



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Correlatos conductuales de la memoria de trabajo  
gustativa**

T E S I S

Que presenta

**Miguel Angel Villavicencio Camarillo**

Para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE  
**Farmacología**

Director de Tesis:

**Dr. Ranier Gutiérrez**

México, D.F

Diciembre, 2012

Este trabajo se llevo a cabo en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Farmacología, en el Laboratorio de Neurobiología del Apetito bajo la tutoría del Dr. Ranier Gutiérrez; mediante el apoyo de CONACYT a través de la beca con No. de Registro: 253345 para CIPD y con el apoyo del CONACYT donativo 179484, Salud2010-02-151001, ICYTDF-PICSA12-126, y Productos Medix 000652.

*A Made*  
*y a la educación pública*

Agradecimientos:

Al Dr. Ranier Gutiérrez, por compartirme su pasión por la ciencia.

A la Dra. Ma. del Carmen García, al Dr. J. Antonio Arias y al Dr. David Elías, por no dejar de empujar hacia adelante y hacia arriba.

Al mis compañeros del laboratorio, Claudia, Luis, Isaac, Jessica, Kalyan, Mario, Lalo, Dayana, Rosi, Esmeralda, Andrei, Álvaro y Milton, porque siempre se mostraron como verdaderos compañeros.

A mi familia, Ingrid, Josefa, Miguel, Ana, Made, Beti, Agustín, Chatis, Juan, Griselda, Gustavo, Edgar y Ángel.

A todos, ¡muchas gracias!

## CONTENIDO

---

Lista de figuras.....	vii
Resumen .....	ix
Abstract.....	x
Introducción .....	11
Sistema gustativo .....	11
Bases anatómicas del procesamiento gustativo.....	11
Velocidad del sistema gustativo .....	17
Formación del percepto gustativo .....	21
Memoria de trabajo.....	22
Tareas para estudiar la memoria de trabajo.....	23
Objetivo.....	28
Hipótesis .....	29
Metodología.....	30
Materiales .....	30
Sujetos.....	34
Tarea conductual.....	34
Análisis de la conducta .....	37
Desempeño .....	38
Lengüeteo .....	40
Análisis estadísticos .....	41
Resultados.....	42
Las ratas son capaces de generar y usar la memoria de trabajo gustativa.....	42
Con el aprendizaje el lengüeteo de las ratas se vuelve más rítmico y estereotipado.....	45

El lengüeteo se hace más rítmico en función del aprendizaje.....	45
El lengüeteo se vuelve más estereotípico con el aprendizaje .....	50
Las ratas pausan con más frecuencia al final de los ensayos.....	53
La duración de los periodos es crítica para resolver correctamente la tarea gdms.....	55
El tiempo de toma de decisión se acorta con el aprendizaje.....	55
Las pausas durante los periodos donde hay información relevante provocan errores .....	60
Las ratas usaron como estrategia la identificación del sabor umami.....	63
Discusión .....	69
las ratas son capaces de retener en la memoria de trabajo un trazo gustativo .....	69
La tarea gdms como un modelo alternativo para estudiar memoria de trabajo.....	70
El lengüeteo se modula con el aprendizaje .....	72
Características temporales de la memoria de trabajo .....	73
Tiempo de identificación gustativa.....	73
La velocidad de la formación del trazo gustativo depende del estímulo recibido .....	75
Conclusiones Y Perspectivas.....	78
Referencias.....	79

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Organización, localización y morfología de las células receptoras al sabor y las papilas gustativas. ....	12
Figura 2. Esquema de una célula receptora al sabor y una neurona aferente asociada. ....	15
Figura 3. Sistema gustativo en el sistema nervioso central. ....	16
Figura 4. Representación esquemática de la evolución lenta (hasta 2.5 s) del trazo gustativo en la corteza insular.....	18
Figura 5. Experimento clásico de Halpern y Tapper donde demostraron que la identificación gustativa es rápida ( 250-600 ms).. ....	19
Figura 6. Ejemplo de una neurona de CI que modula su frecuencia de disparo en función a la concentración de los estímulos en menos de 150 ms. ....	20
Figura 7. Las ratas pueden usar y generar un trazo de memoria gustativo con el que evalúan los efectos post-ingestionales de un estímulo gustativo novedoso.. ....	22
Figura 8. Representación esquemática de la actividad neuronal que codifica memoria de trabajo.....	23
Figura 9. Las tareas para evaluar memoria de trabajo se basan en la iteración espontánea de las ratas.. ....	25
Figura 10. La exploración espontánea puede ser la conducta con la que las ratas resuelven algunas tareas para evaluar memoria de trabajo. ....	26
Figura 11. Caja conductual y sistema de liberación de pistas gustativas. ....	31
Figura 12. Una gota desde 5 µl de volumen, liberada por nuestro sistema, es capaz de bañar toda la lengua de la rata y no se mezcla con otros líquidos.33	
Figura 13. Esquema de la tarea Gustatory delay-match to sample. ....	36
Figura 14. Ejemplo de grafico de función de distribución acumulada.. ....	38
Figura 15. Tabla de contingencia estímulo-respuesta. . ....	40
Figura 16. La fracción de respuestas correctas no es un índice apropiado para cuantificar el progreso de los sujetos.....	42

Figura 17. Las ratas pueden generar una memoria de trabajo gustativa y usarla para resolver la tarea GDMS.....	44
Figura 18. Las ratas conservan el patrón rítmico del lengüeteo ( -140ms) en la totalidad de un ensayo de máxima discriminación. ....	46
Figura 19. El lengüeteo se hace más rítmico en función del aprendizaje. ....	48
Figura 20. Con el aprendizaje, el lengüeteo se hace más rítmico y estructurado en la totalidad de una sesión de máxima discriminación. ....	49
Figura 21. Las ratas conservan un patrón estereotipado del lengüeteo en la totalidad de un ensayo de máxima discriminación.....	51
Figura 22. El lengüeteo se vuelve más estereotipado e ininterrumpido en función del aprendizaje.. ....	52
Figura 23. Las ratas muestran un patrón del lengüeteo diferenciado a lo largo del ensayo, que tiene a desaparecer con el aprendizaje. ....	54
Figura 24. El aprendizaje acelera la toma de decisiones correctas (hasta en -350 ms), la cual ocurre durante los lengüeteos adicionales. ....	56
Figura 25. Con el aprendizaje las ratas pueden tomar decisiones correctas en tan sólo 3, 2 o incluso 1 lengüeteo.....	58
Figura 26. Las ratas que no aprendieron necesitaron más tiempo para tomar decisiones correctas. ....	59
Figura 27. El procesamiento de información relevante para la tarea es sensible al tiempo. ....	61
Figura 28. Las ratas que lograron reducir la duración de los ensayos tuvieron éxito en la tarea. ....	62
Figura 29. La combinación umami-umami, pero no el sabor umami, incrementa el tiempo de toma de decisión.....	64
Figura 30. La combinación umami-umami puede desencadenar hasta 6 lengüeteos adicionales. ....	65
Figura 31. Las ratas usaron como estrategia la identificación del sabor umami.....	67

## RESUMEN

---

El sentido del gusto provee a los animales de información vital acerca de las sustancias que consumen etiquetándolas como nutritivas o nocivas, dependiendo de los efectos post-ingestionales que produzcan en la primera ingesta. Para ello, es necesaria la formación de un trazo de memoria gustativa, que se mantiene activo por varias horas en una memoria de corto plazo, en ausencia del estímulo. Sin embargo, no se sabe si los roedores son capaces de mantener en la memoria de trabajo el trazo gustativo evocado por un estímulo familiar y si pueden usar esta memoria para guiar su conducta. Para contestar esta pregunta nosotros diseñamos una novedosa tarea conductual que llamamos *Gustatory Delay Match to Sample* (GDMS), en donde las ratas tienen que generar un trazo de memoria gustativo para resolverla. En cada ensayo, las ratas necesitan lengüetear en un *sipper* vacío situado en un puerto central, de donde reciben la primer pista gustativa (T1), que puede ser una gota de NaCl o de umami, la cual tienen que mantener en la memoria de trabajo durante los siguientes 3, 4 ó 5 lengüeteos vacíos, posteriormente reciben otra pista gustativa (T2) que puede ser igual o diferente a T1. Para que sean recompensadas con 3 gotas de sacarosa, las ratas tienen que acudir a un puerto lateral si las pistas fueron iguales (ensayos *Match*), o al puerto opuesto si fueron diferentes (ensayos *Non-Match*). Utilizando esta tarea conductual nosotros demostramos, por primera vez, que las ratas pueden usar una memoria de trabajo gustativa evocada por un estímulo familiar para dirigir su conducta, detectando e identificando los estímulos gustativos, así como también demostramos por primera vez que las ratas pueden tomar decisiones basadas en un máximo grado de discriminación en un tiempo mínimo de ~ 350 ms. Además, descubrimos que la memoria de trabajo gustativa se degrada con el tiempo, una característica típica de la memoria de trabajo. En conclusión, nuestra tarea es ideal para evaluar los correlatos neuronales de la memoria de trabajo gustativa en ratas en libre movimiento.

## ABSTRACT

---

The sense of taste provides animals with vital information about the substances that they consume by labeling them as nutritive or noxious, depending on the post-ingestional effects that they could produce during the first intake. To do this, is needed the formation of a gustatory memory trace, which remains active for several hours in a short-term memory, in absence of the stimulus. Nevertheless, it is unknown whether rodents are able to hold in working memory the gustatory trace evoked by a familiar tastant and whether they can use this memory in order to guide their behavior. To answer this question, we designed a novel behavioral task called *Gustatory Delay Match to Sample* (GDMS), where rats are required to evoke a gustatory memory trace to solve the task. In each trial, rats need to lick an empty sipper located in a central port, from where they receive a gustatory cue (T1), that might be a drop of NaCl or umami. Rats need to hold in working memory T1 during the next 3, 4 or 5 empty licks, and then rats received a second gustatory cue (T2) that could be the same or different from T1. In order to be reward with 3 drops of sucrose, rats need to visit a lateral port if the cues were the same (*Match* trials), or to the opposite one if they were different (*Non-Match* trials). We found that rats are able to use a gustatory working memory evoked by a familiar stimulus to solve the task. In addition, we found that rats can detect and identify a gustatory stimuli, as well as make a behavioral decision with maximum accuracy within a minimum time of ~ 350 ms. Also, we discovered that the gustatory working memory decays as a function of the time, a typical working memory feature. In conclusion, we have successfully desing a novel task that is ideal to evaluate the neuronal correlates of the gustatory working memory in freely moving rats.

## INTRODUCCIÓN

---

### *Sistema gustativo*

---

De los 5 sistemas sensoriales con que los animales superiores cuentan para captar señales físicas y químicas del medio ambiente, el gustativo es el encargado de evaluar el contenido nutritivo o tóxico de las sustancias que los sujetos consumen. De ahí que este sistema está configurado para "etiquetar" a las sustancias exógenas en función de sus posibles efectos fisiológicos [1].

El sistema gustativo está preparado para catalogar a una gran gama de sustancias en lo que se conoce como los 5 sabores primarios: dulce, salado, umami, ácido y amargo. Los primeros 3 están asociados a efectos positivos, básicamente a la provisión de carbohidratos, sodio y amino ácidos, respectivamente. Mientras que los 2 restantes previenen el consumo de tóxicos. Como resulta evidente, la eficacia y fidelidad de este sistema sensorial es crucial para la supervivencia de los organismos [2].

A pesar de ello, abundan las incógnitas en cuanto a cómo es llevado el procesamiento gustativo, qué tan rápido es y cómo es modulado por la experiencia. En lo consecutivo, abundaré en las bases anatómicas del procesamiento gustativo, visitaré la controversia en cuanto a la velocidad del procesamiento gustativo y, por último, expondré lo que se conoce acerca de la formación de la percepción gustativa.

---

### *Bases anatómicas del procesamiento gustativo*

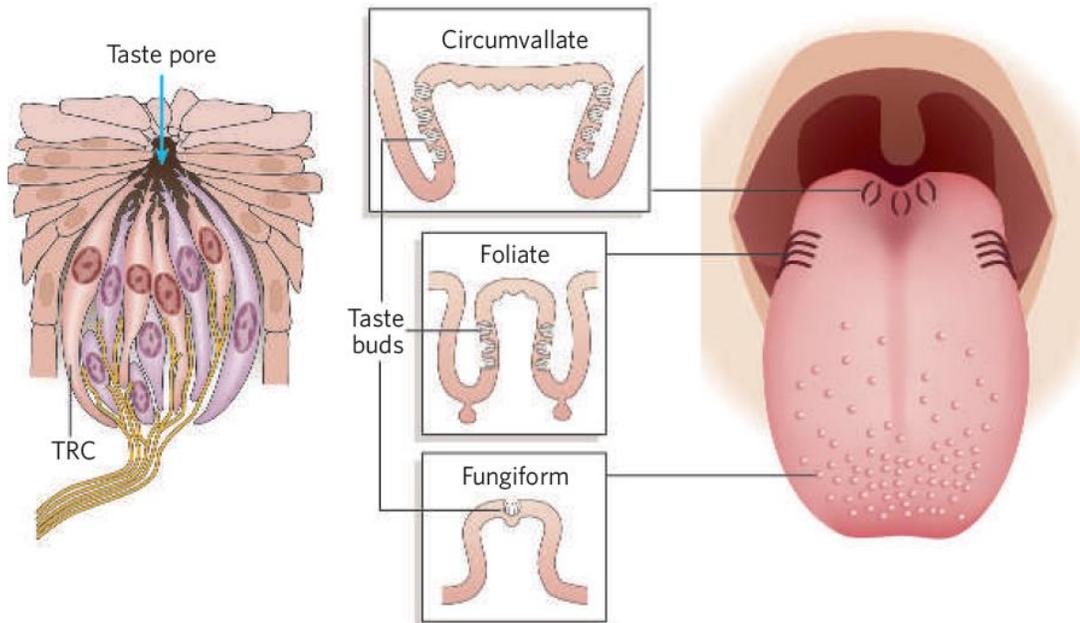
---

#### *Células receptoras y transducción del sabor*

---

En los mamíferos, las unidades anatómicas básicas de la recepción de estímulos sápidos son las células receptoras al sabor (CRS) que se agrupan en botones gustativos localizados en la lengua, el paladar, la epiglotis y el esófago [2, 3]. En la lengua, estos botones gustativos contienen desde 50

hasta 150 CRS que forman un poro gustativo en su región apical, donde desarrollan microvellosidades para maximizar el contacto con las sustancias exógenas (Fig. 1, izquierda; [3]). Estos botones, a su vez se aglutinan en estructuras envaginadas en el epitelio llamadas papilas gustativas, que se clasifican de acuerdo a su morfología y localización. En el primer tercio anterior de la lengua se encuentran las papilas fungiformes, en el segundo tercio las foliadas y en el tercio posterior las caliciformes (también conocidas como circunvaladas; Fig. 1, derecha; [3]).



**Figura 1. Organización, localización y morfología de las células receptoras al sabor y las papilas gustativas.** A la derecha se observa un botón gustativo formado por numerosas células receptoras al sabor que en su parte apical forman el poro gustativo y extienden microvellosidades. A la izquierda se exponen las localizaciones y morfología de las papilas circunvaladas, foliadas y fungiformes, en donde se encuentran los botones gustativos. Tomada de [3].

Las CRS se diferencian entre ellas de acuerdo al tipo de estímulo sávido que reconocen, característica que no se traslapa entre un tipo de célula y otro [4-6]. Asimismo, todos los botones gustativos cuentan con todos los tipos de CRS, de manera que los diferentes sabores pueden muestrearse en todas las papilas gustativas de la lengua [2]. Evidencia reciente sugiere que los diferentes tipos de CRS no comparten las fibras nerviosas que llevan la información gustativa al sistema nervioso central (SNC), de modo que existen

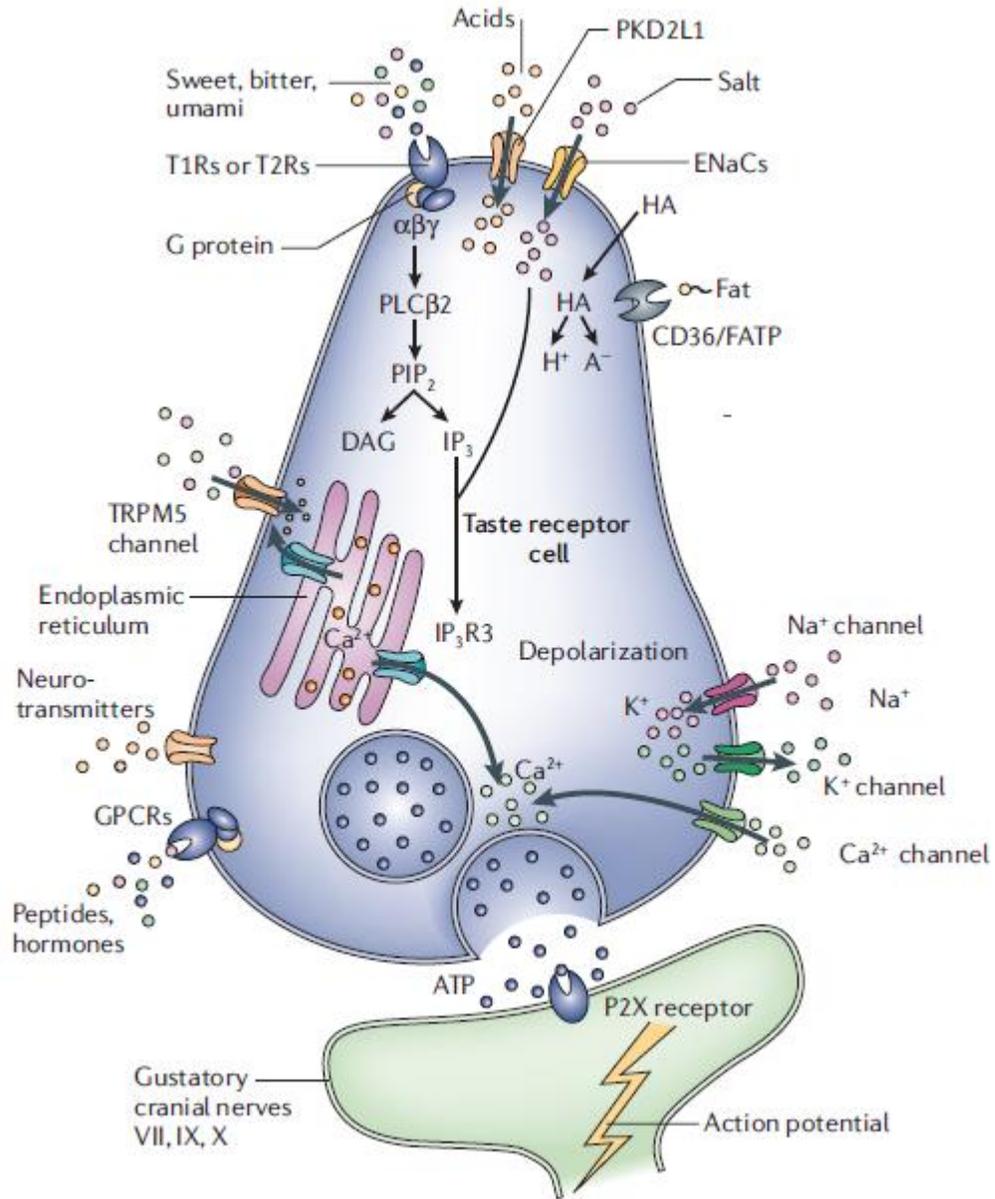
fibras nerviosas dedicadas a transmitir la información de un sólo sabor [3, 6], sin embargo, aún existe controversia al respecto.

