes);
57
58 end
59
60 % Checar ubicación de guardado de archivos
61 nombreArchivo = [nombre_animal ' fase' num2str(fase_entrenamiento) ' ' datestr(datetime(), 30) '.mat'];
62 carpetaGuardado = [directorioGuardado '\ ' nombre_animal '\'];
63
64 if ~isfolder(carpetaGuardado) % Crear carpeta si no existe
65     mkdir(carpetaGuardado);
66 end
67
68 % Guardar datos de la sesion
69 save([carpetaGuardado nombreArchivo], 'datos_experimento');

```

Figura 14. Fragmento del código fuente que se programó en el *software* algebraico computacional *MATLAB*. En la línea 25 se muestra la lectura que se obtiene de la activación de la palanca. En las líneas 40 y 42, se ilustran los comandos en los que la placa de *hardware ARDUINO* se comanda para la liberación de recompensa.

9.2.2.2 Código de la Fase 2

Después de la primera activación del *operandum*, adicionamos un estímulo auditivo que actúa como *cue*, o pista (2500 Hz, 100ms). Ello con el objetivo de que el sujeto experimental pueda identificar que se presentará el estímulo discriminatorio posterior a una pausa de 1.5s.

El sujeto experimental en ésta fase, identifica la primera activación del *operandum* como el inicio de la prueba. Enseguida, debe presionar la palanca una vez más. Después, se adiciona un tono doble de 3000 Hz, 50dB Y 50 ms, el cual se denominó tono de acierto, y se usó para el reforzamiento positivo de la conducta. En éste momento, el sujeto experimental también obtiene la recompensa correspondiente. A su vez, el ratón puede iniciar el siguiente ensayo después de una pausa de 250ms. En ésta fase la relación activación del *operandum* y recompensa es 2:1.

La Fase 2 de entrenamiento es crucial, ya que le otorga al sujeto experimental el poder absoluto de la presentación de ensayos. Esto debido a que el ratón inicia y responde a cada uno de éstos. Además, permite al experimentador registrar y guardar el momento preciso en que el sujeto experimental decide que se le presente el ensayo siguiente. Dándole así, completa autonomía al protocolo experimental ([Figura 15](#)).

```

1 function datos_experimento = DiscriminacionAuditivaFaseDos(control_arduino, N)
2     % Inicializar tiempos
3     iniciot = GetSecs();
4
5     % Inicializar Variables
6     inicio_prueba = nan(1,N);
7     inicio_tarea = nan(1,N);
8     inicio_estimulo = nan(1,N);
9     periodo_inicio = 1;
10    % PsychPortAudio('Open',5);
11
12    % Crear boton de terminacion de ejecucion prematura
13    fig_handle = botonTerminarEjecucion();
14    drawnow;
15    clc;
16
17    disp('Inicio Discriminación Auditiva Fase 2:');
18    disp(' ');
19
20    % Inicio Prueba
21    for nprueba = 1:N
22        presiono_palanca = 0;
23
24        while presiono_palanca == 0
25            %Checar estado de la palanca
26            presiono_palanca = control_arduino.readDigitalPin('D3');
27
28            if presiono_palanca == 1
29                if periodo_inicio == 1
30                    % Tiempo de palanqueo
31                    inicio_prueba(nprueba) = GetSecs() - iniciot;
32
33                    % Tono inicio
34                    Beeper(2500, 0.2, 0.075);
35
36                    % Pausa de reinicio de prueba
37                    pause(1.5);
38
39                    % Cambiar palanqueo a periodo de respuesta
40                    periodo_inicio = 0;
41                    presiono_palanca = 0;
42                    disp(['N:' num2str(nprueba) '/' num2str(N) ' T:' num2str(inicio_prueba(nprueba)) ' [' datestr(datetime(), 'HH:MM:SS') ' ]']);
43
44                    % Tono discriminativo
45                    inicio_estimulo(nprueba) = GetSecs() - iniciot;
46                    Beeper(5000, 0.3, 0.075);
47                else
48                    % Tiempo de palanqueo respuesta
49                    inicio_tarea(nprueba) = GetSecs() - iniciot;
50
51                    % Tono correcto
52                    Beeper(3000, 0.2, 0.05);
53                    pause(0.2);
54                    Beeper(3000, 0.2, 0.05);
55
56                    % Dar recompensa
57                    control_arduino.writeDigitalPin('D5', 1);
58                    pause(0.05);
59                    control_arduino.writeDigitalPin('D5', 0);
60
61                    % Cambiar palanqueo a periodo de inicio de prueba
62                    periodo_inicio = 1;
63                    disp('Correcto!');
64
65                    % Pausa de reinicio de prueba
66                    pause(0.25);
67                end
68            end
69        end
70    end

```

Figura 15. Fragmento del código fuente de la fase dos de entrenamiento en la que se destaca los siguiente: 1) el tono de inicio en la línea 34, 2) el tono de respuesta correcta en la línea 50 y 3) la pausa de reinicio de prueba en la línea 66.

9.2.2.3 Código de la Fase 3 de entrenamiento

Esta fase consiste en la adición de una ventana de tiempo de 1.5s posterior a la primera activación del *operandum*. Si después del primer palanqueo y del estímulo de inicio de la prueba, el sujeto experimental realiza el otro palanqueo dentro de la ventana de tiempo (1.5s), la activación del *operandum* corresponde a un acierto. Subsecuentemente, se libera la recompensa de agua correspondiente y el reforzador positivo del tono de acierto. En caso contrario, si el segundo palanqueo no se realiza dentro de la ventana de tiempo establecido, el ratón se refuerza negativamente con un tono de error establecido de (1500Hz, 55db, 1000ms) y la pausa de reinicio de la prueba aumentará (3.5s). Todos los datos correspondientes a aciertos o errores son registrados y guardados automáticamente en el momento en el que ocurren.

9.2.2.4 Código de la Fase 4 de entrenamiento

En la Fase 4 del código, además de todas las funciones anteriores, se adicionaron los estímulos auditivos discriminatorios, dicha fase se subdivide según los niveles que el experimentador decida presentarle al sujeto experimental.

En la Fase 4.1, se colocaron dos estímulos discriminativos: 1) un estímulo que corresponde a la condición GO (5000Hz, 61dB, 150ms) y 2) un estímulo correspondiente a la condición No-GO de (5000Hz, 42dB, 150ms). Si el sujeto experimental contesta correctamente; es decir, activa la palanca en la condición GO o no activa la palanca en la condición No-GO, se obtiene la recompensa correspondiente y se reproduce el tono de respuesta correcta (3000 Hz, 50dB, 50 ms)

que actúa como el reforzador positivo. En caso contrario, cuando el ratón activa la palanca en la condición No-GO, o no activa la palanca en la condición GO, el sujeto experimental recibe el tono que corresponde a una respuesta incorrecta (1500Hz, 55db, 1000ms) y la pausa de reinicio de la prueba aumenta a 3.5s.