Cada tipo de CRS expresa diferentes proteínas, lo que las especializa para detectar diferencialmente los sabores. Sin embargo, en este trabajo sólo se expondrán los mecanismos de transducción de los sabores umami y salado en las CRS correspondientes, ya que son los estímulos gustativos que utilizamos en esta tesis.

El umami, el sabor del glutamato monosódico [7, 8] y otros amino ácidos levógiros [9], es captado por las células receptoras a este sabor a través de un heterodímero formado por dos receptores transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés): T1R1 y T1R3. Dicho heterodímero sólo está expresado y es funcional en un tipo de CRS [9]. La cascada de señalización que se desencadena con la activación del receptor T1R1-T1R3 ha sido motivo de estudio. Mediante el uso de *knockouts* de la fosfolipasa Cbeta2 (PC $\beta$ 2) se sabe que esta proteína es necesaria para la transducción de señales del sabor umami [4], así como de otros sabores mediados por GPCRs (e.g. dulce y amargo). De este hallazgo se ha sugerido [10] que la activación de la PC $\beta$ 2 puede llevarla a degradar fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (IP2) para producir diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3). Éste último podría luego unirse a los receptores IP $_3$ R3 ubicados en el retículo endoplasmático para liberar calcio al citosol de las células. En consistencia con lo anterior, se ha corroborado la co-expresión del canal potencial del receptor transitorio TRPM5 con la PC $\beta$ 2 y el receptor IP $_3$ R3 en CRS [11], lo que significa que la cadena de señalización continuaría con la activación de este canal al elevarse los niveles de calcio intracelular y permitir la salida de neurotransmisores, por medio de exocitosis vesicular, al espacio sináptico y de esta manera activar a las neuronas primarias que inervan los botones gustativos.

En cuanto a la percepción de sustancias saladas, la señalización está mediada por dos proteínas, cuya expresión no se traslapa en las mismas

CRS [1]: parte de la señalización está mediada por el canal epitelial de sodio (ENaC), el cual es sensible a amilorida y es altamente selectivo a sodio a partir de concentraciones de 10 mM [1, 12]; para el resto de la percepción el responsable es el receptor vaniloide del tipo 1 (VR1) [13], que también responde a capsaicina, a otras sales minerales, es sensible a la temperatura y es activado a partir de concentraciones de 150 mM sodio [1, 13]. Se ha sugerido [10] que la depolarización de las CRS que expresan los canales ENaC podría evocar potenciales de acción a través de la activación de canales dependientes de voltaje de sodio, potasio y calcio. En la Figura 2 se pueden observar diferentes cascadas de transducción que son activadas por diferentes estímulos sápidos, incluyendo el NaCl y los amino ácidos, y que llevan a la generación de potenciales de acción en las fibras nerviosas aferentes.



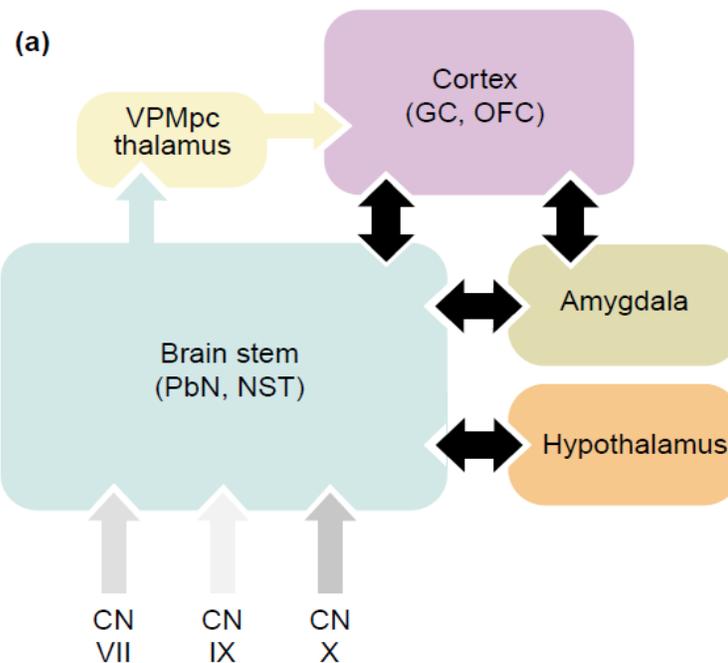
**Figura 2. Esquema de una célula receptora al sabor y una neurona aferente asociada.** En esta célula se muestran diferentes cascadas de señalización evocadas por la activación de los receptores a sustancias sápidas que se encuentran expresados de manera no traslapada en diferentes tipos celulares. También se muestra una neurona aferente primaria que, al ser liberados los neurotransmisores desde la CRS, genera un potencial de acción que lleva la señal gustativa al sistema nervioso central. Tomado de [10]

### *Procesamiento del sabor en el sistema nervioso central*

Como se ha mencionado antes, los botones gustativos están inervados por fibras nerviosas que llevan la información gustativa al SNC. Sin embargo, al igual que las papilas gustativas están distribuidas diferencialmente en la lengua, las fibras nerviosas aferentes también lo están. Las papilas

fungiformes y foliadas, que se encuentran en el primer y segundo tercio anterior de la lengua, están inervadas por la *corda timpani*, una rama del nervio facial (par craneal VII); mientras que en el tercio posterior de la lengua (donde se encuentran las papilas caliciformes), la epiglotis y el esófago están inervadas por la rama lingual del nervio glossofaríngeo y la rama superior laríngea del nervio vago (pares craneales IX y X, respectivamente) [10].

El primer relevo de "la ruta del sabor" en el tallo cerebral es el núcleo de tracto solitario (NTS) quien luego turna la señal al núcleo parabraquial pontino (NPbp). Como se observa en la Figura 3, las cortezas insular (CI, corteza gustativa primaria) y orbitofrontal (COF, corteza gustativa secundaria) reciben la información gustativa directamente del NPbp, o indirectamente, a través del núcleo vetroposteriomedial del tálamo en su región parvocelular (VPMpcT) y a través de la amígdala.



**Figura 3. Sistema gustativo en el sistema nervioso central.** CN, nervios craneales; PbN, núcleo parabraquial pontino; NST, núcleo del tracto solitario; VPMpc, núcleo vetroposteriomedial del tálamo, GC, corteza gustativa insular; OFC, corteza orbitofrontal; Note que el PbN no está presente en primates, pero sí en roedores. Tomado de [14].

Todas estas estructuras en el SNC procesan la información gustativa en paralelo [10, 15] como una representación neural abstracta, conocida como

trazo gustativo. Pero la velocidad con la que este trazo gustativo es generado permanece en controversia.

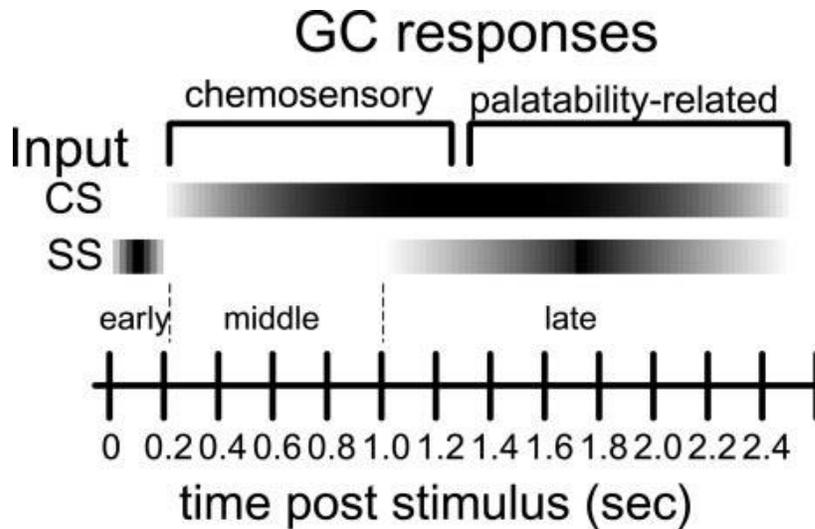
---

### Velocidad del sistema gustativo

---

Después de que un estímulo sávido ha activado a las CRS correspondientes y estas han transducido la señal para luego ser convertida en potenciales de acción que, a su vez, proveen la información gustativa a diferentes estructuras en el SNC, se suceden 3 procesos fundamentales para formar un trazo gustativo del estímulo: 1) detección (el saber que un sabor está en la boca), 2) identificación (saber qué sabor exactamente está en la boca) y, 3) la formación de un percepto gustativo (e.g., saber si el sabor es seguro ingerirlo o si es tóxico y debe de evitarse). Lamentablemente, aún no existe certeza en cuanto a cuál es el tiempo necesario para que un estímulo gustativo sea detectado e identificado, pues existen algunos estudios que sugieren que el procesamiento gustativo es muy lento ( $>2.5$  s; [16]), mientras que otras evidencias sugieren que es muy rápido ( $< 200$  ms; [17]). A continuación, hondaré en las evidencias, electrofisiológicas y conductuales, de donde se desprenden ambos puntos de vista.

Mediante registros electrofisiológicos en ratas con cabeza restringida, Katz et. al. estudiaron las modulaciones de las neuronas de CI que ocurrían después de que los animales recibían diferentes sabores a través de una cánula intraoral [16]. Este grupo de investigación encontró que las neuronas de esta región del cerebro presentaban 3 fases de actividad, donde en cada una se codificaban diferentes aspectos de los estímulos (Fig. 4): una fase temprana (de 0 a 200 ms) codifica la detección del estímulo, a la que le sigue una fase media (de 200 a 1000 ms) donde predomina la información relativa a la identificación del estímulo y, por último, una fase tardía (1000 a 2500 ms) relacionada a la formación del percepto gustativo. Estos resultados contrastan con los obtenidos en ratas en libre movimiento (ver abajo).



**Figura 4.** Representación esquemática de la evolución lenta (hasta 2.5 s) del trazo gustativo en la corteza insular. Tomado de [16].

En un trabajo clásico, Halpern y Tapper [17] indujeron aversión condicionada al NaCl a un grupo de ratas, cuando después de que estas lo consumieran por primera vez fueron expuestas a rayos X, lo que les produjo que asociaran el malestar generalizado al consumo de NaCl. Una vez que las ratas estuvieron condicionadas a evitar el NaCl, pudieron detectar e identificar este sabor, deteniendo su consumo en tan sólo 4 lengüeteos (~600 ms; Fig. 5A), lo que no se generalizó para un estímulo diferente (e.g. sacarosa; Fig. 5B), pero sí a una concentración diferente del mismo estímulo con el que se indujo la aversión (de 300 mM a 500 mM) identificándola con mayor velocidad (~250 ms; Fig. 5C). Estos resultados, además, son consistentes con la demora con la que la *corda timpani* responde de manera física ante estímulos sápidos (~200 ms; [18]) y con registros electrofisiológicos de las neuronas de CI de ratas en libre movimiento.

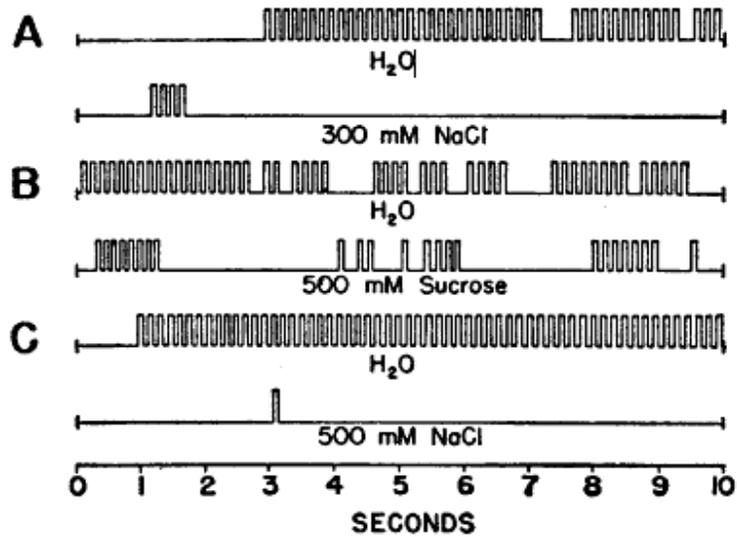


Figura 5. Experimento clásico de Halpern y Tapper donde demostraron que la identificación gustativa es rápida (~250-600 ms). Tomado de [17].

En la Figura 6 se muestra la actividad de una neurona registrada por Stapleton J.R. et. al. ante 4 sabores a diferentes concentraciones, que la rata recibió mientras lengüeteaba libremente [19]. Es de destacar que como esta neurona, este grupo de investigación encontró una población neuronal que codificaban información relacionada a la identificación del estímulo en menos de 150 ms, esto es, entre un lengüeteo y el siguiente.

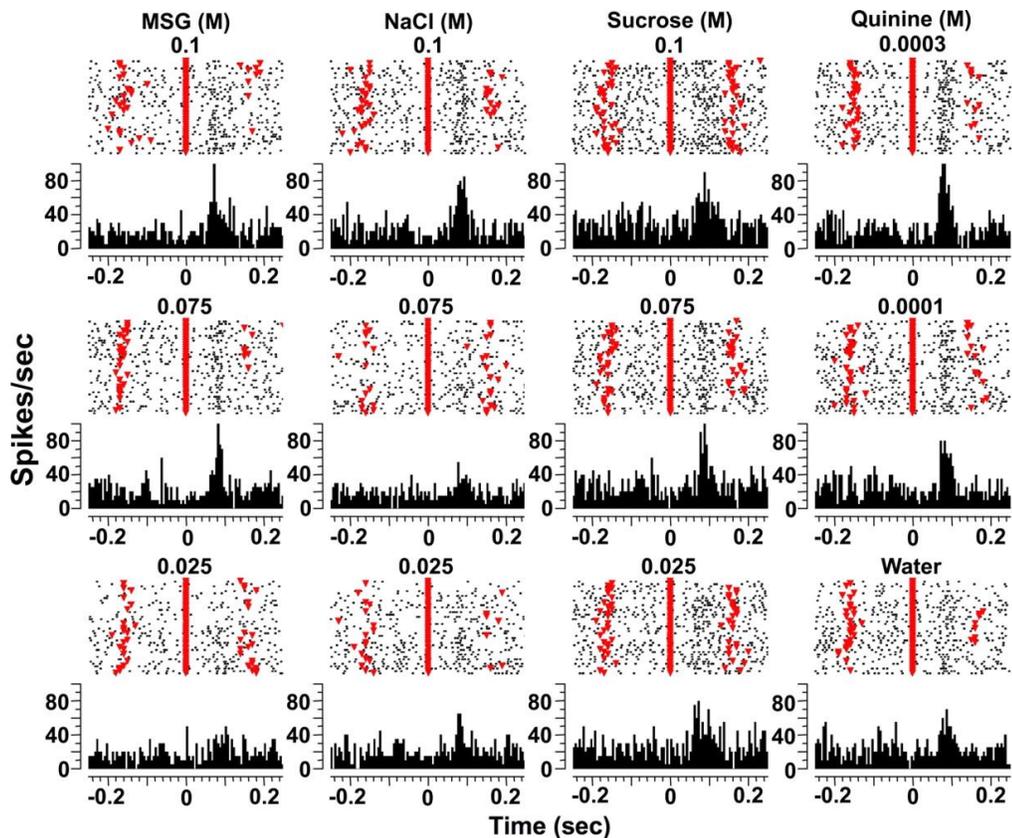


Figura 6. Ejemplo de una neurona de CI que modula su frecuencia de disparo en función a la concentración de los estímulos en menos de 150 ms. Tomado de [19].

A pesar de la sólida evidencia que presentaron estos grupos de investigación a propósito de que la identificación gustativa es rápida, Weiss y DiLorenzo mostraron, recientemente, que la rapidez de la discriminación gustativa puede ser incrementada por el aprendizaje [20]. Usando como índice de identificación gustativa la interrupción del lengüeteo de las ratas que ocurre luego de haber recibido un estímulo aversivo, Weiss y sus colaboradores concluyeron que el tiempo máximo para identificar un estímulo es de ~580 ms, siempre y cuando las ratas hayan tenido experiencia previa a rechazar dicha sustancia o cuando la concentración de la misma se encuentre muy por encima del umbral de detección. Estos resultados vuelven a traer a la mesa de discusión el pobre conocimiento que tenemos sobre la evolución de un trazo gustativo evocado por un estímulo familiar.

Por el contrario, la formación del percepto gustativo de un estímulo gustativo novedoso ha sido más exhaustivamente caracterizada (ver adelante).

---

## Formación del percepto gustativo

---

Como se ha dicho anteriormente, la representación neural de la información gustativa, esto es el trazo gustativo, puede ser procesada en diferentes regiones del SNC de manera paralela. Se ha sugerido que cuando dicha información proviene de un estímulo novedoso, ésta puede mantenerse por varias horas aún cuando el estímulo ya no esté presente, en forma de un trazo de memoria gustativo (TMG; [15]). De hecho, tan relevante es este TMG que la formación de un percepto gustativo parece depender más de él que del estímulo sávido mismo.

En la Figura 7, se muestra la primera y segunda vez que dos grupos de ratas consumieron sacarina, es decir, cuando esta solución les fue novedosa y cuando les fue familiar. [15]. Al primer grupo (triángulos) se le inyectó una dosis única de cloruro de litio (LiCl; reactivo que produce malestar gástrico), 15 minutos después de haber consumido sacarina la primera vez, mientras que al segundo grupo (cuadrados) no recibió tratamiento entre las presentaciones de la sacarina. Se puede observar que las ratas a las que les fue inducido el malestar gástrico bebieron menos sacarina en la segunda ocasión (72 h entre presentaciones), un fenómeno conocido como condicionamiento aversivo al sabor (CAS), pues asociaron este estímulo con el malestar gástrico. El segundo grupo de ratas, por el contrario, aumentó su consumo de sacarina en la segunda presentación del estímulo (24 h entre presentaciones), exhibiendo una conducta llamada atenuación de la neofobia (AN), que ocurre cuando el consumo de un estímulo novedoso no produce efectos negativos sobre el organismo, y entonces es considerado seguro. De este resultado se desprende 1) que las ratas pueden decidir consumir (o no) por segunda vez un alimento, dependiendo de los efectos post-ingestionales que haya causado la primera ingesta del mismo, y 2) que esta asociación aprendida depende de una representación neuronal del estímulo ingerido, la cual se mantiene activa durante todo el periodo de evaluación de los efectos post-ingestionales, es decir, depende de un TMG.

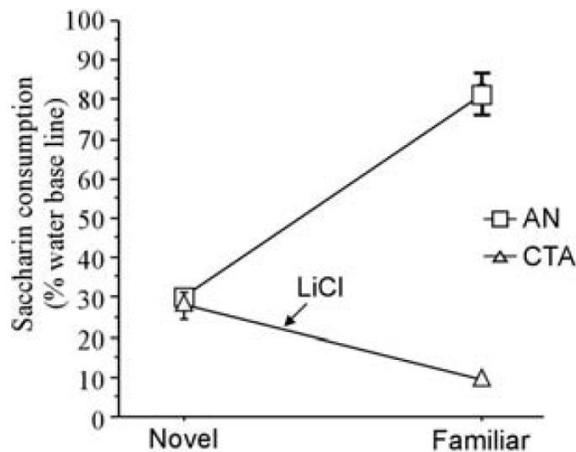


Figura 7. Las ratas pueden usar y generar un trazo de memoria gustativo con el que evalúan los efectos post-ingestivos de un estímulo gustativo novedoso. Tomado de [15].

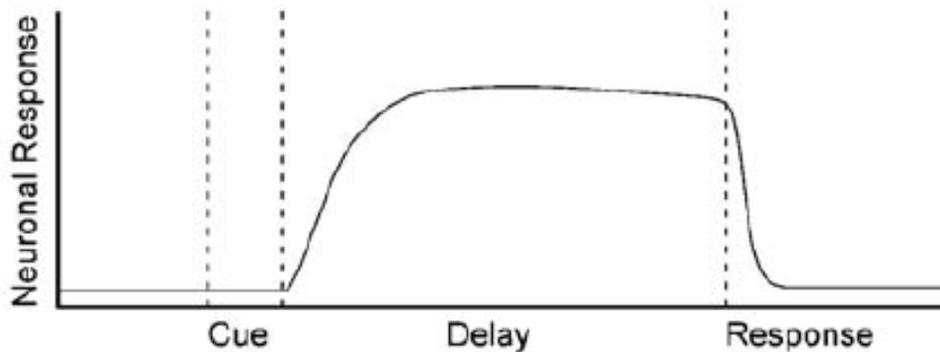
Una vez que se han estimado los efectos aversivos o seguros de un estímulo que fue novedoso, la representación neuronal del mismo queda consolidada en memoria de largo plazo, proceso que requiere síntesis proteica de novo [21]. De manera que es un proceso que requiere un sólo ensayo, hecho que evidencia la eficacia del sistema gustativo.

Sin embargo, aún se desconoce si las ratas son capaces, además, de generar una memoria de trabajo de un trazo gustativo familiar (consolidado en la memoria de largo plazo), que sea evocada cada vez que ocurra ése estímulo conocido (ensayos múltiples), y que esa información pueda ser usada como pista para dirigir su conducta hacia un objetivo determinado.

### Memoria de trabajo

En ocasiones, los estímulos sensoriales que ya han sido almacenados en memoria de largo plazo, pueden acontecer más de una vez y ser codificados "pasivamente" con cada presentación, sin que sugieran un nuevo significado del que ya se les ha asignado anteriormente [22]. Existe también el caso de que cada vez que se presente un estímulo familiar, se le añada un nuevo significado temporal de acuerdo con el contexto en curso, y que entonces tenga que ser codificado "activamente" como una pista relevante que coadyuve a dirigir la conducta a un objetivo determinado.

El proceso cognitivo que nos permite almacenar y manipular temporalmente información relevante para resolver una tarea se conoce como memoria de trabajo [23, 24]. La característica principal de este tipo de memoria es que la información (externa o interna, e.g., extraída de la memoria de largo plazo) se actualiza y luego decae con cada ensayo [25]. De manera fascinante, existen neuronas de diferentes estructuras en el SNC donde es codificada la memoria de trabajo que exhiben una actividad específica durante este proceso. Por ejemplo, un cambio sostenido en la frecuencia de disparo (incremento o decremento) de éstas neuronas durante la demora en que la información es mantenida en la memoria de trabajo se considera la representación neuronal de la memoria de trabajo (Fig. 8).



**Figura 8. Representación esquemática de la actividad neuronal que codifica memoria de trabajo.** Después de que el sujeto de estudio recibe una pista (ej. Visual) tiene que mantener en la memoria las cualidades de dicha pista para luego dar una respuesta que le lleve a recibir una recompensa. Las neuronas que codifican memoria de trabajo cambian su frecuencia de disparo (*neural response*, en el esquema) con respecto a su actividad basal y mantienen esa frecuencia durante el tiempo que el sujeto tiene que recordar las características de la pista. Esta frecuencia de disparo regresa a su estado basal una vez que la información deja de ser útil y el sujeto da una respuesta. Tomado de [24].

El común denominador de las tareas conductuales que se han diseñado para evaluar memoria de trabajo es que todas cuentan con un periodo de demora donde se retiene la información relevante. A continuación, daré repaso a algunas de ellas.

---

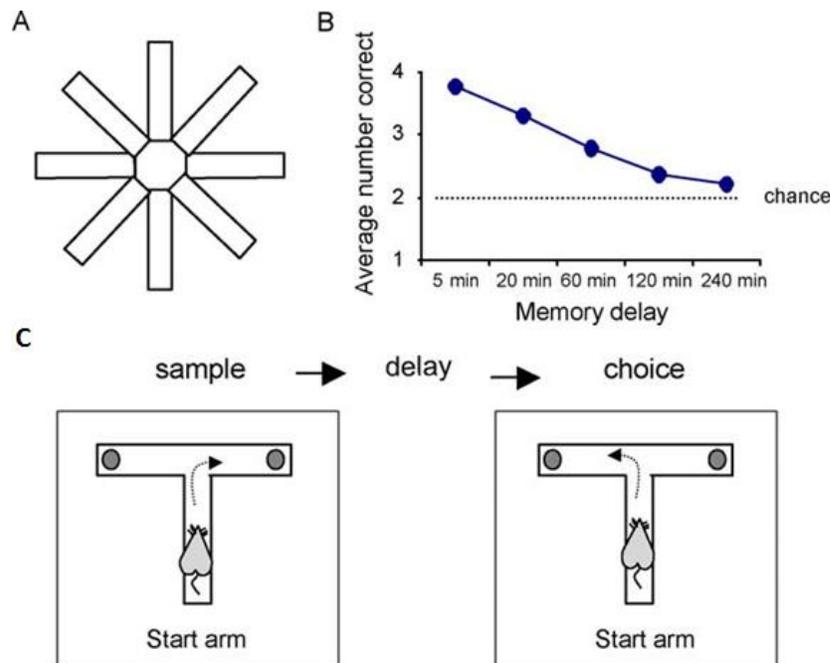
#### Tareas para estudiar la memoria de trabajo

---

En 1976 Olton y Samuelson evaluaron memoria de trabajo espacial usando un laberinto de 8 brazos (Fig. 9A). Las ratas eran posicionadas en el centro del laberinto y había comida como recompensa al final de cada brazo [26]. En cada ensayo las ratas decidían libremente visitar uno de los brazos y comían la recompensa, luego de lo cual eran retiradas del laberinto. Después de cierta demora las ratas eran regresadas al laberinto y tenían que acudir a un brazo al que no habían visitado antes, de lo contrario ya no encontraban la recompensa al final del brazo. De manera que para resolver esta tarea de 8 ensayos, las ratas tenían que mantener en la memoria de trabajo qué brazos ya habían visitado antes. Una vez que se agotaban los brazos sin visitar, el experimento concluía y la información almacenada en la memoria de trabajo ya no era relevante. Si el experimento se repetía las ratas tenían que recordar los brazos visitados y no visitados de la sesión en curso, pero no de la anterior, es decir, actualizaban la información a retener. Además, este grupo de investigación encontró que a medida que alargaban el intervalo entre un ensayo y el siguiente, aumentaban la probabilidad de que las ratas acudieran a un brazo que ya habían visitado (Fig. 9B).

Otra tarea clásica para evaluar memoria de trabajo espacial en roedores es el laberinto en T (Fig. 9C; [27]). De manera parecida a la tarea anterior, en dos de los brazos del laberinto hay comida como recompensa y en el tercer brazo restante son colocadas las ratas para iniciar un ensayo. Las ratas, entonces, tienen que acudir a uno de los dos brazos donde consumen la recompensa, y luego son retiradas del laberinto. Luego de un periodo de demora son regresadas al tercer brazo de nuevo y, en este segundo ensayo, las ratas deben acudir al brazo que no han visitado, para ser recompensadas. Si visitan el mismo brazo que en el ensayo anterior se pierden la recompensa en ese ensayo. Así, en cada ensayo las ratas tienen que mantener en memoria de trabajo espacial qué brazo ya visitaron la última vez y el experimento puede continuar por muchos ensayos.

Se sabe que las ratas y otros animales tienden a explorar 2 o más sitios iterativamente sin reforzamiento [28], es decir, sin que sean motivadas u obligadas a hacerlo. En estas tareas se explota esta conducta innata de las ratas y, además, se refuerza, de manera que las ratas no necesitan aprender reglas ni generar memoria de referencia, la cual es un tipo de memoria que podría ser adquirida con entrenamiento repetido y persistir desde días hasta meses [27].



**Figura 9. Las tareas para evaluar memoria de trabajo se basan en la iteración espontánea de las ratas.** Tomada de [27].

Se han usado otras tareas para evaluar memoria de trabajo de objeto y olfatoria en roedores, en las cuales presentaban un estímulo nuevo en cada ensayo. Ennaceur et. al. desarrollaron una tarea en donde las ratas tenían que elaborar y usar una memoria de trabajo de objeto (Fig. 10A; [29]). En ella, a las ratas se les presentaban dos objetos idénticos, los cuales tenían que explorar, y después de cierto periodo de exposición, los sujetos eran retirados de la caja donde se encontraban e iniciaba el periodo de demora. Terminado éste, las ratas eran regresadas a la caja donde se encontraba con uno de los objetos del ensayo anterior y otro objeto nuevo. Si las ratas exploraban por más tiempo el objeto nuevo, en comparación con el tiempo

que le dedicaron al objeto familiar en el ensayo anterior, eran recompensadas.

En otra tarea similar, Dudchenko et. al. [30] evaluó memoria de trabajo olfativa cuando les presentó a las ratas un plato con un olor particular que tenían que rascar para obtener la recompensa que estaba dentro del plato (Fig. 10B). Luego de una demora fuera de la caja, las ratas eran devueltas a la caja, en donde se les presentaba un plato que dependía el aroma que ya conocían y otro plato con una nueva esencia, que era el único con recompensa dentro. De modo que las ratas sólo eran recompensadas si rascaban el plato nuevo. En los ensayos consecutivos, a las ratas se les presentaba un aroma nuevo cada vez, pero no eran retirados los que ya les habían presentado antes. De manera que las ratas tenían que almacenar en memoria de trabajo qué aromas ya habían sido presentados a lo largo de la sesión.

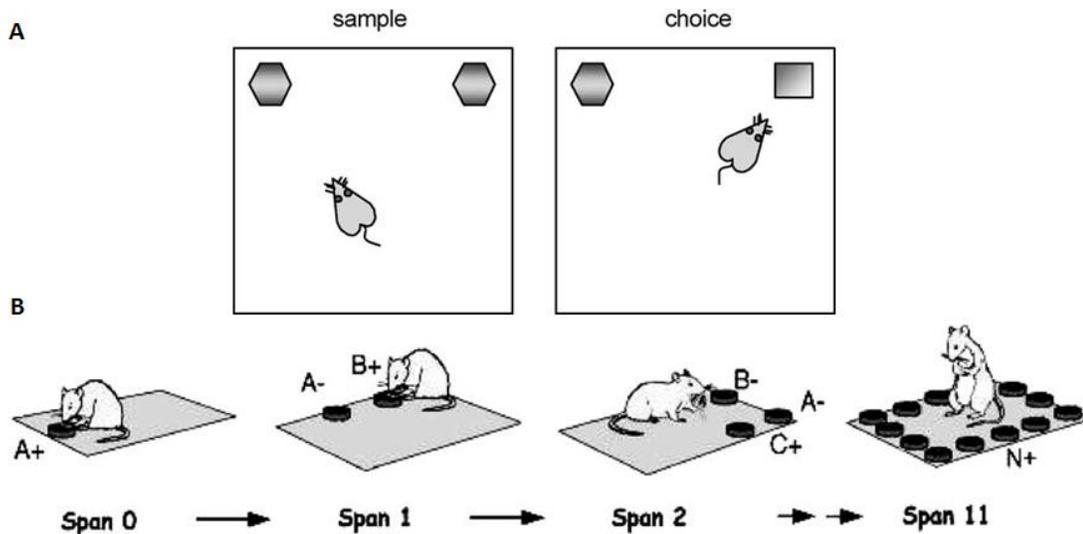


Figura 10. La exploración espontánea puede ser la conducta con la que las ratas resuelven algunas tareas para evaluar memoria de trabajo Tomada de [27].

Al igual que los laberintos en T y de 8 brazos, estas tareas explotan conductas innatas de las ratas, como es la exploración espontánea de nuevos objetos [27]. Además, es limitada la oportunidad de evaluar si los estímulos son retenidos en la memoria de trabajo, aún cuando se presenten más de una vez.

Por otro lado, no existen tareas diseñadas para evaluar una memoria de trabajo que sea evocada por un estímulo gustativo familiar. Aún más, estas tareas resultan inadecuadas para evaluar la representación neuronal de la memoria de trabajo, dado que ofrecen poca o nula oportunidad de estudiar cómo las neuronas mantienen la información de un mismo estímulo en suficientes ensayos como para poder extraer conclusiones sólidas.

## OBJETIVO

---

Diseñar y validar una tarea conductual que nos permita determinar, por primera vez, si los roedores son capaces de mantener en la memoria de trabajo un trazo gustativo. El diseño de esta tarea conductual también nos podrá servir para en un futuro encontrar los correlatos neuronales de la memoria de trabajo gustativa.

## HIPÓTESIS

---

Los roedores no sólo son capaces de usar la memoria de trabajo de un trazo gustativo para retener información relevante como la identidad de un sabor, sino también pueden usarla para compararla con otro sabor y guiar su conducta a un objetivo dado.

## METODOLOGÍA

---

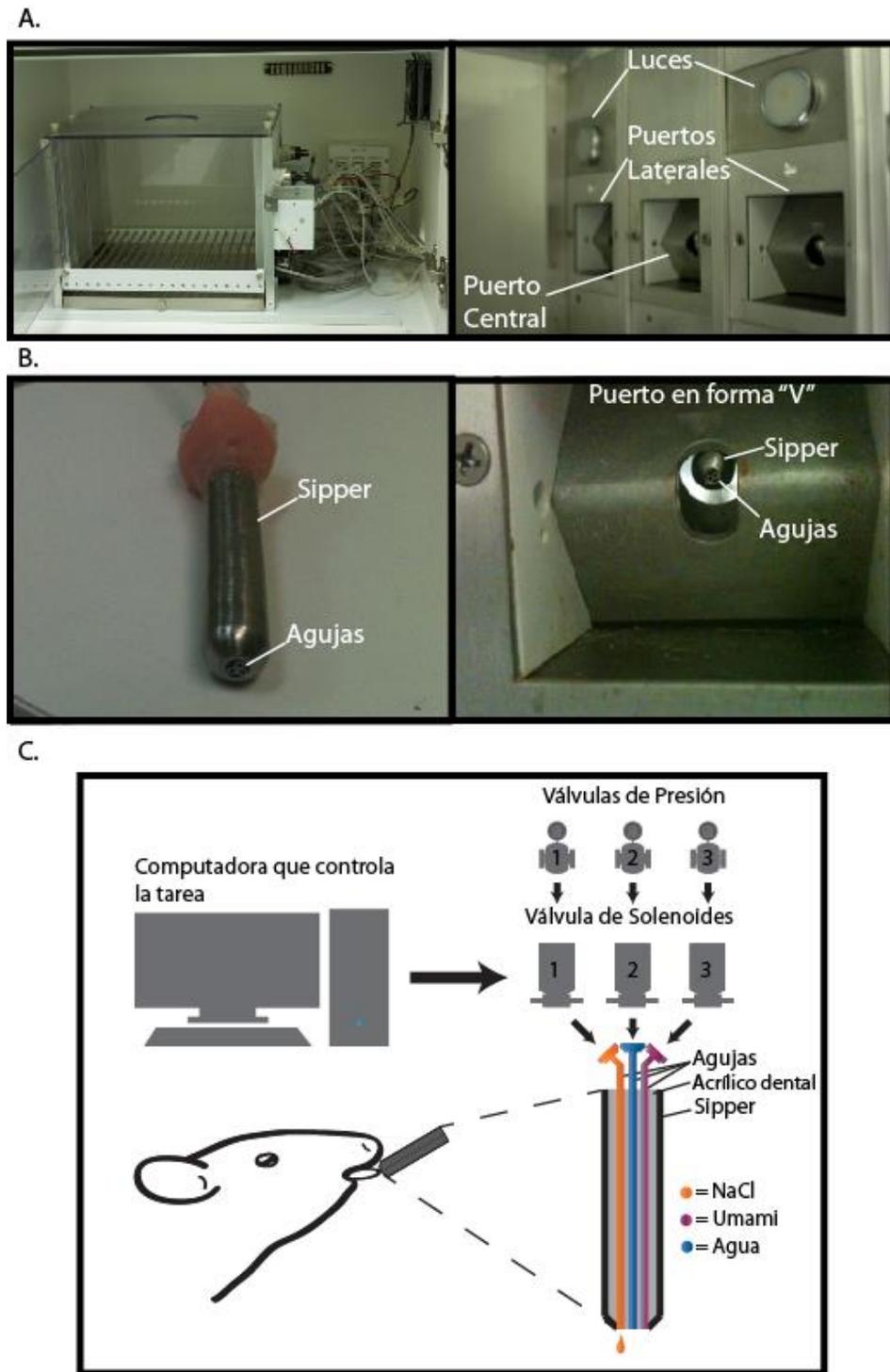
### Materiales

---

La tarea fue controlada a través de un sistema de hardware capaz de recibir *inputs* (como los momentos del lengüeteo) y mandar *outputs* (como el encendido de las luces y la liberación de las diferentes gotas de soluciones). Dicho hardware es coordinado mediante un *script* que nosotros diseñamos (MedAssociates, Inc.). El registro de *inputs* y el diseño de códigos de programación (MATLAB 2010b) nos es útil para analizar la conducta de las ratas cuando ejecutan la tarea GDMS.