La Fase 4.2 corresponde a la adición de dos estímulos más de discriminación: 1) uno en la condición GO de 5000Hz, 51dB, 150ms y 2) otro en la condición No-GO de 5000Hz, 53dB, 150ms. En ésta fase el ratón debe discriminar 4 distintos estímulos auditivos y categorizarlos. En caso de estar en un acierto, o un error, las condiciones previamente descritas se cumplen.

La Fase 4.3 agrega dos estímulos más al protocolo experimental, lo cuales se distribuyen en la condición GO y en la condición No-GO. En este momento, la prueba se convierte en la discriminación de seis niveles de discriminación.

Es importante señalar que todos los estímulos se presentan de manera aleatoria en cada una de las fases de entrenamiento del protocolo experimental. La adición de niveles de discriminación hace a la prueba cada vez más específica y permite estudiar la sensibilidad auditiva del sujeto experimental, ya que las variaciones entre los estímulos de discriminación pueden llegar a ser tan específicos como 2 dB. Lo anterior aumenta la complejidad de la prueba y permite responder preguntas cada vez más complejas de la vía auditiva.

De manera interesante, la facilidad y autonomía del programa le da completo poder al experimentador de modificar el protocolo experimental. Le permite adicionar hasta 10 niveles de discriminación con diferencias específicas de la

intensidad de sonido. Así también, cada una de las especificaciones descritas con anterioridad pueden enfocarse de manera diferencial a la pregunta experimental.

9.2.3 *Software de análisis de datos.*

Para el análisis de los datos correspondientes a los protocolos experimentales se diseñaron dos programas, uno para la prueba de discriminación de tonos puros y el segundo para la tarea de discriminación ruido-tonos. Lo cual, permiten al experimentador automatizar y analizar cada una de las sesiones experimentales de una manera práctica y sencilla. Además, visualizar de manera gráfica cada una de las sesiones experimentales.

El análisis de la prueba de discriminación auditiva de tonos puros se realizó al pulsar en el programa correspondiente. Dicho programa se muestra en la [Figura 16](#). Posteriormente, el programa desplegó una carpeta en la que se encuentran todas las sesiones experimentales que se realizaron. Dependiendo de la fase experimental en la que se encuentra, el programa hizo lo siguiente. Si la sesión experimental a analizar se encontraba en las fases 1 y 2, simplemente se graficaron los datos correspondientes al tiempo de activación del *operandum*, así como, la duración de toda la sesión experimental. Si la prueba se terminó o interrumpió, se mostró la activación de la recompensa emitida por el experimentador, o recompensa manual. Es decir, si las respuestas se realizaron dentro de la ventana de tiempo preestablecida. El análisis de la fase 3 consistió en el registro de los tiempos de activación y del porcentaje de desempeño que el ratón obtuvo en la sesión experimental. El análisis de la fase 4 correspondió a la obtención de las gráficas de la sesión experimental. Así como, el ajuste de la línea para la construcción de las curvas psicofísicas. Ajustamos todos los datos a una distribución Weibull.

Para el análisis de la prueba de discriminación tono-ruido, programamos en el mismo *software* de la tarea. Obtuvimos la curva en tiempo real y construimos las curvas psicofísicas ajustando los datos a una distribución Weibull.

```

1  %% Visualización desempeño discriminación auditiva
2  % Seleccionar datos a visualizar
3  [archivos_seleccionados, folder] = uigetfile('*.mat', 'Multiselect', 'on');
4  if ~iscell(archivos_seleccionados)
5      temp = archivos_seleccionados;
6      archivos_seleccionados = {};
7      archivos_seleccionados{1} = temp;
8  end
9
10 %% Cargar datos de los archivos
11 sub_dim = numSubplots(length(archivos_seleccionados));
12 for indice_archivo = 1:length(archivos_seleccionados)
13     archivo = fullfile(folder, archivos_seleccionados{indice_archivo});
14     load(archivo); % Variable: datos_experimento
15
16     % Calcular desempeño
17     niveles_estimulo = unique(datos_experimento.estimulos(~isnan(datos_experimento.estimulos)));
18     desempeno_tarea = splitapply(@nanmean, datos_experimento.respuestas, findgroups(datos_experimento.estimulos));
19     desempeno_tarea(niveles_estimulo < mean(niveles_estimulo)) = 1 - desempeno_tarea(niveles_estimulo < mean(niveles_estimulo));
20
21     % Calcular Weibull acumulada
22     fun = @(p_optim) (wblcdf(niveles_estimulo*1/max(niveles_estimulo), p_optim(1), p_optim(2))*p_optim(3)+p_optim(4))-desempeno_tarea;
23     p_optim0 = [0.5 5 1 0];
24     li = [0.25 1.5];
25     ls = [1 10];
26
27     p_optim = lsqnonlin(fun, p_optim0, li, ls);
28
29     xprueba = 0.001:0.01:1;
30     yprueba = (wblcdf(xprueba, p_optim(1), p_optim(2))*p_optim(3)+p_optim(4));
31
32     % Graficar desempeño
33     subplot(sub_dim(1), sub_dim(2), indice_archivo);
34     plot(xprueba, yprueba);
35     hold on
36     scatter(niveles_estimulo*1/max(niveles_estimulo), desempeno_tarea, 'filled');
37     % hold off;
38
39     xlabel('dB');
40     ylabel('Probabilidad de respuesta');
41
42     xticks([niveles_estimulo*1/max(niveles_estimulo)]);
43     xticklabels(niveles_estimulo);
44
45     xlim([min(niveles_estimulo*1/max(niveles_estimulo))-0.05, max(niveles_estimulo*1/max(niveles_estimulo))+0.05]);
46     ylim([-0.05, 1.05]);
47
48     th = title(archivos_seleccionados{indice_archivo});
49     th.Interpreter = 'none';
50 end

```

Figura 16. *Software* de análisis de datos. Se ilustra parte del código al ejecutar dicho programa dependiendo de la sesión experimental. Con este código se obtienen

gráficas de las curvas psicométricas correspondientes a la sesión experimental realizada.

9.3 Aprendizaje

La asociación de los estímulos del ambiente que llevan a una conducta deseada se considera como Aprendizaje asociativo (Gottlieb, 2012). Por lo cual, determinamos que los sujetos experimentales, tomando la tarea de *Discriminación Auditiva de tonos puros*, eran capaces de lograr éste tipo de aprendizaje, enfatizando que el proceso se lleva acabo desde las fases iniciales de nuestro protocolo experimental. Llevando así, el proceso de aprendizaje continuo y sin retrocesos, optimizando de esta manera el desempeño de los sujetos experimentales en el protocolo propuesto.

En la Fase 1, de asociación de la palanca con la recompensa, los sujetos experimentales fueron capaces de encontrar la palanca y su función en 4 ± 2 sesiones experimentales. En esta fase, los ratones realizaron 200 ensayos en hasta 5 minutos. La representación de la Fase 1 experimental se muestra en la [Figura 17](#).

Por otra parte, realizamos experimentos de *Discriminación auditiva de tonos puros* en dos ratones ($N= 2$), de los cuales obtuvimos un total de 3287 “*tiempos de palanqueos*” para la Fase 1 de entrenamiento (Ratón 1, $n= 1711$, Ratón 2, $n= 1576$) en 9 días, respectivamente.