Todos los experimentos se realizaron en un cubículo con atenuación del sonido exterior, temperatura y humedad controladas (~ 21°C y ~50%, respectivamente). La caja conductual (Fig. 11A izquierda, MedAssociates, Inc.), donde las ratas desempeñaban la tarea, contaba con tres puertos en forma de "V", uno central y dos laterales, y dos luces posicionados en la misma pared (Fig. 11B derecha). A cada puerto se le instaló un *photobeam*, que las ratas sólo pueden cortar con cada lengüeteo (10 ms de resolución), para registrar esa conducta, y un *sipper* (Fig. 11B) donde eran liberados los estímulos gustativos. Como se muestra en la Fig. 11C, los estímulos eran liberados, a fuerza de presión de aire controlada por válvulas de presión para cada líquido, a través de la apertura durante 10 ms de válvulas de solenoides controladas por computadora mediante un transductor. Cada válvula de solenoide estaba conectada a una aguja insertada dentro del *sipper*. Cada *sipper* estaba compuesto por una (puertos laterales) o tres (puerto central) agujas de acero inoxidable de 16 GX2" (1.60X51mm, 145ml/min, Punzocat, Fig. 11C) fijadas con acrílico dental permitiendo muy poco espacio muerto. Diariamente, se calibraban las válvulas de presión de aire con el objetivo de obtener los volúmenes de gota deseados. Asimismo, dado que, al accionarse, cada válvula de solenoide produce un sonido particular que las ratas pueden usar como información adicional para resolver la tarea, cada

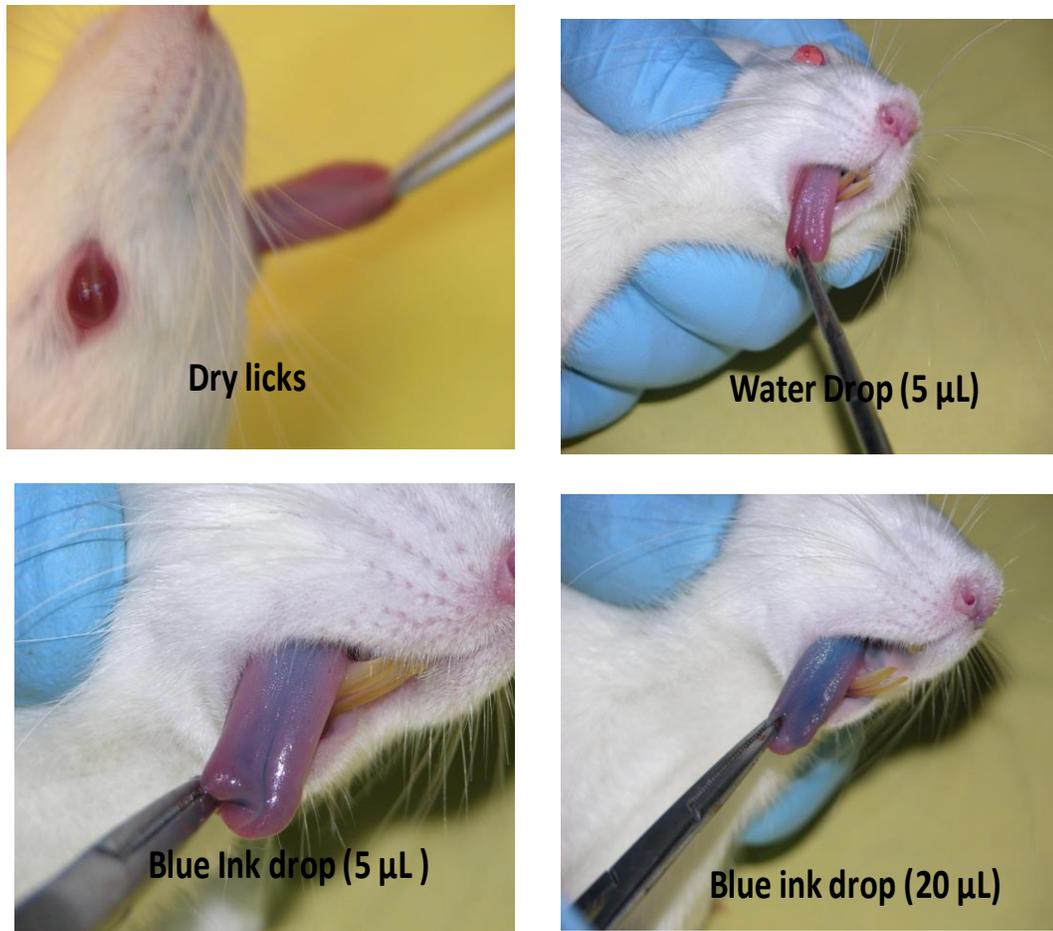
día los estímulos gustativos eran liberados de una válvula diferente, de manera aleatoria.



**Figura 11. Caja conductual y sistema de liberación de pistas gustativas.** A) a la izquierda se muestra una fotografía del interior de la caja conductual donde se llevaron a cabo los experimentos y a la derecha una fotografía de la pared de la misma caja donde se encontraban

tres puertos de lengüeteo y dos luces. B) se muestra una fotografía del *sipper* completo (izquierda) usado en el puerto central (derecha) por el cual se liberaban las pistas gustativas. C) esquema del sistema de liberación de pistas gustativas. Una computadora controla las válvulas de solenoides por donde los estímulos gustativos pasan empujados por presión de aire. La presión con la que era liberado cada estímulo era controlado por válvulas de presión independiente. Cada válvula de solenoides estaba conectada a una aguja dentro del *sipper*. Las agujas eran fijadas con acrílico dental.

Validaciones previas hechas en nuestro laboratorio (Fig. 12A) corroboraron que: 1) una gota de líquido (azul de toluidina) desde 5  $\mu$ l de volumen, liberada en un sólo lengüeteo a través de este sistema, es capaz de bañar toda la superficie de la lengua de la rata y una de 20  $\mu$ l cubre la superficie de toda la cavidad oral; 2) cuando los líquidos de cada aguja se liberan, lo hacen de manera independiente y ningún otro líquido es expulsado en ese momento y; 3) después de la liberación de una gota no quedan residuos de la misma en la superficie del *sipper*, de manera que las ratas no tienen contacto con ningún líquido cuando estos no son liberados. Dado que las diferentes pistas gustativas que se liberan en el puerto central son fijadas en el mismo *sipper*, las ratas no pueden predecir mediante el olfato qué sabor van a recibir.



**Figura 12. Una gota desde 5 µl de volumen, liberada por nuestro sistema, es capaz de bañar toda la lengua de la rata y no se mezcla con otros líquidos.** En la fotografía superior izquierda se muestra la lengua de la rata luego de lengüetear un *sipper* cargado con agua, azul de toluidina y rojo sin que nuestro sistema liberar alguno de estos líquidos (lengüeteos en seco). A la derecha se observa la lengua de la rata luego de lengüetear en el mismo *sipper* cuando fue liberada una gota de 5 µl de agua. Note que la lengua tiene el mismo color que cuando la rata lengüeteó en seco. La imagen inferior izquierda es de la lengua de la rata luego de que ésta recibió una gota de 5 µl de azul de toluidina. Note que toda la lengua se manchó de azul, pero no de rojo, indicando que no hay mezcla de los líquidos cargados en el *sipper*. Una gota de 20 µl (abajo a la derecha) mancha con mayor intensidad la lengua sólo de color azul.

Las soluciones usadas fueron adquiridas de Sigma Aldrich preparadas diariamente y tuvieron como base agua bi-destilada. Las concentraciones para cada pista gustativa fueron las siguientes: NaCl a 0.2 M, umami a 0.2 M y sacarosa 0.5 M (20%). El volumen de las gotas de todas las pistas fue de 10 µl.

## Sujetos

---

Se usaron 9 ratas macho Sprague-Dawley que al inicio del experimento pesaban entre 300-350 g y fueron sometidas a un ciclo de luz-obscuridad de 12/12 h. Las sesiones experimentales fueron realizadas en la fase de luz y tuvieron una duración de 40 min. Luego de cada sesión las ratas tenían agua disponible durante 1 h y luego eran privadas de la misma hasta la sesión del día siguiente. Las ratas descansaban un día a la semana, en el cual tenían agua durante 24 h y nunca fueron privadas de alimento.

## Tarea conductual

---

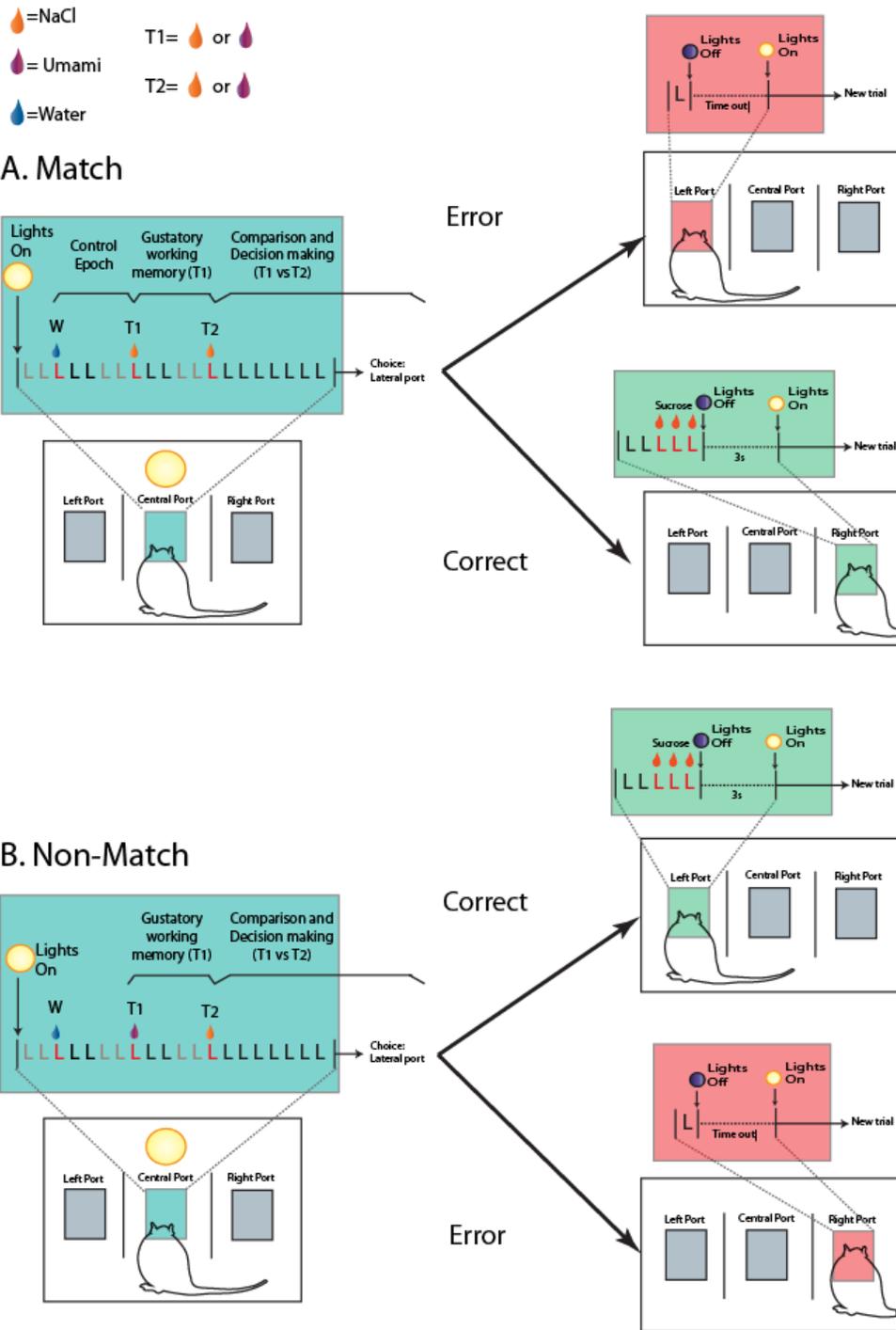
Nosotros diseñamos y estandarizamos una tarea para ratas en libre movimiento que llamamos *Gustatory delay-match to sample* (GDMS, Fig. 13), la cual nos será útil para evaluar si las ratas son capaces de mantener en la memoria de trabajo un trazo gustativo para guiar la conducta a un objetivo dado. Cada ensayo de dicha tarea inicia con el encendido de un par de luces, luego del cual la rata tiene que lengüetear de 1 a 3 veces en el puerto central de una caja conductual, donde recibe aleatoriamente una gota de agua que actúa como lavado de boca. Aleatoriamente, luego de otros 3 a 5 lengüeteos recibe una gota de un sabor que llamamos T1 (*taste 1*) y que puede ser NaCl o umami. Después de dar un número aleatorio de entre 3 y 5 lengüeteos, la rata tiene que mantener la memoria del estímulo gustativo T1 hasta recibir la gota de un segundo sabor (T2, *taste 2*), que puede ser el mismo sabor (*match*; Fig. 13A), o uno diferente que en T1 (*non-match*; Fig. 13B). De manera que para resolver la tarea conductual, el animal tiene que generar una memoria de trabajo gustativa única y exclusivamente durante el periodo comprendido entre T1 y T2. De igual forma, el periodo agua-T1 nos sirve como un periodo control en donde el animal está lengüeteando pero no requiere generar la memoria de trabajo gustativa.

Dividimos en dos grupos a los sujetos de estudio. Para que los sujetos del grupo 1 (n=6) sean recompensados (con 3 gotas de sacarosa), los animales

deben ir al puerto derecho de la caja conductual si las pistas T1 y T2 son iguales, o al puerto izquierdo si son diferentes. Por su parte, las ratas del grupo 2 (n=3) para ser recompensadas (con 3 gotas de sacarosa) deben ir al puerto izquierdo si las pistas T1 y T2 son diferentes, o al puerto derecho si son iguales. Las luces se apagan una vez recibida la recompensa y se vuelven a prender 3 s después, indicando el inicio de un nuevo ensayo. Si la rata acude al puerto equivocado las luces se apagan inmediatamente y se mantienen así durante 15 s (tiempo fuera, que sirve como castigo), hasta el inicio de un nuevo ensayo.

La disposición aleatoria del número de lengüeteos que la rata tiene que dar para recibir un estímulo gustativo (agua, T1 o T2) es usada como control para que la rata no pueda predecir cuándo tiene que activar su memoria de trabajo gustativa ni cuánto tiempo tiene que mantenerla, efecto que debe verse reflejado en la actividad de la neuronas que codifican este proceso cognitivo. También nos permite sub-clasificar los ensayos en sub-grupos con distintos intervalos de tiempo entre agua-T1 y T1-T2 y analizar la conducta de la rata en cada sub-grupo.

## Gustatory Delay Match to Sample Task



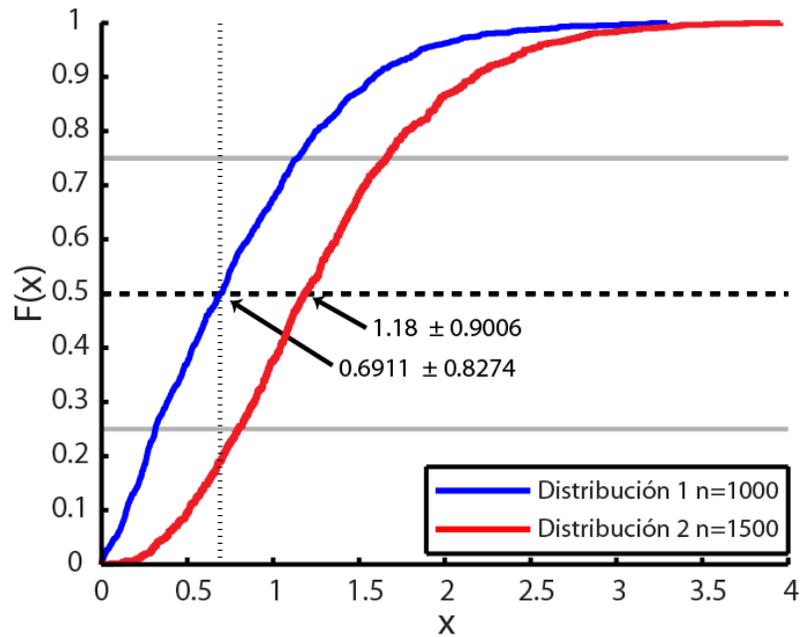
**Figura 13. Esquema de la tarea Gustatory delay-match to sample.** A) *match trial*. Abajo. B) *non-match trial*. Las pistas gustativas (agua -w-, sabor 1 -t1- y sabor 2 -t2-) pueden ser liberadas cuando la rata de un número aleatorio de lengüeteos (l) que están marcados en gris, mientras que los marcados en negro son lengüeteos en donde no recibirá nada. En el ejemplo la rata recibió las pistas gustativas en los lengüeteos marcados en naranja.

## Análisis de la conducta

---

Establecimos un criterio mínimo de 40 ensayos por sesión para excluir del análisis aquellas sesiones donde las ratas no estaban suficientemente motivadas para realizar la tarea.

Así mismo, nosotros analizamos en conjunto todos los datos conductuales de las ratas de cada grupo clasificado en función de su desempeño y usamos gráficas de la Función de la Distribución Acumulada (FDA) para comparar distintas distribuciones de esos datos, como la duración de los periodos de la tarea en distintas condiciones. La FDA es muy útil ya que se pueden visualizar todos los valores en un mismo gráfico. Además, es posible comparar dos o más distribuciones en ese plano. En la Figura 14 se muestra un ejemplo, proveniente de dos distribuciones generadas aleatoriamente, de este tipo de gráfico. La línea negra punteada horizontal que se encuentra a 0.5 del eje de las ordenadas cruza las medianas de las dos distribuciones, mientras que las líneas sólidas grises en 0.25 y 0.75 de este mismo eje representan el primer y tercer cuartil, respectivamente, de donde se extrae el rango intercuartil (IQR). El eje de las abscisas representan los valores reales de las distribuciones. En el texto sobre el plano se muestran las medianas  $\pm$  IQR para las distribuciones. Así mismo, en la leyenda se puede notar que los tamaños de las distribuciones (esto es, sus "n") son diferentes y, sin embargo, pueden compararse en el mismo plano. Por último, la línea punteada vertical señala dónde se encuentra la mediana más pequeña de todas las distribuciones. Estas convenciones se mantendrán para todas las FDAs presentadas aquí, a menos que se señale de otra forma.



**Figura 14. Ejemplo de gráfico de función de distribución acumulada.** En este ejemplo dos distribuciones de distinto tamaño pueden ser comparadas en el mismo gráfico. Todos los valores de la misma pueden leerse en el eje de las abscisas. La línea punteada horizontal a 0.5 en las ordenadas cruza las dos distribuciones por sus medianas, indicadas cada una por las flechas  $\pm$  sus rango intercuartil (IQR). Las líneas grises horizontales cruzan el primer y tercer cuartil de cada distribución. Por último, la línea punteada vertical cruza la mediana más pequeña de las distribuciones graficadas. Para las siguientes FDAs que aquí se presenten sólo se mostrarán las líneas punteadas horizontal y vertical, y las medianas  $\pm$ IQR de cada distribución en la parte superior izquierda del plano. Asimismo, los valores de las estadísticas y los valores p resultantes también se mostraran en cada gráfica de este tipo.

---

## Desempeño

---

Usamos dos índices para conocer el grado de aprendizaje de cada rata por cada sesión durante toda la fase de entrenamiento: la Fracción de Respuestas Correctas (FRC) y el  $d'$ . El primero resulta dividiendo el número de respuestas correctas (de ensayos correctos) entre el número total de ensayos de cada sesión.

El segundo índice, el  $d'$ , también calculado para cada sesión de entrenamiento, lo empleamos para saber si las ratas resuelven la tarea dirigiendo su conducta usando la identificación y la comparación de los estímulos gustativos, y no de manera azarosa. Para obtener este índice clasificamos los ensayos según los estímulos recibidos por la rata y la respuesta de ésta ante ellos (Fig. 15). Los ensayos en donde las ratas

recibieron dos estímulos iguales (ensayos *Match*) y las ratas respondieron correctamente (el grupo 1 a la derecha y el grupo 2 a la izquierda) fueron clasificados como *Hits*. Los ensayos *Match* donde las ratas respondieron en el puerto equivocado fueron clasificados como *Miss*. Los ensayos donde los estímulos fueron diferentes (ensayos *Non-Match*) y se registraron respuestas correctas (en el grupo 1 repuestas a la izquierda y en el grupo 2 respuestas a la derecha) fueron clasificados como *Correct Rejections*. Por último, los ensayos *Non-Match* con respuestas que fueron incorrectas fueron clasificados como *False Alarms*. Posteriormente, para cada sesión se contaron cuántos ensayos de cada tipo hubo y se calcularon dos cocientes:

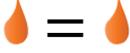
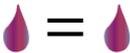
$$PFA = \frac{False\ Alarms}{(False\ Alarms + Correct\ Rejections)}$$

$$PH = \frac{Hits}{(Hits + Misses)}$$

Donde, *PFA* es la proporción de *False Alarms* y *PH* es la proporción de *Hits*. Por último el *d'* es el resultado del siguiente cálculo:

$$d' = Z(PH) - Z(PFA)$$

Donde *Z* es el número *z* (mayor que 0 y menor que 1) de cada proporción (*PH* o *PFA*). De manera que el *d'* representa el grado de discriminación, en valores de desviación estándar, que los sujetos tuvieron a la hora de distinguir entre los diferentes estímulos (estímulos *Match* vs. estímulos *Non-Match*).

		Respuesta			
		Grupo 1		Grupo 2	
		Derecha	Izquierda	Izquierda	Derecha
Estímulo	Match	<b>HIT</b> (correcto)		<b>MISS</b> (error)	
	 				
	Non Match	<b>FALSE ALARM</b> (error)		<b>CORRECT REJECTION</b> (correcto)	
	 				

**Figura 15. Tabla de contingencia estímulo-respuesta.** Cada ensayo se clasificó en función del tipo de estímulo que la rata recibió (*match* o *non-match*; hileras ) y la respuesta que dio ante este estímulo (correcta o incorrecta; columnas). Las gotas representan los dos sabores que empleamos (sal y umami). Dado que contrabalanceamos los experimentos, los grupos 1 y 2 de ratas (arriba) respondían de manera opuesta para dar respuestas correctas.

### Lengüeteo

Para conocer la modulación en el ritmo del lengüeteo en función de diferentes parámetros fueron calculados los Intervalos Inter-Lengüeteo (IILs). Cada IIL es el intervalo de tiempo que transcurre entre un lengüeteo y el siguiente.

Así mismo, para cuantificar las pausas en el lengüeteo nosotros calculamos el Coeficiente de Variación 2 (CV2) [31], el cual compara cada IIL con el siguiente y se obtiene a partir de la siguiente fórmula.

$$CV2 = \left| \frac{2(IIL_2 - IIL_1)}{IIL_1 + IIL_2} \right|$$

## Análisis estadísticos

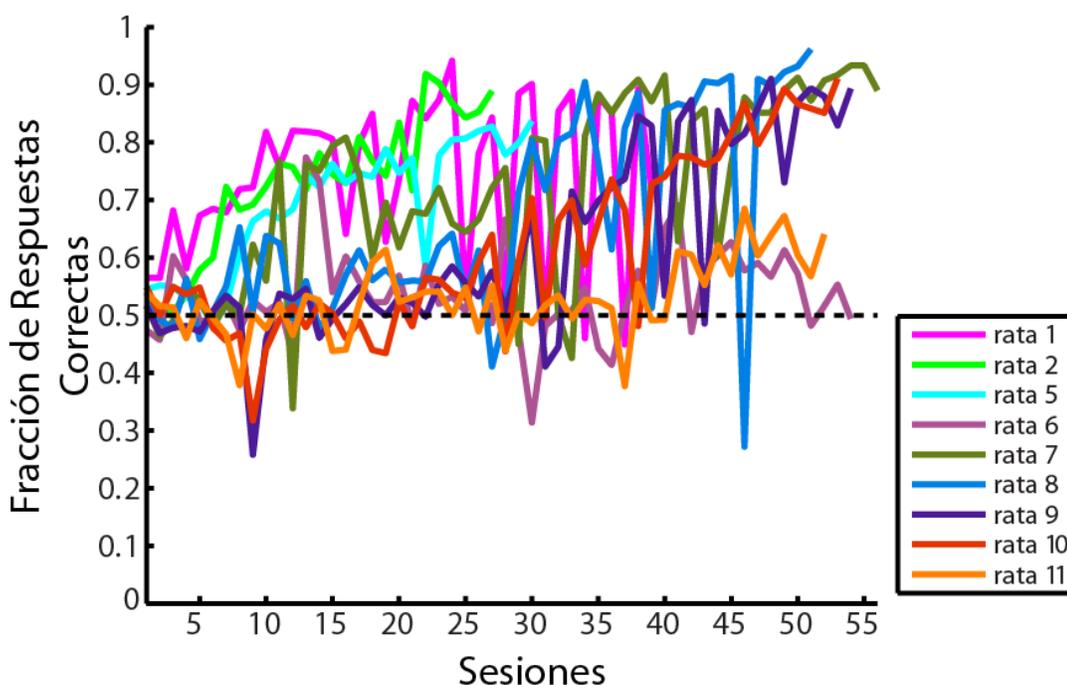
---

Para comparar dos distribuciones se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Cuando se compararon más de 2 distribuciones se usó la prueba de Kruskal-Wallis y un análisis *pos hoc* Bonferroni. Los valores de las estadísticas, el número de datos de cada distribución y los valores p resultantes se describen en las figuras correspondientes. Otras pruebas estadísticas usadas son mencionadas en el curso del texto.

## RESULTADOS

Las ratas son capaces de generar y usar la memoria de trabajo gustativa

Nueve ratas fueron sometidas a un periodo de entrenamiento promedio de 44.36 (SEM  $\pm$ 3.07) sesiones de entrenamiento. La fracción de respuestas correctas (FRC) de cada sesión fue calculada para medir el desempeño diario de las ratas (Fig. 16, ver sección de Metodología). Sin embargo, como se ve en la Figura 16 este análisis no permite distinguir qué animales progresaron en la tarea.



**Figura 16. La fracción de respuestas correctas no es un índice apropiado para cuantificar el progreso de los sujetos.** Se grafica la fracción de respuestas correctas (eje de las ordenadas) de cada sesión de entrenamiento (eje de las abscisas) de cada rata, ordenados por su orden cronológico. La línea punteada a 0.5 del eje de las ordenadas indica a qué nivel se encuentran las respuestas al azar.

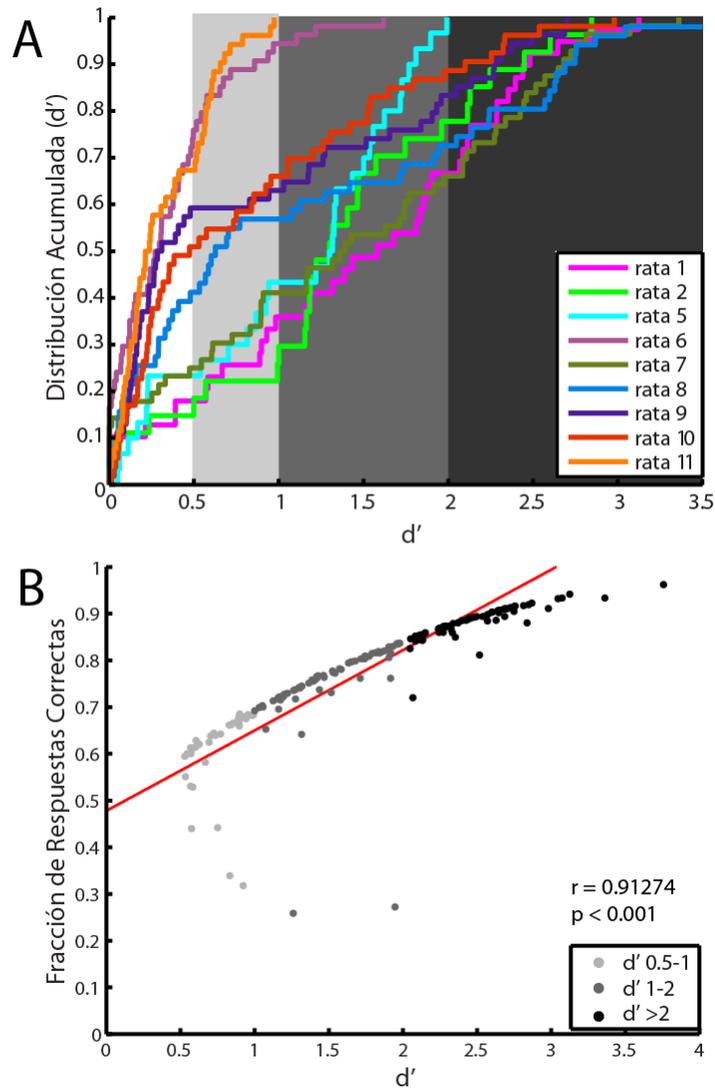
Por este motivo, para tener una medida adicional de desempeño, basados en la discriminación gustativa (ver sección de Metodología), nosotros usamos el índice de discriminación  $d'$  y recurrimos a éste para determinar que las ratas resuelven la tarea GDMS usando los estímulos gustativos como pistas para guiar su conducta correctamente y no de manera azarosa. Como se observa

en la Figura 17A, sólo 6 de las 9 ratas que entrenamos (.66%; ratas 1, 2, 7, 8, 9 y 10) presentó sesiones con valores de  $d'$  superiores a 2, suficiente para afirmar que las ratas tomaron decisiones correctas basadas en la discriminación gustativa. El número de sesiones necesarias para que cada rata lograra esto y el porcentaje de sesiones con  $d' \geq 2$  fueron: rata 1, 18 sesiones, 33.33%; rata 2, 22 sesiones, 22.22%; rata 7, 34 sesiones, 33.93%; rata 8, 34 sesiones, 27.45%; rata 9, 38 sesiones, 16.66%; y rata 10, 46 sesiones, 11.32%. En promedio las ratas demoraron 32 (SEM  $\pm 4.2269$ ) sesiones para alcanzar  $d' \geq 2$  y 23.92% de las sesiones de esas ratas presentan tales valores.

El total de las sesiones de estas ratas fueron divididas en 3 fases de discriminación: Fase de Discriminación Baja, que contiene las sesiones con valores del  $d'$  entre 0.5 y 1 (Fig. 17A, sesiones con el fondo de gris más claro); Fase de Discriminación Media, que contiene las sesiones con valores del  $d'$  entre 1 y 2 (Fig. 17A, sesiones con el fondo de gris medio); Fase de Discriminación Alta, que contiene las sesiones con valores del  $d'$  mayores o iguales a 2 (Fig. 17A, sesiones con el fondo de gris más oscuro). De manera independiente, analizamos las sesiones de entrenamiento de las ratas que no alcanzaron una discriminación alta ( $d' \geq 2$ ; ratas 5,6 y 11), y estas sesiones fueron divididas en Fase de Discriminación Baja y Media (de acuerdo a los mismos rangos descritos arriba).

Por último, corroboramos que el  $d'$  estuviera relacionado (Fig. 17B) con el desempeño. Usando el coeficiente de correlación de Pearson, comparamos los valores de  $d'$  de todas las sesiones de entrenamiento con la FRC de esas mismas sesiones y encontramos una correlación entre ambos índices con una  $r$  de 0.91274 ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, como se puede observar en la Figura 17B, aunque algunas sesiones tengan FRC parecidas, pueden diferir más en cuanto al  $d'$  que presentaron, lo que sugiere, una vez más, que éste último índice es más sensible al desempeño de las ratas, lo que lo hace ideal para evaluar el efecto del aprendizaje en la conducta. De ahí que para

ulteriores análisis, usáramos la clasificación arriba descrita para evaluar la conducta de las ratas en función al aprendizaje, así como para determinar en qué sesiones (las de Fase Alta) las ratas usan la memoria de trabajo como estrategia principal para dirigir su conducta en la tarea GDMS.



**Figura 17. Las ratas pueden generar una memoria de trabajo gustativa y usarla para resolver la tarea GDMS.** En el panel A se muestra la distribución acumulada del  $d'$  de las sesiones (eje de las abscisas) de cada rata. Se dividieron las sesiones en función al  $d'$  que presentaron: las sesiones de fase baja de discriminación con  $d'$  entre 0.5 y 1 tienen fondo gris claro; las de fase media de discriminación con  $d'$  entre 1 y 2 tienen gris medio; y las de fase alta de discriminación con  $d' \geq 2$  tienen fondo gris fuerte. En el panel B se grafica la correlación entre el  $d'$  (eje de las abscisas) y la fracción de respuestas correctas (eje de las ordenadas) de cada sesión de entrenamiento (puntos en el plano). Las sesiones clasificadas en la fase baja están coloreadas de gris claro, las de fase media de gris medio y las de fase alta de gris oscuro. Se muestra también los valores  $r$  y  $p$ , resultantes de una correlación de Pearson de dichos valores.

Con estos resultados demostramos, por primera vez, que las ratas pueden generar y usar una memoria de trabajo de un trazo gustativo para dirigir su conducta hacia un objetivo determinado.

Nosotros, además, caracterizamos la conducta de las ratas durante las sesiones de entrenamiento de la tarea GDMS con el objetivo de establecer el correlato conductual de la memoria de trabajo gustativa, así como para saber qué estrategias usaron las ratas para resolver esta tarea. Los siguientes datos que presentamos son el resultado de estos análisis.

*Con el aprendizaje el lengüeteo de las ratas se vuelve más rítmico y estereotipado*

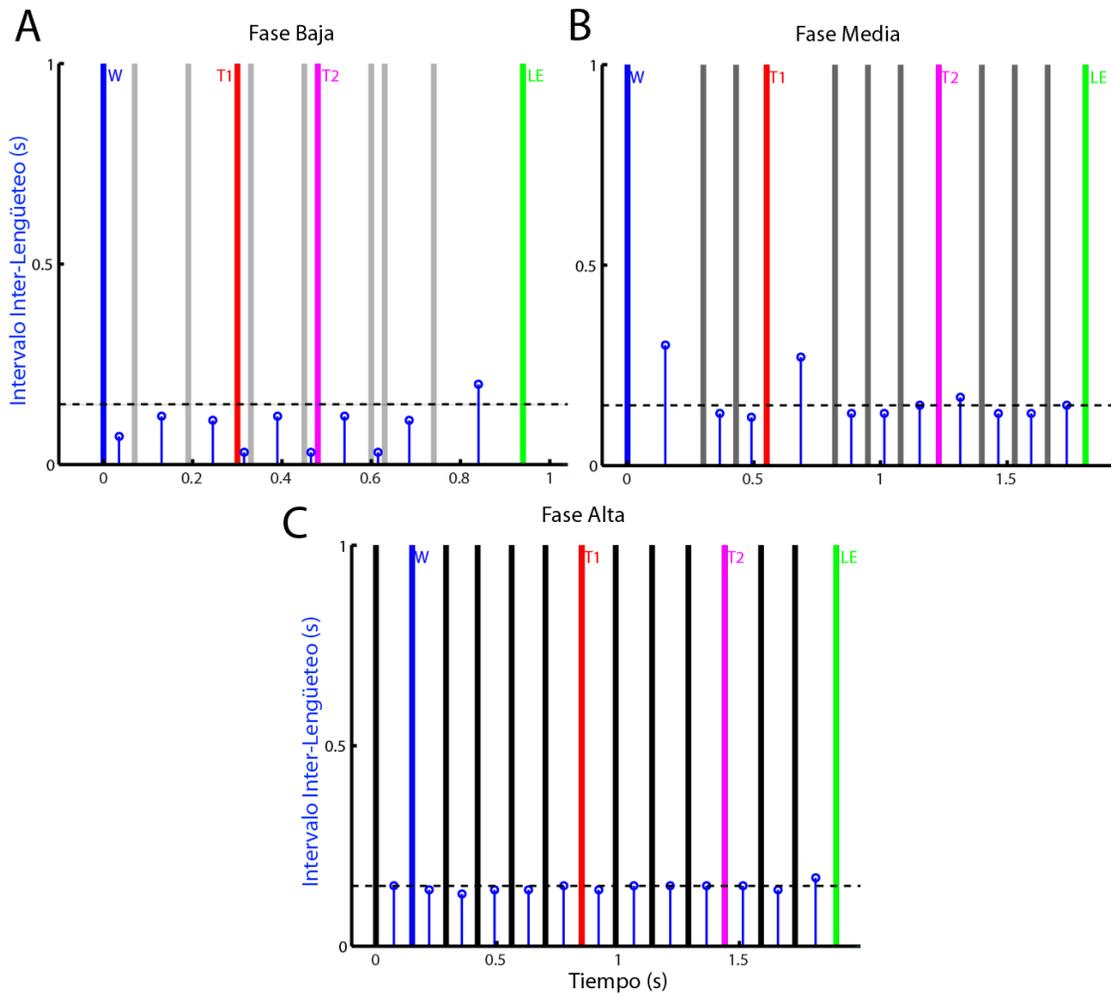
---

*El lengüeteo se hace más rítmico en función del aprendizaje*

---

Para saber si el aprendizaje tuvo algún impacto sobre el ritmo del lengüeteo de las ratas, nosotros comparamos los Intervalos Inter-Lengüeteo (IILs) de los lengüeteos que las ratas dieron durante los periodos control (desde que reciben la gota de agua hasta que reciben T1), memoria de trabajo (entre los estímulos gustativos T1 y T2) y de toma de decisión (desde T2 hasta el último lengüeteo adicional) en función del aprendizaje.