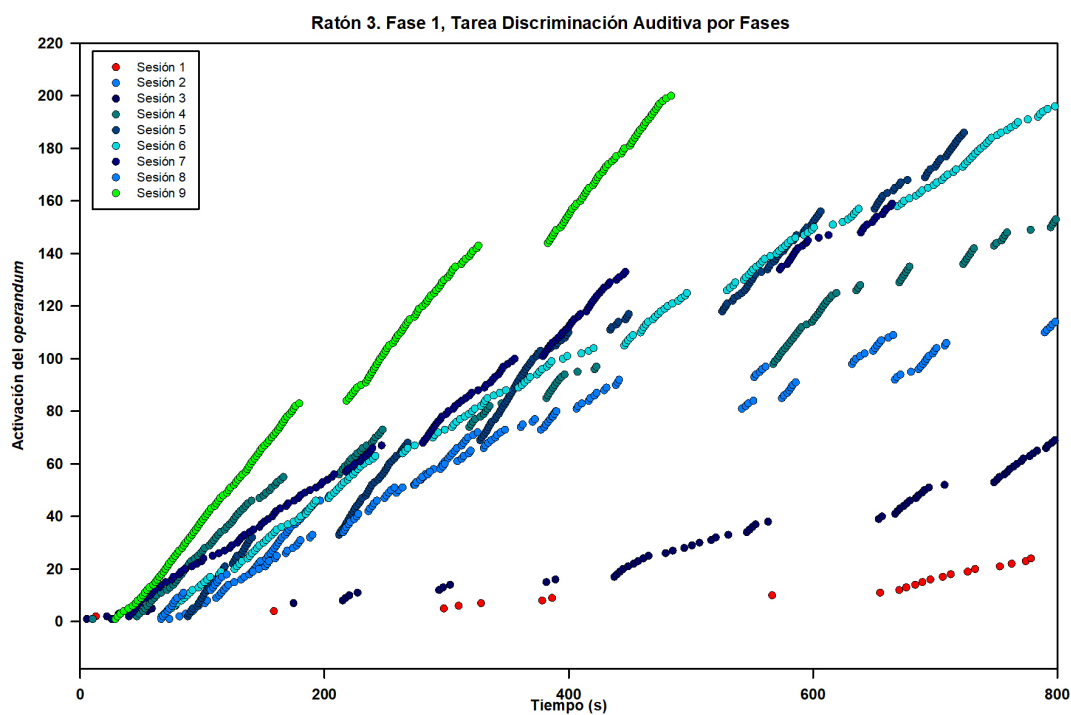
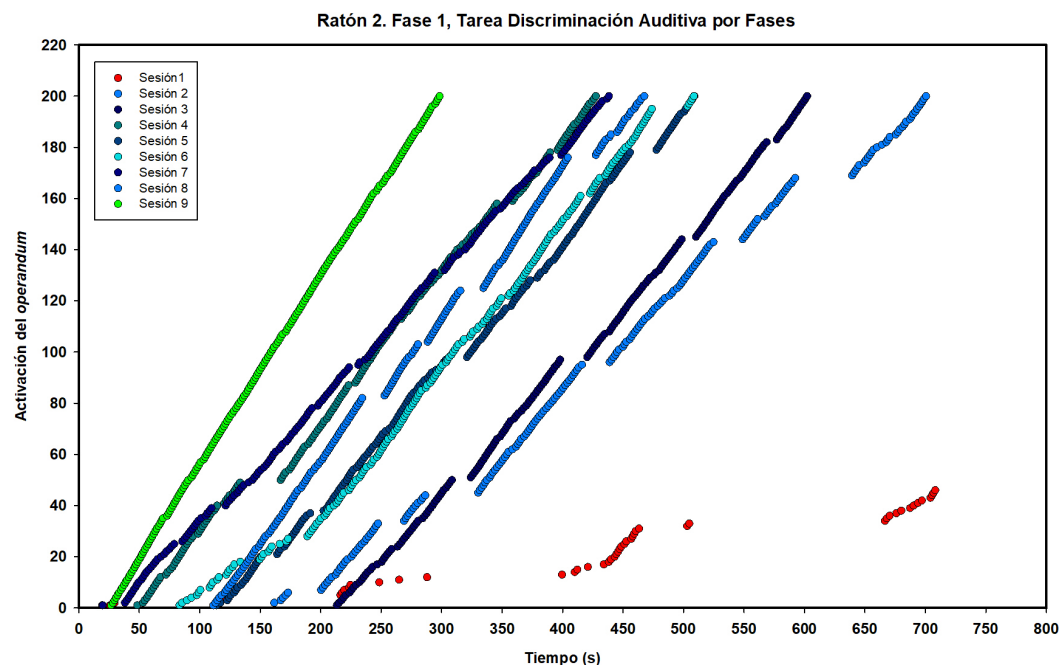


Figura 17. Fase 1 de la tarea de discriminación auditiva. Dichas gráficas muestran el tiempo total en realizar la prueba, desde la sesión 1 hasta la sesión 9. En las cuales se presentaron 200 ensayos al sujeto experimental.

Para los dos ratones, la prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis reveló diferencias estadísticamente significativas en los *Tiempos de palanqueos* en los distintos días de registro (**Ratón 1:** $H(8) = 683.31$, $P < 0.0001^{***}$, **Ratón 2:** $H(8) = 385.92$, $P < 0.0001^{***}$). Debido a éstas diferencias estadísticas, en cada sujeto realizamos varias pruebas no-paramétricas de U de Mann-Whitney para comparar los *Tiempos de palanqueos* correspondientes a cada día:

1 vs. 2 2 vs. 3, 3 vs. 4, 4 vs. 5, 5 vs. 6, 6 vs. 7, 7 vs. 8, 8 vs. 9,
 1 vs. 3, 2 vs. 4, 3 vs. 5, 4 vs. 6, 5 vs. 7, 6 vs. 8, 7 vs. 9,
 1 vs. 4, 2 vs. 5, 3 vs. 6, 4 vs. 7, 5 vs. 8, 6 vs. 9,
 1 vs. 5, 2 vs. 6, 3 vs. 7, 4 vs. 8, 5 vs. 9,
 1 vs. 6, 2 vs. 7, 3 vs. 8, 4 vs. 9,
 1 vs. 7, 2 vs. 8, 3 vs. 9,
 1 vs. 8, 2 vs. 9,
 1 vs. 9.

En el ratón 1, las comparaciones múltiples mostraron diferencias significativas entre **1vs. 2** ($U = 4355$, $z = -8.87$, $r = -0.5$, $P < 0.0001^{***}$), **1vs. 4** ($U = 6533$, $z = -11.65$, $r = -0.58$, $P < 0.0001^{***}$), **1vs. 5** ($U = 10860$, $z = -7.91$, $r = -0.4$, $P < 0.0001^{***}$), **1vs. 6** ($U = 10364$, $z = -8.34$, $r = -0.42$, $P < 0.0001^{***}$), **1vs. 7** ($U = 6360$, $z = -11.8$, $r = -0.59$, $P < 0.0001^{***}$), **1vs. 8** ($U = 8167$, $z = -10.24$, $r = -0.51$, $P < 0.0001^{***}$), **1vs. 9** ($U = 2265$, $z = -15.34$, $r = -0.77$, $P < 0.0001^{***}$), **2 vs. 3** ($U = 4104$, $z = -9.21$, $r = -0.52$, $P < 0.0001^{***}$), **2 vs. 4** ($U = 1602$, $z = -12.5$, $r = -0.71$, $P < 0.0001^{***}$), **2 vs. 5** ($U = 2549$, $z = -11.26$, $r = -0.64$, $P < 0.0001^{***}$), **2 vs. 6** ($U = 2449$, $z = -11.39$, $r = -0.65$, $P < 0.0001^{***}$), **2 vs. 7** ($U = 1587$, $z = -12.52$, $r = -0.71$, $P < 0.0001^{***}$), **2 vs. 8** ($U = 2023$, $z = -11.95$, $r = -0.68$, $P < 0.0001^{***}$), **2 vs. 9** ($U = 1009$, $z = -13.28$, $r = -0.75$, $P < 0.0001^{***}$), **3 vs. 4** ($U = 6290$, $z = -11.86$, $r = -0.59$, $P < 0.0001^{***}$), **3 vs. 5** ($U = 11257$, $z = -7.56$, $r = -0.38$,

$P < 0.0001, ***$), **3 vs. 6** ($U = 10760, z = -7.99, r = -0.4, P < 0.0001, ***$), **3 vs. 7** ($U = 6240, z = -11.9, r = -0.6, P < 0.0001, ***$), **3 vs. 8** ($U = 8394, z = -10.04, r = -0.5, P < 0.0001, ***$), **3 vs. 9** ($U = 1296, z = -16.18, r = -0.81, P < 0.0001, ***$), **4 vs. 5** ($U = 13196, z = -5.89, r = -0.3, P < 0.0001, ***$), **4 vs. 6** ($U = 13550, z = -5.58, r = -0.28, P < 0.0001, ***$), **4 vs. 9** ($U = 11372, z = -7.46, r = -0.37, P < 0.0001, ***$), **5 vs. 7** ($U = 12941, z = -6.11, r = -0.31, P < 0.0001, ***$), **5 vs. 9** ($U = 5899, z = -12.2, r = -0.61, P < 0.0001, ***$), **6 vs. 7** ($U = 13300, z = -5.8, r = -0.3, P < 0.0001, ***$), **6 vs. 9** ($U = 5886, z = -12.2, r = -0.61, P < 0.0001, ***$), **7 vs. 9** ($U = 12359, z = -6.61, r = -0.33, P < 0.0001, ***$), **8 vs. 9** ($U = 7838, z = -10.52, r = -0.53, P < 0.0001, ***$).

No así para, **1vs. 3** ($U = 18137, z = -1.61, r = -0.11, P = 0.108$), **4 vs. 7** ($U = 19442, z = -0.48, r = -0.02, P = 0.629$), **4 vs. 8** ($U = 16416, z = -3.1, r = -0.16, P = 0.002$), **5 vs. 6** ($U = 19445, z = -0.48, r = -0.02, P = 0.631$), **5 vs. 8** ($U = 16424, z = -3.09, r = -0.15, P = 0.002$), **6 vs. 8** ($U = 16880, z = -2.7, r = -0.14, P = 0.007$) y **7 vs. 8** ($U = 15933, z = -3.52, r = -0.18, P = 0.004$), (ver [Tabla 2](#)).

Por otra parte, en el ratón 2, las comparaciones múltiples mostraron diferencias significativas entre **1vs. 3** ($U = 2452, z = -5.42, r = -0.34, P < 0.0001, ***$), **1vs. 4** ($U = 1747, z = -6.98, r = -0.44, P < 0.0001, ***$), **1vs. 5** ($U = 1790, z = -6.88, r = -0.44, P < 0.0001, ***$), **1vs. 6** ($U = 1080, z = -6.71, r = -0.51, P < 0.0001, ***$), **1vs. 7** ($U = 2179, z = -6.02, r = -0.38, P < 0.0001, ***$), **1vs. 8** ($U = 3272, z = -3.6, r = -0.23, P < 0.0001, ***$), **1vs. 9** ($U = 1014, z = -8.6, r = -0.54, P < 0.0001, ***$), **2 vs. 3** ($U = 8397, z = -10.04, r = -0.5, P < 0.0001, ***$), **2 vs. 4** ($U = 5280, z = -12.73, r = -0.64, P < 0.0001, ***$), **2 vs. 5** ($U = 5037, z = -12.94, r = -0.65, P < 0.0001, ***$), **2 vs. 6** ($U = 3151, z = -11.46, r = -0.63, P < 0.0001, ***$), **2 vs. 7** ($U = 8239, z = -10.17, r = -0.51, P < 0.0001, ***$), **2 vs. 8** ($U = 14219, z = -5.00, r = -0.25, P < 0.0001, ***$), **2 vs. 9** ($U = 2215, z = -15.38, r = -0.77, P < 0.0001, ***$), **3**

vs. 8 ($U = 14314$, $z = -4.92$, $r = -0.25$, $P < 0.0001$,***), **3 vs. 9** ($U = 12103$, $z = -6.83$, $r = -0.34$, $P < 0.0001$,***), **4 vs. 8** ($U = 13435$, $z = -5.68$, $r = -0.29$, $P < 0.0001$,***), **4 vs. 9** ($U = 11267$, $z = -7.55$, $r = -0.38$, $P < 0.0001$,***), **5 vs. 8** ($U = 13101$, $z = -5.97$, $r = -0.3$, $P < 0.0001$,***), **5 vs. 9** ($U = 11384$, $z = -7.45$, $r = -0.37$, $P < 0.0001$,***), **6 vs. 8** ($U = 7593$, $z = -6.13$, $r = -0.34$, $P < 0.0001$,***), **6 vs. 9** ($U = 9156$, $z = -4.25$, $r = -0.24$, $P < 0.0001$,***), **7 vs. 8** ($U = 15388$, $z = -3.99$, $r = -0.2$, $P < 0.0001$,***), **7 vs. 9** ($U = 13279$, $z = -5.81$, $r = -0.3$, $P < 0.0001$,***), **8 vs. 9** ($U = 8698$, $z = -9.78$, $r = -0.49$, $P < 0.0001$,***).

No así para, **1vs. 2** ($U = 4707$, $z = -0.43$, $r = -0.03$, $P = 0.669$), **3 vs. 4** ($U = 17830$, $z = -1.88$, $r = -0.09$, $P = 0.061$), **3 vs. 5** ($U = 17564$, $z = -2.11$, $r = -0.11$, $P = 0.035$), **3 vs. 6** ($U = 10760$, $z = -2.33$, $r = -0.13$, $P = 0.02$), **3 vs. 7** ($U = 19335$, $z = -0.58$, $r = -0.03$, $P = 0.565$), **4 vs. 5** ($U = 19697$, $z = -0.26$, $r = -0.13$, $P = 0.793$), **4 vs. 6** ($U = 10995$, $z = -2.05$, $r = -0.11$, $P = 0.041$), **4 vs. 7** ($U = 19595$, $z = -0.35$, $r = -0.018$, $P = 0.726$), **5 vs. 6** ($U = 11235$, $z = -1.76$, $r = -0.09$, $P = 0.079$), **5 vs. 7** ($U = 19805$, $z = -0.17$, $r = -0.009$, $P = 0.866$) y **6 vs. 7** ($U = 11239$, $z = -1.75$, $r = -0.09$, $P = 0.08$), (ver [Tabla 2](#)).