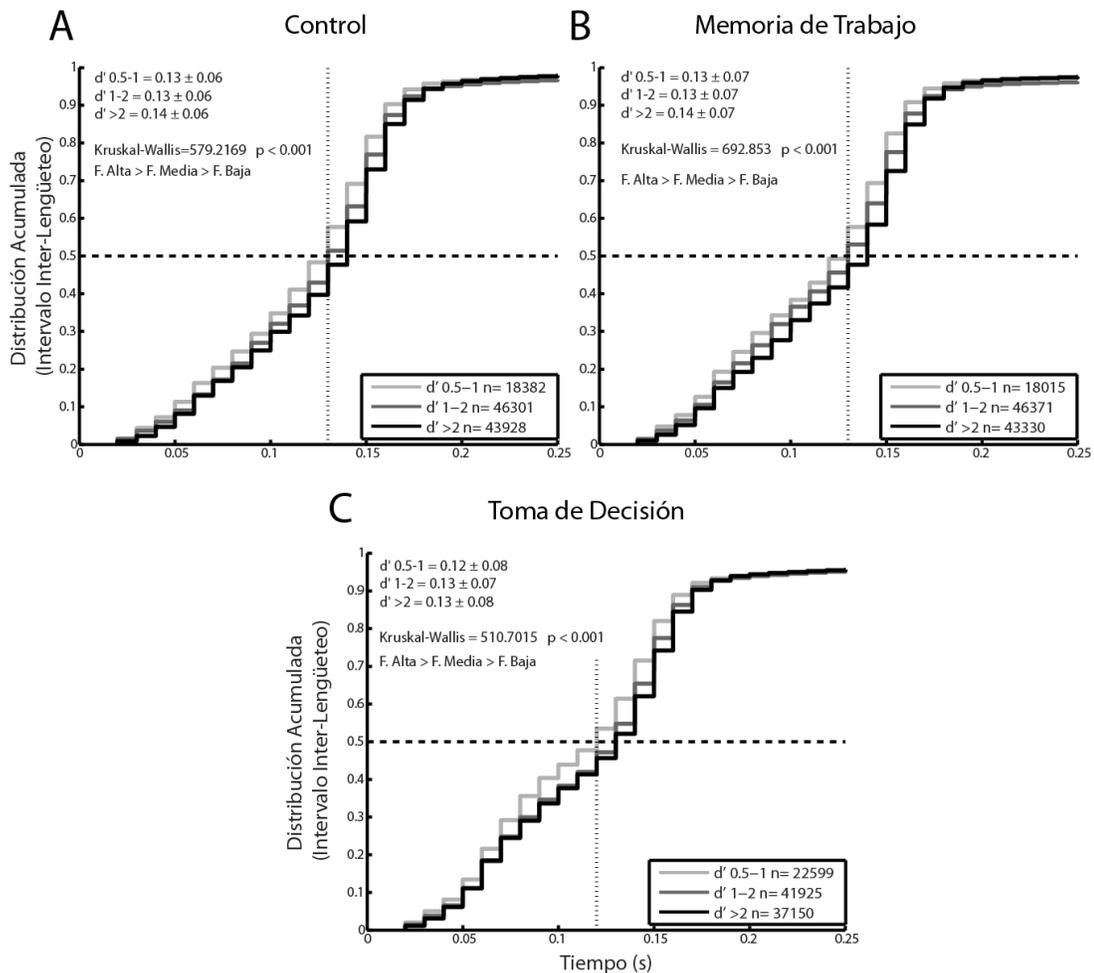
En la Figura 18 se muestran ejemplos de 3 ensayos de una misma rata pero provenientes de sesiones de diferente Fase de aprendizaje. El ensayo graficado en la Figura 18A proviene de una sesión de Fase Baja de entrenamiento y de inmediato salta a la vista que los IILs son muy variables entre sí, mostrando una marcada arritmia en el lengüeteo. Si observamos el ensayo de Fase Media graficado en la Figura 18B, podemos observar que los IILs son más homogéneos y que la mayoría de ellos presentan valores cercanos a 150 ms. Por último, en la Figura 18C el ensayo que se grafica muestra una gran ritmicidad en el lengüeteo que durante todo el ensayo se mantiene alrededor de 150 ms. Este efecto de homogeneización e incremento de la ritmicidad en función del aprendizaje también se observa como una constante en todos los ensayos de Fase Alta.



**Figura 18. Las ratas conservan el patrón rítmico del lengüeteo (~140ms) en la totalidad de un ensayo de máxima discriminación.** Cada línea vertical en gris claro (A), gris medio (B) o gris oscuro (C) representa un lengüeteo en el tiempo (alineado al primer lengüeteo del ensayo; eje de las abscisas). En los lengüeteos en azul la rata recibió la gota de agua (*w*, *water*), en los rojos recibió el primer estímulo gustativo (T1), en los magentas recibió el segundo estímulo (T2) y los lengüeteos verdes fueron los últimos lengüeteos adicionales (*le*, *lick end*) que la rata dio después de recibir t2 y antes de acudir a un puerto lateral. Además, entre cada lengüeteo graficado se muestra el IIL correspondiente (líneas azules con una marca en forma de círculo), es decir, el tiempo que transcurrió entre el lengüeteo anterior y el siguiente (eje de las ordenadas; ver sección de metodología); y la línea punteada horizontal dibujada a 0.15 s en el eje de las ordenadas representa la media de los IILs de las ratas cuando lengüetean para beber un líquido *ad libitum*. En el panel a se muestra un ensayos de fase baja, en el b uno de fase media y en el c uno de fase alta, todos de la misma rata.

Las pruebas de Kruskal-Wallis de todos los IILs de las ratas que aprendieron mostró que existen diferencias entre las diferentes fases y una prueba *pos hoc* reveló que los IILs son más grandes en la Fase Alta que las fases baja y media, y a su vez, que los IILs de la fase media son más grandes que en la Fase Baja. Esto ocurrió para los IILs

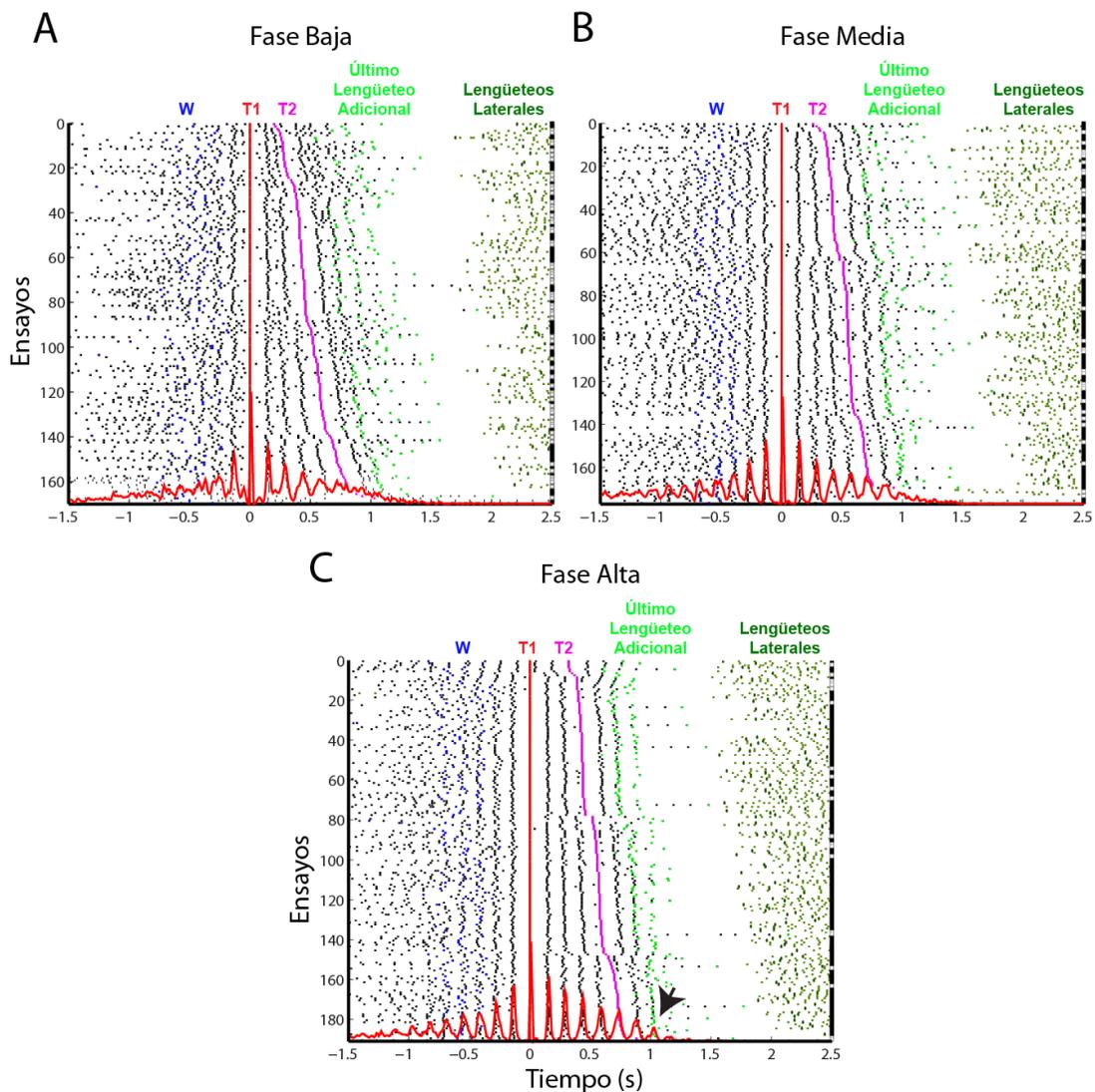
de los periodos control, de memoria de trabajo y de toma de decisión. En la Figura 19 se grafican estos datos y se puede observar que, para los periodos control (Fig. 19a) y de memoria de trabajo (Fig. 19b), las curvas de los IILs de las Fases Media y Alta (curvas gris medio y oscuro, respectivamente) se encuentran a la derecha con respecto a la de la Fase Baja (curva gris claro). Este efecto se ve reflejado también en sus medianas: del periodo control,  $0.13\pm 0.06$ ,  $0.13\pm 0.06$  y  $0.14\pm 0.06$  ms (Fases Baja, Media y Alta, respectivamente) y del periodo de memoria de trabajo,  $0.13\pm 0.07$ ,  $0.13\pm 0.07$  y  $0.14\pm 0.07$  ms (Fases Baja, Media y Alta, respectivamente). Mientras que para el periodo de toma de decisión (Fig. 19c) las medianas fueron muy similares para las Fases Media y Alta ( $0.13\pm 0.07$  y  $0.13\pm 0.08$ , respectivamente) pero más grandes que la de la Fase Baja ( $0.12\pm 0.08$ ). No obstante lo anterior, sí existieron diferencias estadísticas entre ellas, siendo la distribución de fase alta la más grande y la de fase baja la más pequeña. Resumiendo lo anterior, podemos decir que estas ratas modularon su lengüeteo con el aprendizaje y en aquellas sesiones con un alto grado de discriminación el ritmo del lengüeteo fue más parecido al que ocurre durante el lengüeteo consumatorio de un liquido.



**Figura 19. El lengüeteo se hace más rítmico en función del aprendizaje.** Se muestran las distribuciones acumuladas del intervalo inter-lengüeteo (IILs) de los lengüeteos que ocurrieron en el periodo control (A), de memoria de trabajo (B) y de toma de decisión (C). Los valores de los IILs de las 3 gráficas se expresan en segundos (eje de las abscisas). Las curvas gris claro representan a los IILs que ocurrieron en las sesiones de Fase Baja ( $d' 0.5-1$ ), las curvas gris medio son los IILs de Fase Media ( $d' 1-2$ ) y las curvas gris oscuro con los IILs de Fase Alta ( $d' \geq 2$ ).

El incremento en la ritmicidad del lengüeteo se hace más evidente al examinar las gráficas tipo raster del lengüeteo. En la Figura 20 muestro 3 de estas gráficas, cada una de una sesión de una Fase de discriminación diferente, todas de la misma rata. Es claro que en la sesión de Fase Baja de discriminación el lengüeteo fue muy desorganizado (Fig. 20A; note que fue muy frecuente que entre un lengüeteo y el siguiente haya menos de 140 ms de diferencia). El histograma temporal peri-estímulo (HTPE) de esta sesión muestra cómo la rata lengüeteaba con mucha variabilidad. Este fenómeno desapareció gradualmente a medida que la rata progresó en cuanto a su

desempeño en la tarea, pues ya no se observa en la sesión de Fase Media (Fig. 20B), y aún menos en la de Fase Alta (Fig. 20C). De hecho, en ésta última es posible observar cómo los lengüeteos se suceden con el mismo intervalo de tiempo ( $\sim 140$  ms). Note, además, que HTPe de la sesión de Fase Alta reporta una gran regularidad en la actividad de lengüeteo, la cual es tan marcada que es posible conservar la resolución suficiente para observar cómo se alinean hasta los siguientes 7 lengüeteos que ocurrieron después de que la rata recibió el primer estímulo T1.



**Figura 20.** Con el aprendizaje, el lengüeteo se hace más rítmico y estructurado en la totalidad de una sesión de máxima discriminación. Se muestran 3 gráficas tipo raster de 3 sesiones distintas: una de Fase Baja de discriminación (A), otra de Fase Media (B) y otra de Fase Alta (C). Todas de la misma rata. En el eje de las ordenadas se presentan los ensayos de

toda la sesión y en el de las abscisas el tiempo en segundos. El tiempo 0 s corresponde al momento en que las ratas recibieron el primer estímulo gustativo T1 (marcas rojas). El lengüeteo (marcas negras) que ocurrió 1.5 s antes y 2.5 s después de t1 es graficado. Los ensayos de cada sesión fueron reordenados ascendentemente en función a la longitud en tiempo que hubo entre T1 y T2 (marcas magentas). Otros eventos alrededor de T1 son marcados: en azul, cuando la rata recibió una gota de agua; en verde claro, cuando la rata dio el último lengüeteo adicional; y en verde oscuro, los lengüeteos que la rata emitió en cualquiera de los puertos laterales. Un código de cuadros negros y blancos (a la derecha de cada gráfica) corresponden a los ensayos correctos e incorrectos, respectivamente. Por último, en la parte inferior de cada gráfica se muestra un histograma temporal peri-estímulo (HTPE; línea roja) del lengüeteo que ocurrió en dicha ventana de tiempo. La flecha en el panel C señala el pico de actividad generado en el HTPE por todos los séptimos lengüeteos que la rata dio después de recibir T1.

Todos estos resultados muestran que el lengüeteo se modificó en función del aprendizaje de las ratas, haciéndose más rítmico y estructurado, fenómeno que se mantenía a lo largo de las sesiones de Fase Alta de discriminación.

---

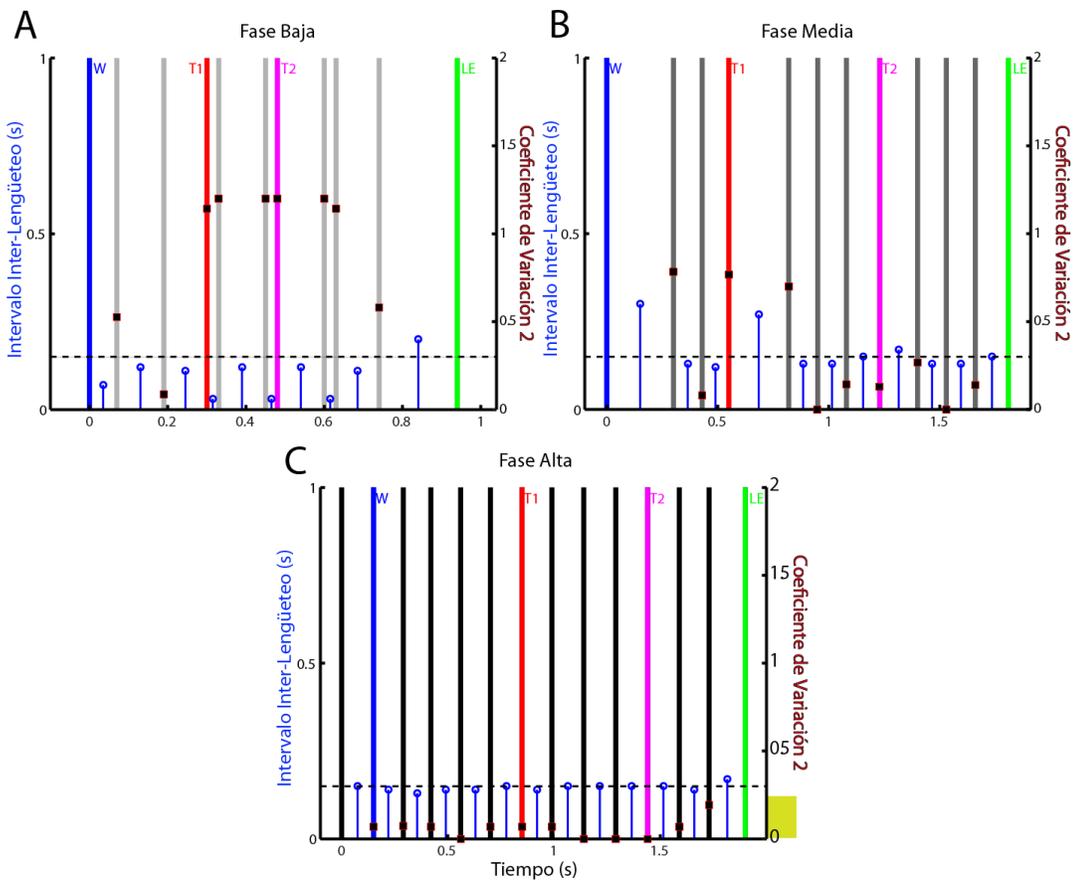
### El lengüeteo se vuelve más estereotípico con el aprendizaje

---

Para evaluar la relación que hubo entre el aprendizaje y las pausas o interrupciones en el lengüeteo, nosotros comparamos el coeficiente de variación 2 (CV2) del lengüeteo que dieron las ratas en los diferentes periodos de la tarea (control, de memoria de trabajo y toma de decisión), en función del aprendizaje.