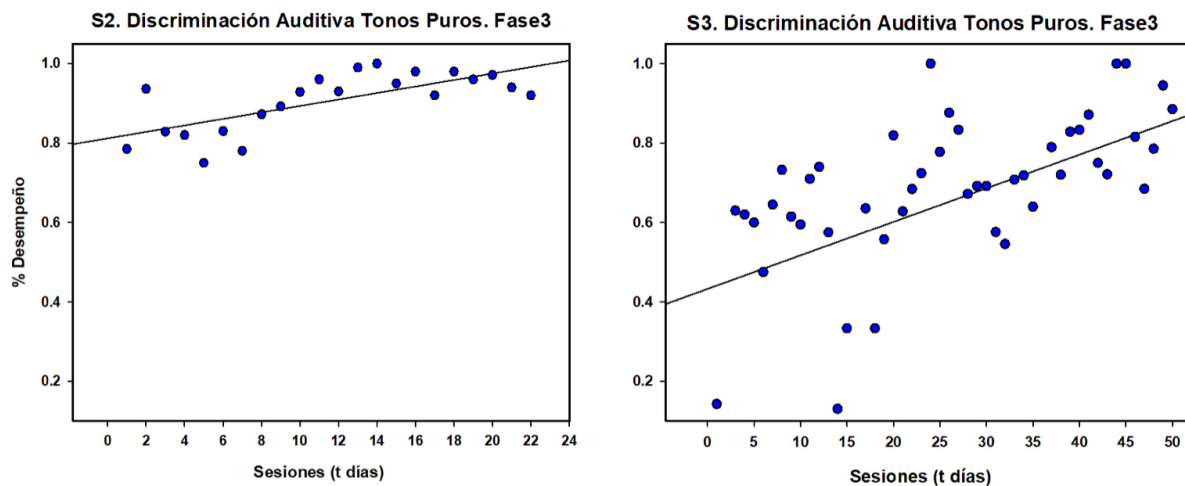
Con este análisis estadístico, demostramos que nuestro protocolo experimental desde fases iniciales y sin un gran número de sesiones, fue capaz de llevar a los sujetos experimentales a lograr el aprendizaje deseado. Además de responder a los estímulos con una alta eficacia y optimizando el tiempo total de la prueba. Logramos así, que el sujeto experimental no tuviera un decremento en el aprendizaje, ni en su desempeño en fases posteriores y cada vez más complejas como se describe a continuación.

Prueba <i>post hoc</i> U de Mann-Whitney (<i>P</i>)									
Ratón 1									
Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		0.0001	0.107	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
2			0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
3				0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
4					0.0001	0.0001	0.629	0.002	0.0001
5						0.631	0.0001	0.002	0.0001
6							0.0001	0.007	0.0001
7								0.004	0.0001
8									0.0001
9									
Ratón 2									
Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		0.669	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
2			0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
3				0.061	0.035	0.02	0.565	0.0001	0.0001
4					0.793	0.041	0.732	0.0001	0.0001
5						0.079	0.866	0.0001	0.0001
6							0.08	0.0001	0.0001
7								0.0001	0.0001
8									0.0001
9									

Tabla 2. Análisis estadístico para las comparaciones múltiples de los *Tiempos de palanqueo* de la tarea de *discriminación auditiva de tonos puros*. El ajuste de Bonferroni indica que existen diferencias estadísticamente significativas si $P < 0.0014$.

Para la Fase 2, solo fueron necesarias 5 sesiones más, para realizar la asociación de los estímulos auditivos relacionados al inicio de la prueba. Además, el sujeto experimental realizó el palanqueo consecutivo para la obtención de la recompensa, el promedio de la duración de la sesión experimental fue de 12 minutos $\pm$ 2 minutos.

En la Fase 3, que consiste en la implementación de la ventana de tiempo, los ratones fueron capaces de reconocer dicha ventana y responder dentro de la ventana de tiempo preestablecida a través de las sesiones experimentales (Figura 18). Esto generó una alta efectividad y disminución en el tiempo transcurrido en el protocolo



experimental, logrando hacer 200 ensayos en menos de 8 minutos $\pm$ 2 minutos.

Figura 18. Desempeño de los sujetos experimentales durante la Fase 3 de la tarea de discriminación auditiva. Se realizaron regresiones lineales con valor $R= 0.707$, $n= 22$ porcentajes, $N=1$ ratón y $R= 0.525$, $n=50$ porcentajes, $N=1$ ratón, respectivamente.

En la Fase 4, al ratón se le presentaron los estímulos de discriminación, su desempeño durante las sesiones experimentales en la fase 4.1 se muestra en la [Figura 19](#). Para dos niveles de discriminación (42dB, 61dB), se observa una tendencia ascendente en el desempeño del sujeto experimental, así también para la fase 4.2 con cuatro niveles de discriminación. Lo anterior demuestra la fiabilidad de nuestro diseño de la tarea, ya que el sujeto experimental era capaz de discriminar los 4 niveles distintos (42dB, 51dB, 53Db y 61dB), con una alta especificidad y con solo una variación de dos dB entre los estímulos. A su vez, se comprueba la gran capacidad auditiva y de discriminación de estímulos para los ratones C57/BL6, dichos datos se representan en las curvas psicométricas que se muestran en la [Figura 20 y 21](#).

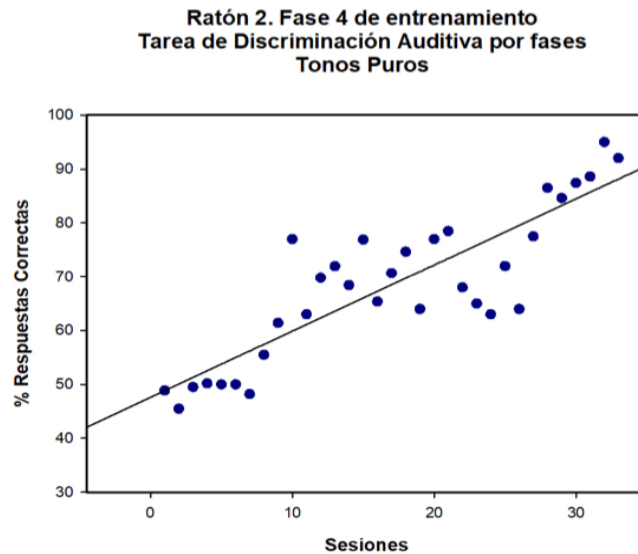


Figura 19. Desempeño de la Fase 4.1, referido a la discriminación de 2 niveles de discriminación de 42dB y 61 dB a través de 33 sesiones experimentales. Se realizó una regresión lineal con $R= 0.845$, $n=33$ porcentajes, $N=1$ ratón.

Ratón 2. Fase 4.2. 2019-10-14. Discriminación Auditiva Tonos Puros

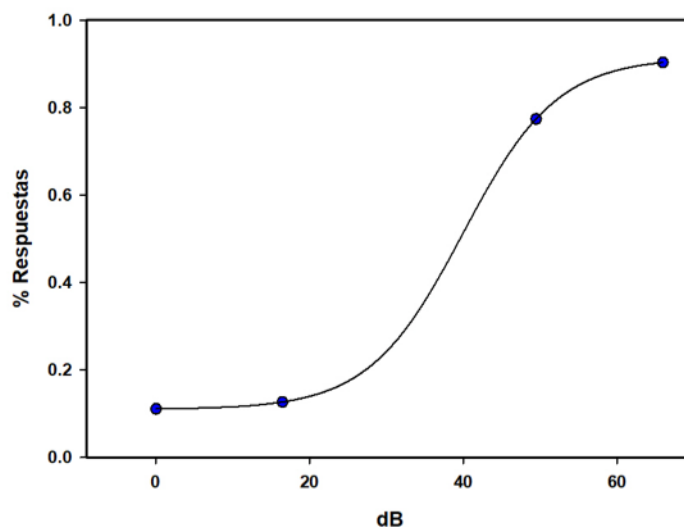


Figura 20. Curva psicométrica representativa de una sesión experimental de la Fase 4.2 con 4 niveles de discriminación (42, 51, 53 y 61dB). Se realizó un ajuste de curva Weibull para la representación de la curva psicométrica.

La representación de las respuestas en una curva psicométrica como las que se muestran en la [Figura 21](#), demuestran el proceso de aprendizaje y discriminación de los distintos estímulos auditivos. El sujeto experimental fue capaz de obtener una respuesta ante los estímulos con altos decibeles (condición GO) y una inhibición ante los estímulos con bajos decibeles (condición No-GO) establecidos. Demostramos así, la alta especificidad en la discriminación de estímulos auditivos, así como la eficiencia de nuestro *set* experimental.

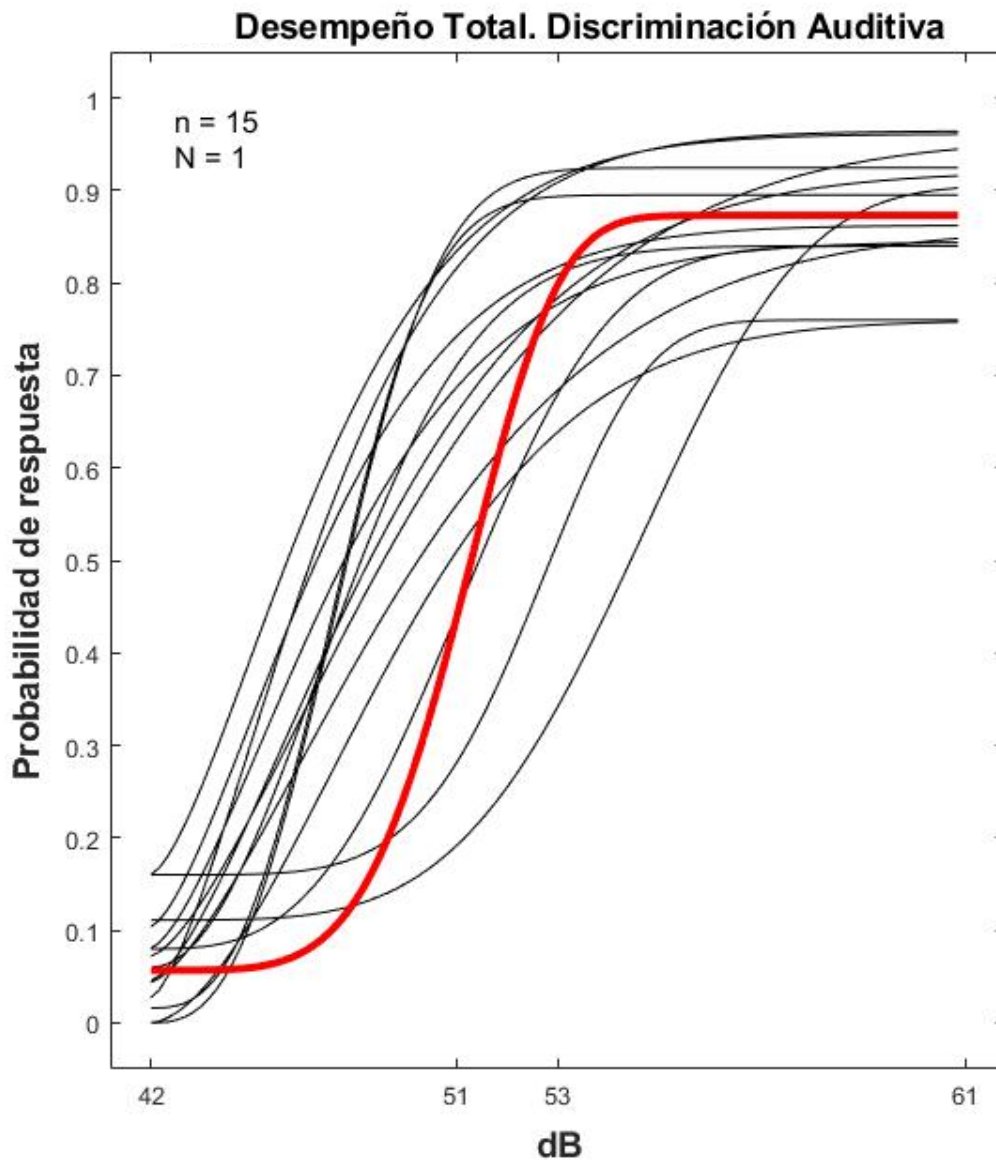


Figura 21. Conjunto de curvas psicométricas durante 14 sesiones experimentales, en la Fase 4.2 de la tarea de discriminación auditiva con 4 niveles de discriminación (42, 51, 53 y 61dB). Se resalta en rojo el promedio de dichas curvas psicométricas. Se realizó un ajuste Weibull en cada curva psicométrica.

10. Discusión

El comportamiento comprende cualquier acción que un organismo realice, sin importar si se observa o no. El énfasis del estudio del comportamiento debe apreciarse en el marco de la biopsicología, ya que el comportamiento es una determinante crucial evolutiva de supervivencia. De ésta manera el estudio del comportamiento es crucial, y es una herramienta esencial para el estudio de las neurociencias. Así, tomando una perspectiva analítica del comportamiento, podemos examinar los procesos neurofisiológicos que subyace en las relaciones funcionales establecidas entre el comportamiento y su ambiente.

Donahue y Palmer en 1994 escribieron textualmente que *"El análisis a nivel conductual define los límites dentro de los cuales deben operar los mecanismos fisiológicos subyacentes"*. De ésta manera, el estudio de la conducta puede explicar y aportar conocimiento a la rama de la neurofisiología y las neurociencias.