En la Figura 21 se muestran los mismos 3 ensayos de ejemplo que se presentaron en la Figura 18, pero con la adición del CV2 de esos mismos lengüeteos (cuadrados de relleno negro y contorno rojo), cuyos valores se leen en el eje de las ordenadas alineado a la derecha.

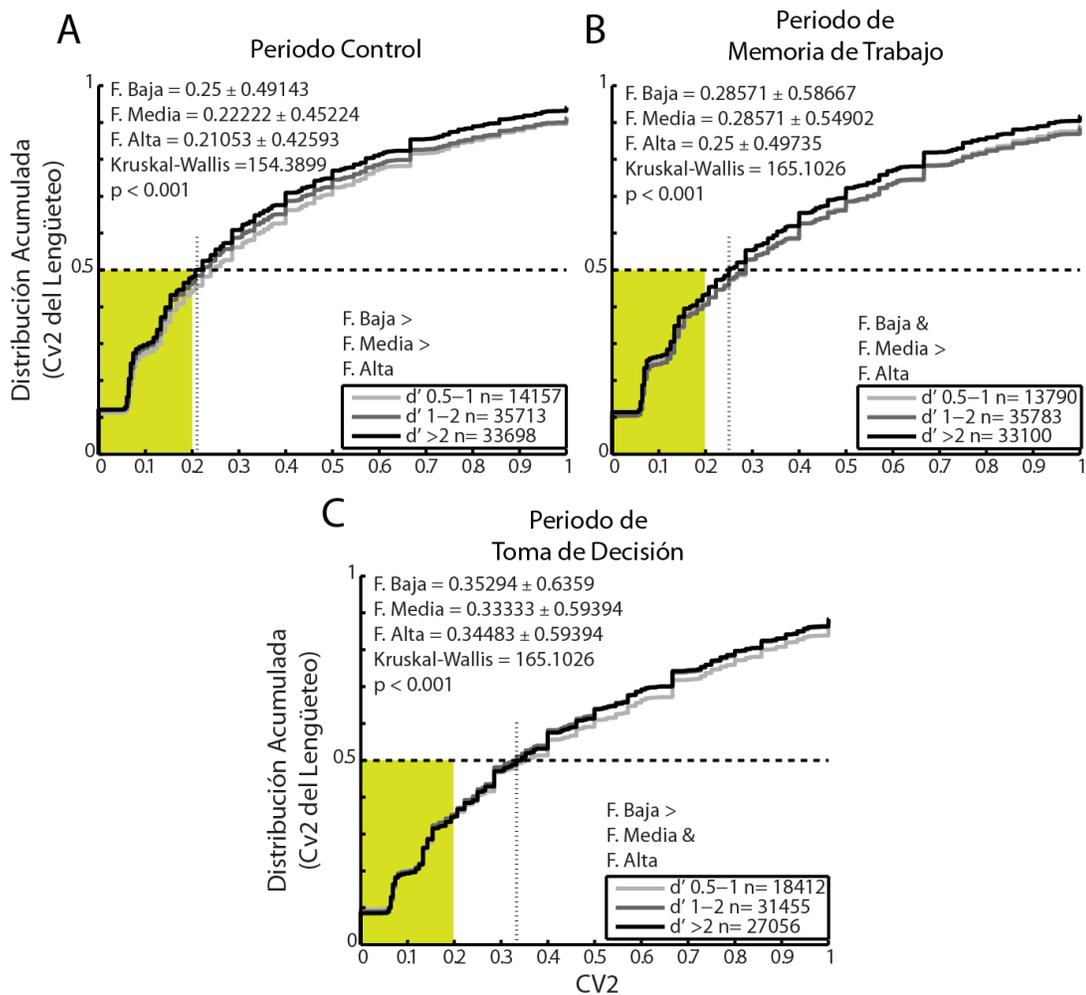
De inmediato salta a la vista que el CV2 en el ensayo de Fase Baja (Fig. 21A) presenta valores del CV2 por encima de 1, mientras que este mismo valor disminuye gradualmente para los ensayos de las Fases Media (Fig. 21B) y Alta (Fig. 21C). Note además, que en la primera mitad del ensayo de Fase Media, donde se ven más pausas en el lengüeteo de la rata, el CV2 es mayor que en la segunda mitad de ése mismo ensayo, donde la rata lengüeteo de manera más estereotipada e ininterrumpida. Esto no sucede en el ensayo de Fase Alta, pues todos los lengüeteos que la rata emitió en ese ensayo mantuvieron CV2 bajos ( $\leq 0.2$ ).



**Figura 21. Las ratas conservan un patrón estereotipado del lengüeteo en la totalidad de un ensayo de máxima discriminación.** Se grafican los mismos ensayos y en el mismo orden de la figura 18. Las convenciones son las mismas, excepto que ahora se muestra el coeficiente de variación 2 (CV2) de cada par de intervalos inter-lengüeteo en cuadros de fondo negro y contorno rojo, y los valores de estos se leen en el eje de las ordenadas a la derecha de cada gráfica. Por último, el cuadro amarillo ala derecha del panel C, indica a qué valores del CV2 se encuentran los lengüeteos rítmicos de las ratas. Note que el CV2 sólo puede tener valores entre 0 y 2.

Como lo esperábamos, al comparar el CV2 del lengüeteo que ocurrió en diferentes Fases del aprendizaje, encontramos que este valor disminuye de manera significativa en función del aprendizaje en los periodos control (Fig. 22A), de memoria de trabajo (Fig. 22B) y de toma de decisión (Fig. 22C), siendo este efecto más marcado para los dos primeros periodos. De manera interesante, en el periodo de memoria de trabajo, se puede ver claramente que el CV2 disminuyó de manera significativa solamente cuando las ratas alcanzaron el nivel máximo de discriminación (la curva gris más oscuro se encuentra marcadamente más a la izquierda que las otras dos curvas). Las regiones con fondo amarillo en la Figura 22 corresponden al CV2 del

lengüeteo que es rítmico (ver Fig. 21C cuadro amarillo, dado que existen menos pausas en los lengüeteos los valores del CV2 se encuentran entre 0 y 0.2). Incluso las distribuciones de las diferentes Fases de aprendizaje en los periodos control y de memoria de trabajo, comienzan a separarse desde las regiones amarillas, lo que quiere decir que el CV2 es capaz de reportar pausas sutiles en el lengüeteo rítmico y, más importante aún, que el aprendizaje tiene efecto en esas modulaciones finas del lengüeteo.



**Figura 22. El lengüeteo se vuelve más estereotipado e ininterrumpido en función del aprendizaje.** Se muestran las distribuciones acumuladas coeficiente de variación 2 (CV2) de los lengüeteos que ocurrieron en el periodo control (A), de memoria de trabajo (B) y de toma de decisión (C). Los valores del CV2 de las 3 gráficas (eje de las abscisas) sólo aparecen del 0 al 1, pero el CV2 puede tener valores entre 0 y 2. El código de color de las curvas es el mismo que el usado en la figura 19. Las regiones rectangulares en color amarillo señalan los valores del CV2 que pueden presentarse en el lengüeteo rítmico de la rata (ver Fig. 21).

Con estos resultados nosotros mostramos que el lengüeteo de las ratas se hizo más estereotipado y sin interrupciones a medida que mejoraron su desempeño en la tarea.

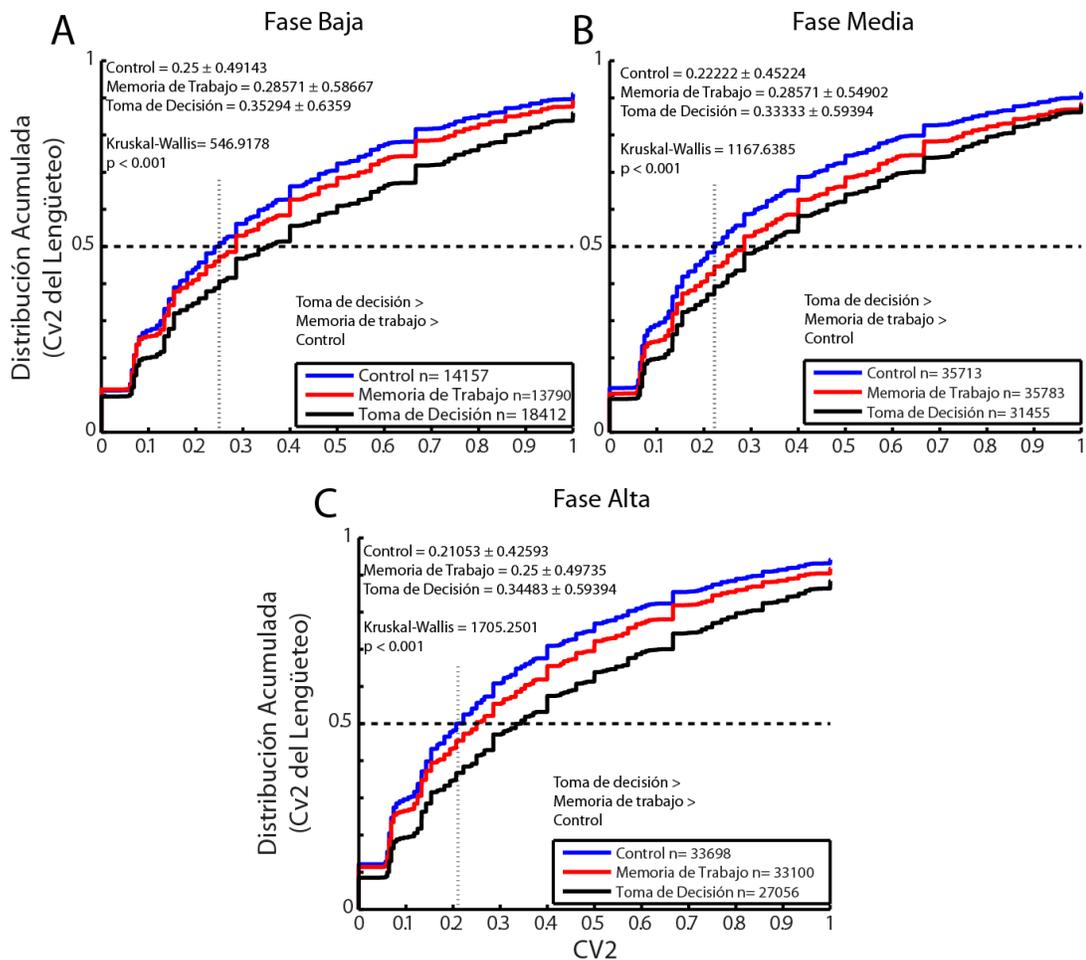
---

#### Las ratas pausan con más frecuencia al final de los ensayos

---

Nos preguntamos si en el transcurso de cada ensayo las ratas mantuvieron el mismo patrón del lengüeteo. Para contestar esta cuestión calculamos el CV2 del lengüeteo que ocurrió en los periodos control, de memoria de trabajo y de toma de decisión. Esto lo hicimos para cada Fase de Discriminación. En la Figura 23 podemos ver el resultado de este análisis.

En todas las Fases de Discriminación (Fig. 23 A, B y C), el CV2 del lengüeteo fue más grande en el periodo de toma de decisión que en el periodo de memoria de trabajo y el CV2 de éste, a su vez, fue más grande que el del periodo control. Sin embargo, se observa que las diferencias entre los periodos control y de memoria de trabajo tendieron a desaparecer en los ensayos de Fase Alta de discriminación (Fig. 23C), sobre todo en lo que respecta al CV2 de los lengüeteos que son rítmicos (con CV2 de entre 0 y 0.2). Estos resultados significan que las ratas aumentan las interrupciones en el lengüeteo durante el transcurso de cada ensayo.



**Figura 23. Las ratas muestran un patrón del lengüeteo diferenciado a lo largo del ensayo, que tiene a desaparecer con el aprendizaje.** Se muestran las distribuciones acumuladas del coeficiente de variación 2 (CV2) de los distintos periodos de la tarea, el periodo control (en azul), el de memoria de trabajo (en rojo) y el de toma de decisión (en negro), en la Fase Baja (A), Media (B) y Alta (C) de discriminación. Sólo se muestra el CV2 (eje de las abscisas) entre 0 y 1, pero este valor puede llegar hasta 2. Note que las curvas de los periodos control y de memoria de trabajo en la Fase Alta de discriminación tienden a asemejarse una a la otra, sobretodo en los valores del CV2 entre 0 y 0.2.

No obstante que se necesitan más análisis conductuales para explicar este fenómeno, sin embargo, y de manera alentadora, el hecho de que el CV2 se haga más homogéneo para los periodos control y de memoria de trabajo permite generar correlatos electrofisiológicos más claros, si se quiere estudiar el correlato neuronal de la memoria de trabajo gustativa.

## La duración de los periodos es crítica para resolver correctamente la tarea gdms

---

Como índice adicional para caracterizar y cuantificar la conducta de las ratas nosotros calculamos la duración en tiempo de cada periodo, esto es, las latencias entre los eventos agua y T1 (para el periodo control), T1 y T2 (para el periodo de memoria de trabajo), T2 y el último lengüeteo adicional en el puerto central (para el periodo de toma de decisión) y, por último, el último lengüeteo adicional y el primer lengüeteo en alguno de los puertos laterales (para el periodo de movimiento corporal). Estas latencias fueron usadas para hacer diferentes comparaciones, como se verá más adelante.

---

### El tiempo de toma de decisión se acorta con el aprendizaje

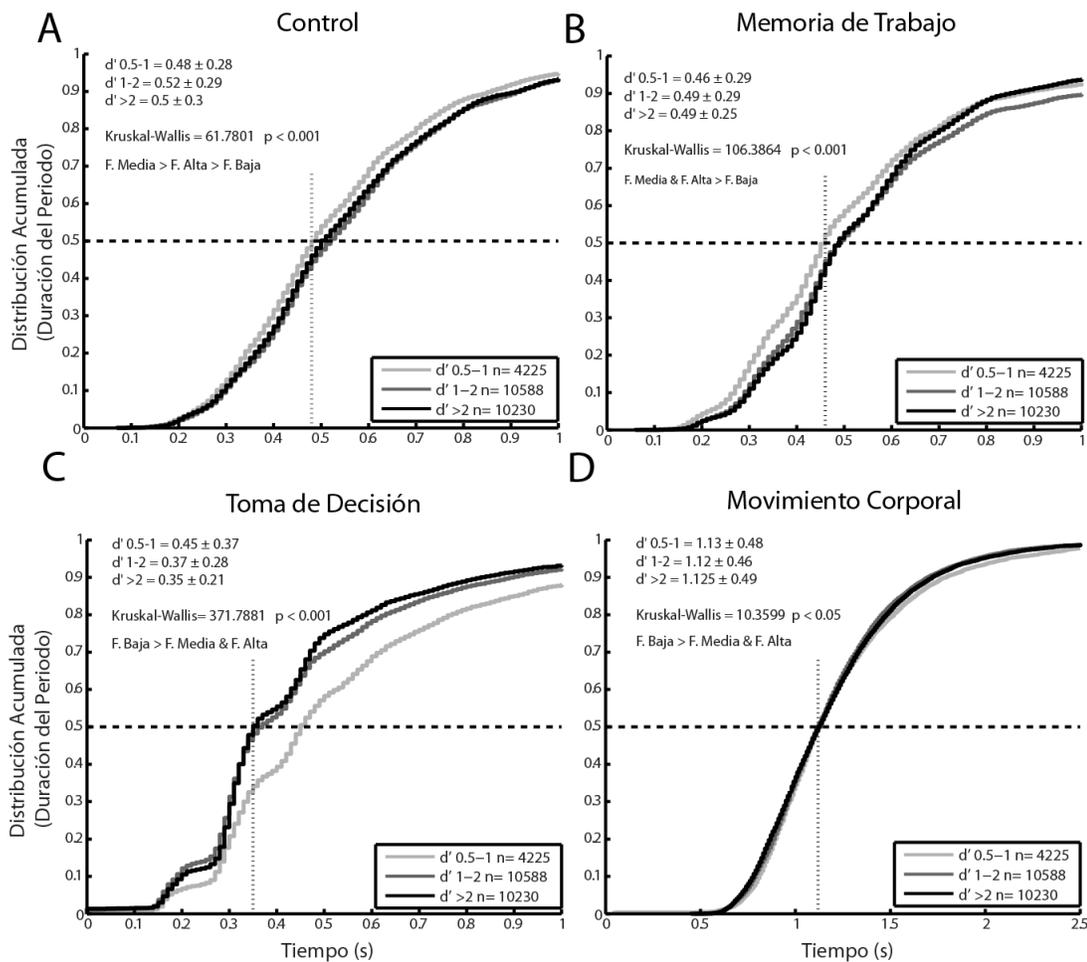
---

Nos preguntamos si el aprendizaje de las ratas modula la duración de cada uno de los periodos de la tarea. Analizamos, para cada periodo, cómo se modularon estas latencias comparando los ensayos correctos de las 3 Fases de aprendizaje (Fig. 24) y descubrimos que las modulaciones fueron heterogéneas entre los periodos. La latencia del periodo control (Fig. 24A) incrementó en la Fase Media con respecto a la Fase Baja de discriminación, sin embargo, cuando estos animales alcanzaron la Fase Alta, la latencia disminuyó con respecto a la Fase Media, pero fue más grande que la Fase Baja. Note que en las medianas de las distribuciones también se observa este patrón. Por su parte, el comportamiento de las latencias del periodo de memoria de trabajo (Fig. 24B) fue un tanto similar. Una vez que los animales alcanzaron sesiones con  $d' \geq 1$ , la latencia de este periodo se estacionó en las Fases Media y Alta con una mediana de 490 ms (aunque los IQRs para cada distribución fueron diferentes,  $\pm 290$  y  $\pm 250$  ms respectivamente), en comparación con la Fase Baja que tuvo una mediana de  $460 \pm 290$  ms.