Sin embargo, el estudio de la conducta pura, como es el caso de la etología no brinda los conocimientos multidisciplinarios para la explicación de las bases neurofisiológicas del comportamiento. Es necesario un elemento más, que es el aprendizaje. El aprendizaje es existencial, así que su estudio debe ser complejo y multidisciplinario. Durante los siglos pasados, los investigadores de distintos campos de la ciencia han propuesto teorías para explicar cómo los humanos y animales se comportan y aprenden.

El aprendizaje se define como una respuesta a los requerimientos del ambiente (Gottlieb y cols. 2012). Además, la consolidación del estudio del aprendizaje se basa en los descubrimientos y estudios de condicionamiento operante de Skinner. A partir de ahí, el control de variables para un protocolo experimental abre cualquier tipo de posibilidades para el estudio de las funciones cognitivas y sensoriales tanto de humanos como animales.

Una de las principales ventajas de un enfoque analítico de comportamiento, como el del condicionamiento operante, es que enfatizan la metodología experimental de un solo sujeto y el control preciso de las variables (es decir, influir directamente en el comportamiento del organismo único sin depender de medidas agregadas) que ofrece.

De ésta manera al utilizar el conocimiento sobre la conducta y las bases del aprendizaje asociativo, específicamente el condicionamiento operante, se cumplió el objetivo de ésta tesis. Dicho objetivo fue diseñar tanto en *hardware*, como *software*, un *set* experimental que permitiera ese control preciso de las variables. Además de que fuera una herramienta para el estudio del aprendizaje y la fisiología de la cognición en la vía auditiva de los sujetos experimentales.

Es por eso que lo aquí descrito es de suma importancia, ya que logra por primera vez en el laboratorio de Neurofisiología Integrativa experimentos conductuales en libre movimiento, innovando desde la metodología descrita en ésta tesis, como cada uno de los componentes de *hardware* y *software*.

Además, logramos construir componentes del *hardware* con un bajo costo y elaborar un *software* muy sencillo y flexible, que permite al experimentador control absoluto de cada una de las variables.

Actualmente el *set* experimental diseñado, se está empleando para demostrar la resonancia estocástica en la vía auditiva en ratones en libre movimiento, en la tesis intitulada “Implementación y caracterización de una prueba cognitiva de procesamiento central auditivo en el ratón en libre movimiento”.

Cómo parte de las perspectivas y nuevas preguntas que se abren a partir de ésta tesis, se diseñó una tarea más de discriminación auditiva GO-NoGO, pero con el objetivo de que el sujeto experimental discriminara entre un tono puro y un estímulo de ruido blanco superpuesto. La descripción a detalle del *software* de dicha tarea se muestra en el Anexo 12.3.

También, se estandarizó una cirugía en los sujetos experimentales, de implantación de barra de acero inoxidable y arreglos de microelectrodos de tungsteno, la cual se explica paso a paso en el Anexo 12.4. Esto para la realización de experimentos conductuales con restricción de movimiento (*head-fix*) en combinación con técnicas de registro electrofisiológico. De ésta manera, será posible realizar registros electrofisiológicos durante toda la tarea cognitivo-conductual. Ello permitirá examinar la correlación electrofisiológica durante los experimentos cognitivo-conductuales, con el objetivo de dilucidar los procesos neurofisiológicos subyacentes en éste tipo de tareas sensoriales.

El diseño y desarrollo de nuestro *set* experimental, es sólo el primer paso a la formulación de nuevas preguntas en el contexto de la conducta, el aprendizaje,

procesos sensoriales, motores y la electrofisiología. Dichas herramientas, nos conducirán a dilucidar las funciones neurofisiológicas subyacentes de dichos procesos.

11. Conclusión

Hemos desarrollado un *set* experimental basado en *software* y *hardware*, el cual es útil para entrenar ratones en libre movimiento. Dicho set permitirá responder a preguntas en el campo de la neurofisiología del aprendizaje y de la vía auditiva en el ratón en libre movimiento.

12. Bioética

12.1. Aclaraciones bioéticas

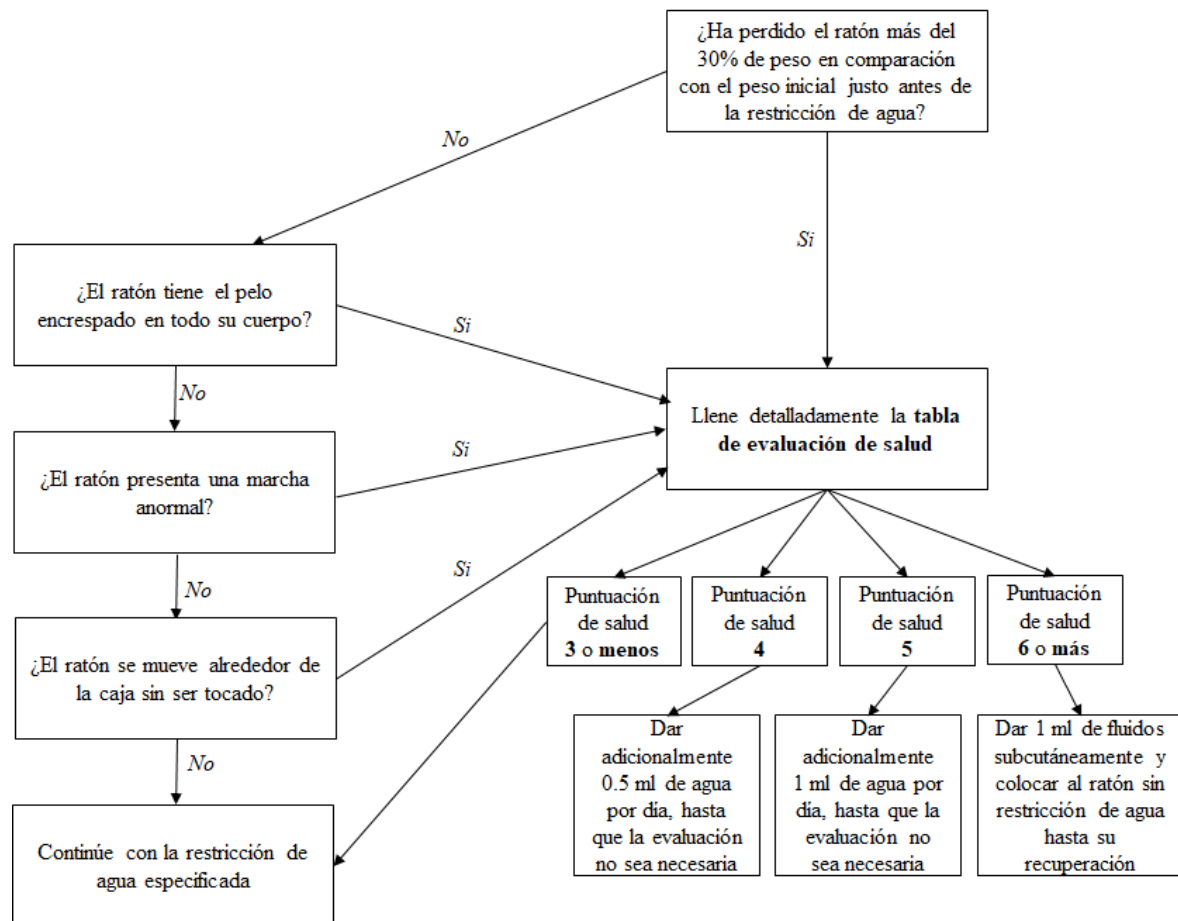
Los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Además, los experimentos se realizaron con la aprobación del Comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio de nuestra universidad (CICUAL BUAP). En particular, hemos seguido las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Asimismo, hemos cumplido con los reglamentos bioéticos vigentes para la experimentación con animales de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (Guide For the Care and Use of Laboratory Animals, 1985).

13. Anexos

13.1 Tabla de evaluación de privación de agua

Caja #:	ID. Animal:	30% Pérdida de peso (g):	Restricción #:						
Fecha									
Tiempo Observado									
Peso Corporal (g)									
Actividad									
Movimiento alrededor de la caja (0)									
Movimiento lento alrededor de la caja o presenta una marcha anormal (1)									
Presenta movimiento únicamente al tacto (2)									
No presenta movimiento (3)									
Postura y áseo									
Postura normal y pelo liso (0)									
Postura encorvada o pelo encrepado (1)									
Postura encorvada y pelo ligeramente encrepado (2)									
Postura encorvada y pelo completamente encrepado (3)									
Signos de Comer/Beber (Reduzca el puntaje en un 50% si se encuentra dentro de los 3 días posteriores al cambio de jaula)									
Heces y orina observada (0)									
Mínima producción de heces y/u orina (1)									
Sin signos de heces y/u orina (2)									
Signos de deshidratación									
La piel regresa a su posición original tras la retracción (0)									
La piel regresa después de un instante breve a su posición original, tras la retracción (1)									
La piel tarda más de cinco segundos para regresar a su posición original tras la retracción (2)									
La piel no regresa a su posición original tras la retracción (3)									
Puntaje total									
Nombre del investigador: _____									

13.2 Diagrama de flujo de evaluación de salud de los sujetos de experimentación



12. Bibliografía

Andermann ML, Kerlin AM, Reid C. Chronic cellular imaging of mouse visual cortex during operant behavior and passive viewing. *Front Cell Neurosci* 4: 2–16, 2010.

Badamasi, Y. A. (2014, September). The working principle of an Arduino. In 2014 11th international conference on electronics, computer and computation (ICECCO) (pp. 1-4). IEEE.

Boyden ES, Raymond JL (2003) Active reversal of motor memories reveals rules governing memory encoding. *Neuron* 39: 1031–1042.

Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neurosci.* 8, 1263–1268 (2005).

Cohen, J. (1969). *Operant behavior and operant conditioning* (Vol. 11). Rand McNally.

Dombeck DA, Khabbaz AN, Collman F, Adelman TL, Tank DW. Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron* 56: 43–57, 2007.

Dymecki SM, Kim JC (2007) Molecular neuroanatomy's “Three Gs”: a primer. *Neuron* 54: 17–34.

Evarts EV (1968) Relation of pyramidal tract activity to force exerted during voluntary movement. *J Neurophysiol* 31: 14–27.

Fantino, E., & Logan, C. A. (1979). *The experimental analysis of behavior*. San Francisco: WH Freeman.

Fenno, L., Yizhar, O. & Deisseroth, K. The development and application of optogenetics. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 389–412 (2011).

Ferezou I, Haiss F, Gentet LJ, AronoffR, Weber B, et al. (2007) Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice. *Neuron* 56: 907–923.

Ferster, C. B., & Skinner, B. F. *Schedules of reinforcement*. New York: Appleton-Century-Crofts, 1957.

Franklin, K. B., & Paxinos, G. (2008). The mouse brain in stereotaxic coordinates (Vol. 3). New York:: Academic press.

Gottlieb, D. A. (2012). Pavlovian Conditioning. Encyclopedia of the Sciences of Learning, 2563-2567.

Guo ZV, Li N, Huber D, Ophir E, Gutnisky DA, et al. (2014) Flow of cortical activity underlying a tactile decision in mice. Neuron 81: 179–194.

Hull, C. L. (1950). Simple qualitative discrimination learning. Psychological Review, 57(5), 303.

Hurst, J. L., & West, R. S. (2010). Taming anxiety in laboratory mice. Nature methods, 7(10), 825.

Kimble, G. A. (1961). Hilgard and Marquis'" Conditioning and learning."

Komiyama T, Sato TR, O'Connor DH, Zhang YX, Huber D, Hooks BM, Svoboda K. Learning-related fine-scale specificity imaged in motor cortex circuits of behaving mice. Nature 464: 1182–1186, 2010.

Locke, J. (1968). The educational writings of John Locke. CUP Archive.

Luo L, Callaway EM, Svoboda K (2008) Genetic dissection of neural circuits. *Neuron* 57: 634–660.

Morgan, C. L. (1894). *An Introduction to Comparative Psychology*.

O'Connor DH, Huber D, Svoboda K (2009) Reverse engineering the mouse brain. *Nature* 461: 923–929

Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes*, translated by GV Anrep. London: Oxford.

Rescorla, R. A. (1969). Pavlovian conditioned inhibition. *Psychological Bulletin*, 72(2), 77.

Rescorla, R. A., & Wagner, A. R. (1972). A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. *Classical conditioning II: Current research and theory*, 2, 64-99.

Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9), 609

Seel, N. M. (Ed.). (2011). *Encyclopedia of the Sciences of Learning*. Springer Science & Business Media.

Shepherd, D., & Hautus, M. J. (2009). Evidence of stochastic resonance in an auditory discrimination task may reflect response bias. *Attention, Perception, & Psychophysics*, 71(8), 1931-1940.

Skinner, B. F. (1958). Reinforcement today. *American Psychologist*, 13(3), 94-99.

Staddon, J. E., & Cerutti, D. T. (2003). Operant conditioning. *Annual review of psychology*, 54(1), 115-144.

Thorndike, E. L. (1927). The law of effect. *The American journal of psychology*, 39(1/4), 212-222.

Toates F. (2012) Operant Behavior. In: Seel N.M. (eds) *Encyclopedia of the Sciences of Learning*. Springer, Boston, MA.

Toates F. (2012) Operant Behavior. In: Seel N.M. (eds) *Encyclopedia of the Sciences of Learning*. Springer, Boston, MA.

Turner RS, DeLong MR (2000) Corticostriatal activity in primary motor cortex of the macaque. *J Neurosci* 20: 7096–7108.

Watson, J. B. (1913/1948). Psychology as the behaviorist views it. In W. Dennis (Ed.), *Readings in the history of psychology* (pp. 457–471). New York: Appleton.

Willott, J. F. (2001). Handbook of mouse auditory research: from behavior to molecular biology. CRC press.

Yizhar, O., Fenno, L. E., Davidson, T. J., Mogri, M. & Deisseroth, K. Optogenetics in neural systems. *Neuron* 71, 9–34 (2011).

Zeng, F. G., Fu, Q. J., & Morse, R. (2000). Human hearing enhanced by noise. *Brain research*, 869(1-2), 251-255.