De manera sorprendente, las latencias del periodo de toma de decisión (Fig. 24C) siguieron un rumbo completamente distinto. En las sesiones que pertenecían a las Fases Media y Alta de discriminación, las ratas redujeron la latencia de este periodo de manera dramática en comparación a los 450ms

de la Fase Baja y alcanzaron hasta  $\sim 370$  y  $\sim 350$  ms, respectivamente, esto son entre 2 y 3 lengüeteos adicionales. Esto significa que, con el aprendizaje, las ratas pudieron disminuir la latencia para tomar decisiones correctas.

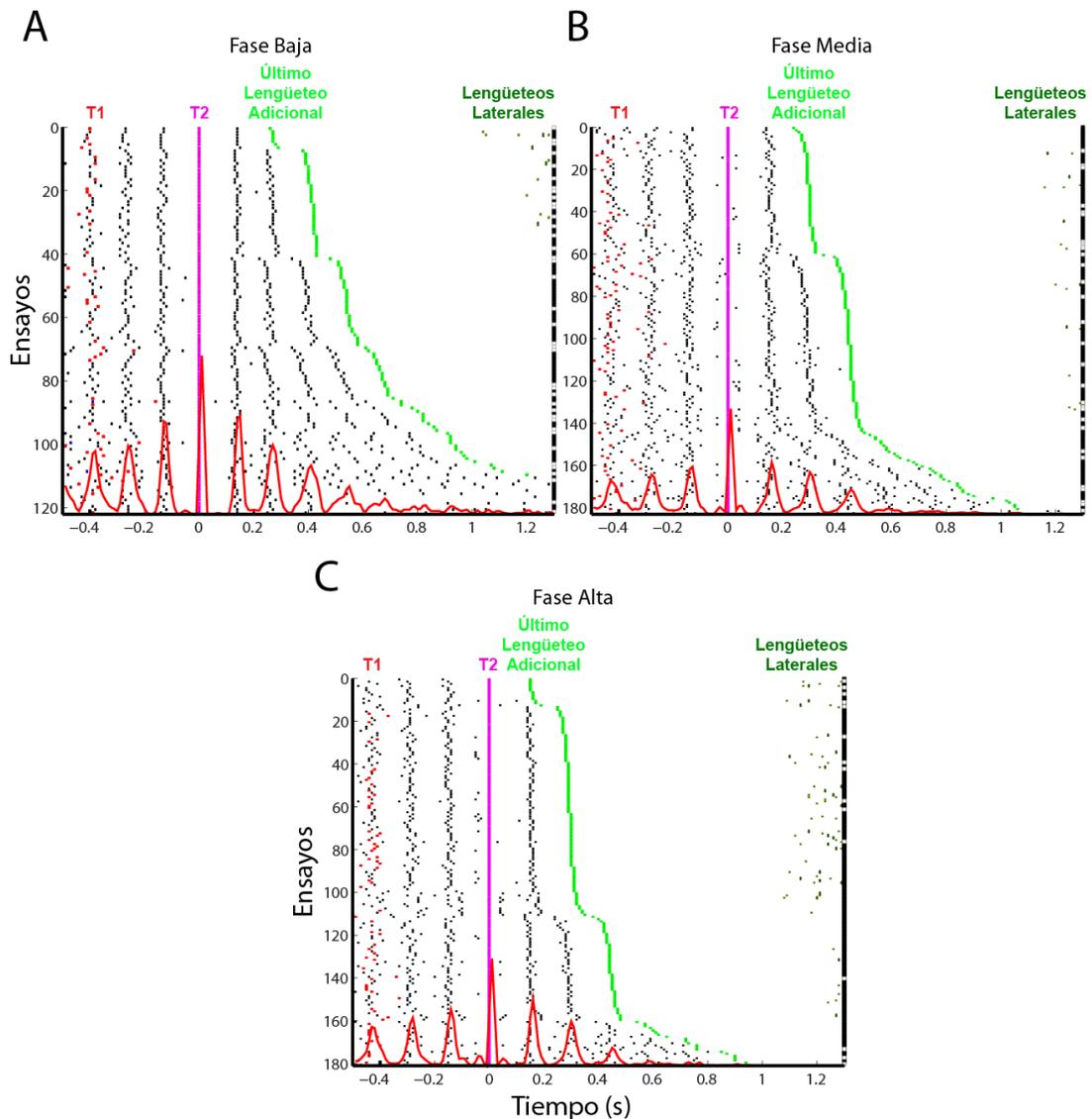
Un fenómeno inverso, pero menos acentuado, lo descubrimos en el periodo de movimiento corporal (Fig. 24D). Las ratas disminuyeron la latencia de este periodo en las Fases Media y Alta con respecto a la Baja en sólo  $\sim 10$  ms, suficiente para que existiera significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que la toma de decisión acontece principalmente durante los lengüeteos adicionales, mientras que el movimiento corporal ocurre balísticamente una vez que la decisión ya está tomada.



**Figura 24. El aprendizaje acelera la toma de decisiones correctas (hasta en  $\sim 350$  ms), la cual ocurre durante los lengüeteos adicionales. Se muestran las distribuciones acumuladas de las latencias (en segundos; eje de las abscisas) de los periodos control (A), memoria de**

trabajo (B), toma de decisión (C) y movimiento corporal (D), en función al aprendizaje. El código de color de las curvas es el mismo usado en las Figuras 19 y 22.

En las gráficas tipo raster que se muestran en la Figura 25 son exhibidas, en cada una, una sesión diferente: en la Figura 25A se grafica una sesión de Fase Baja, en la Figura 25B una de Fase Media y en la Figura 25C una de Fase Alta de discriminación. Note que a medida que incrementa la Fase de aprendizaje disminuye el número de lengüeteos adicionales que la rata dio después de recibir el estímulo T2 (tiempo 0 s). De hecho, sólo en la sesión de Fase Alta se pueden observar ensayos donde la rata dio 1 lengüeteo adicional (ensayos 1-13) y el número de ensayos donde la rata dio 2 lengüeteos adicionales es mayor en esta sesión que en las 2 restantes (7, 61 y 97 ensayos en las sesiones de Fase Baja, Media y Alta, respectivamente).

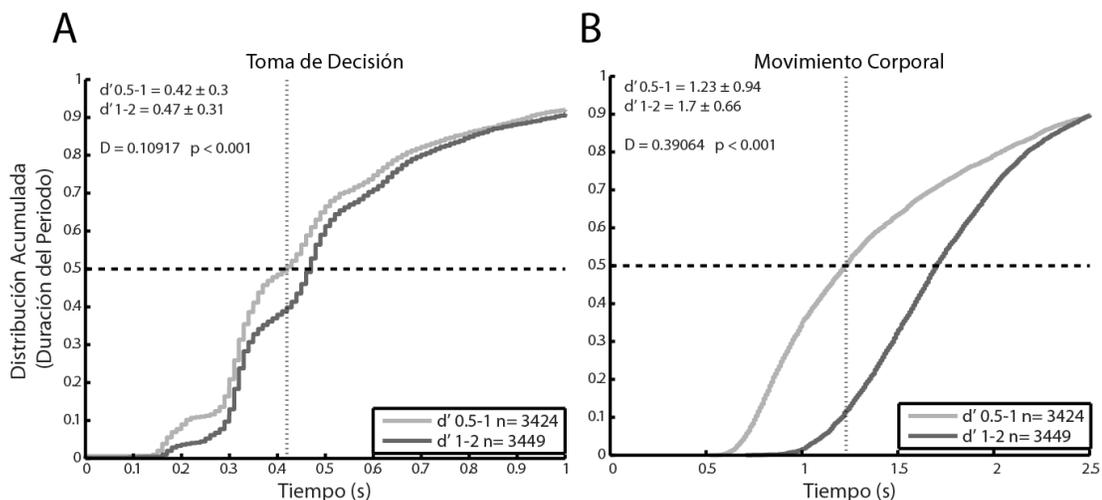


**Figura 25. Con el aprendizaje las ratas pueden tomar decisiones correctas en tan sólo 3, 2 o incluso 1 lengüeteo.** Se muestran 3 gráficas tipo raster de 3 sesiones distintas: una de Fase Baja (A), la segunda de Fase Media (B) y la última de Fase Alta (C). El tiempo 0 segundos (eje de las abscisas) corresponde al momento en que la rata recibió el segundo estímulo gustativo T2 y se señala cuándo ocurrieron otros eventos 400 ms antes y 1300 ms después de T2, usando las mismas convenciones que en la Figura 20.

De acuerdo con estos resultados, el aprendizaje agiliza la toma de decisiones correctas. Si esto fuera cierto, las ratas que no aprendieron no deberían mostrar esta modulación en el tiempo de toma de decisión. Luego de evaluar esta hipótesis, y tal como lo esperamos, descubrimos que las ratas, no sólo fallaron en disminuir el tiempo de toma de respuestas correctas, sino que además lo incrementaron (Fig. 26A). Aún más, si

comparamos la mediana del tiempo de toma de decisión en la Fase Media de estas ratas con la mediana de la Fase Baja de las ratas que sí aprendieron existe una diferencia de 20 ms siendo más grande la primera ( $470 \pm 30$  ms (Fig. 26A) vs.  $450 \pm 37$  ms (Figura 24C), respectivamente). En otras palabras, desde el inicio del aprendizaje las ratas que sí aprendieron se tomaban menos tiempo para tomar una decisión. Estos resultados sugieren 1) que el aprendizaje moduló la latencia de la toma de decisión y 2) que una posible estrategia que usaron las ratas que sí aprendieron para resolver la tarea fue disminuir "activamente" el tiempo de toma de decisión, deteniendo el lengüeteo más rápido después de recibir el estímulo T2.

Decidimos comparar también la duración del periodo de movimiento corporal de las ratas que no aprendieron. Al realizar este análisis, nos sorprendió ver que la duración del periodo de movimiento corporal aumentó espectacularmente en las sesiones de Fase Media con respecto a las de Fase Baja (Fig. 26B). Este resultado nos permitió pensar que las ratas que no aprendieron perdieron la motivación para visitar los puertos laterales, dada la baja probabilidad de obtener una recompensa.



**Figura 26. Las ratas que no aprendieron necesitaron más tiempo para tomar decisiones correctas.** Se muestran las distribuciones acumuladas de las latencias (en segundos; eje de las abscisas) de los periodos toma de decisión (A) y movimiento corporal (B) de las ratas que fallaron desempeñándose en la tarea. Para ambas gráficas, las curvas gris claro representas las latencias en las sesiones de Fase Baja y las de gris medio las latencias de Fase Media.

---

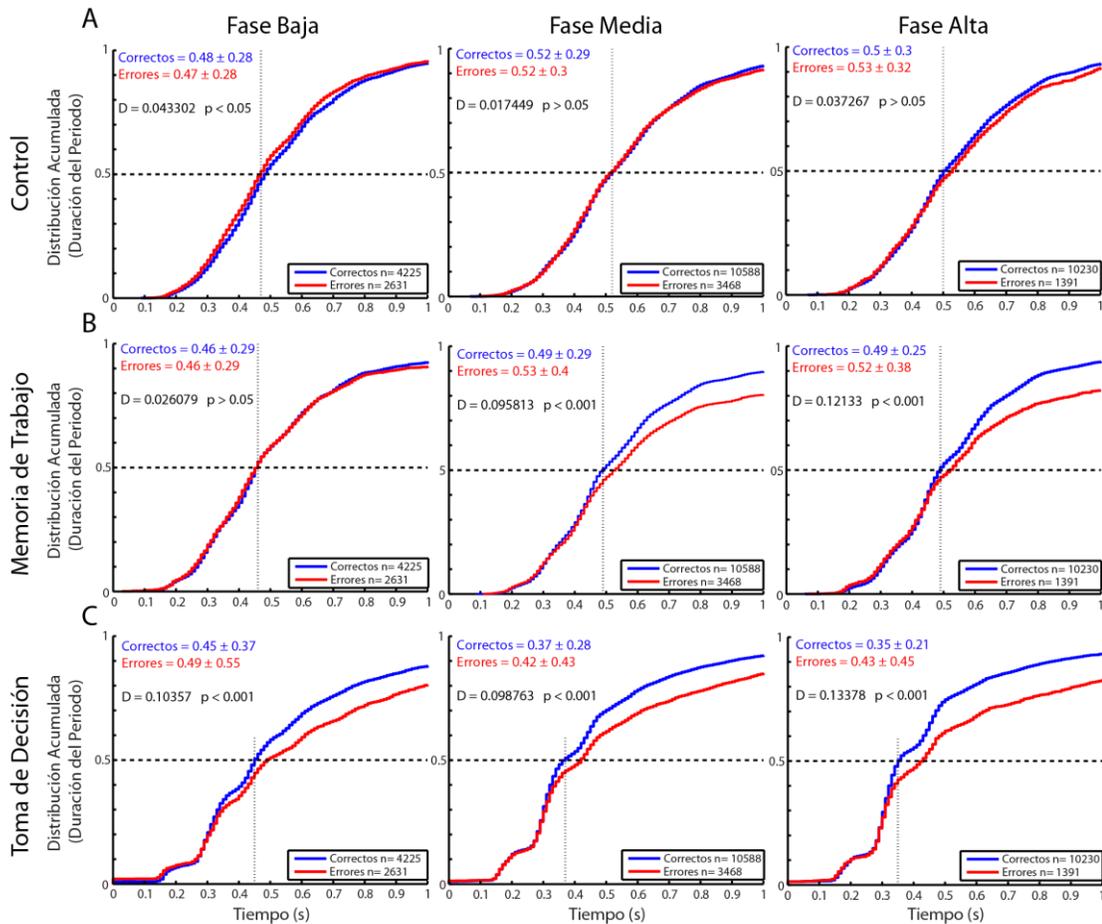
## Las pausas durante los periodos donde hay información relevante provocan errores

---

Si las latencias de los periodos son críticas para que las ratas resuelvan correctamente la tarea, deberíamos encontrar diferencias en estos índices entre los ensayos correctos e incorrectos, sin importar en qué Fase de discriminación los midamos.

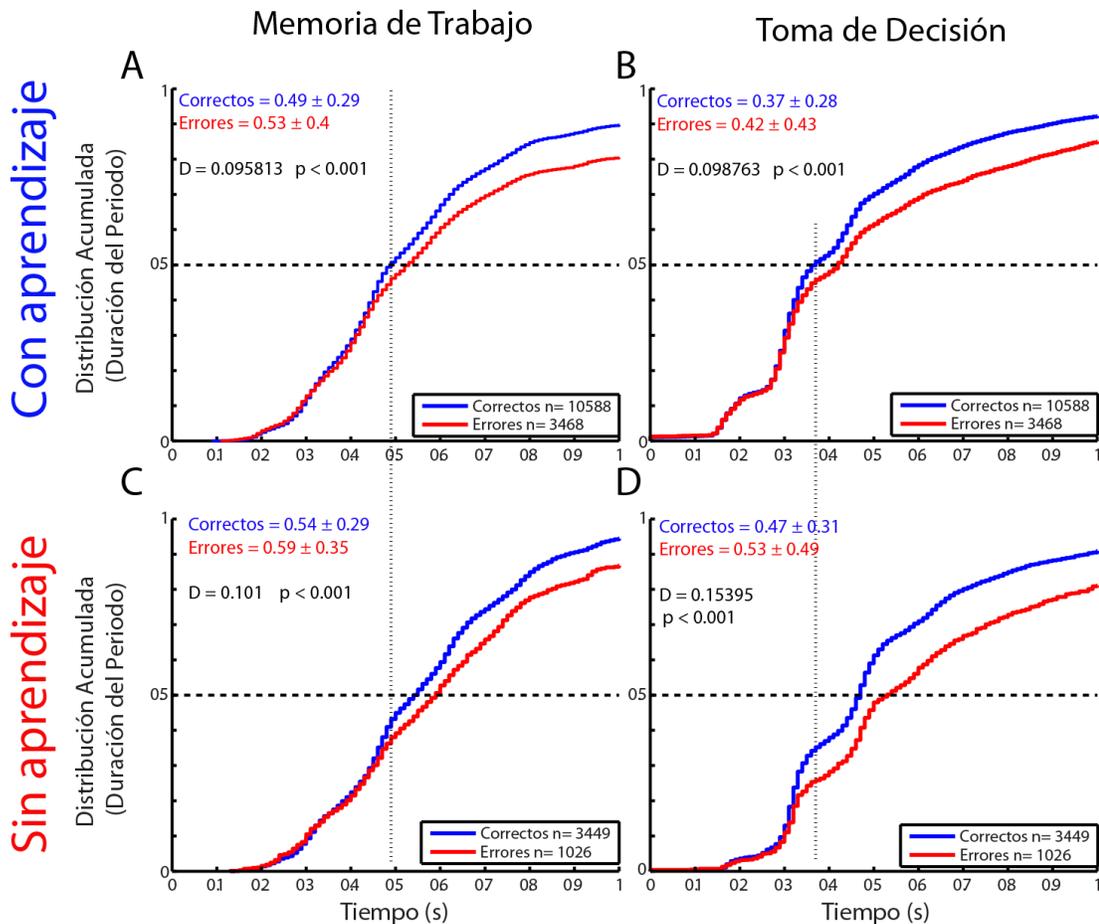
Para probar esta hipótesis comparamos ensayos correctos e incorrectos de cada periodo de la tarea y esto lo hicimos para todas las Fases de discriminación de las ratas que aprendieron la tarea (Fig. 27). Como lo esperamos para el periodo control (Fig. 27A) donde las ratas no tienen que procesar información relevante para resolver la tarea, no hallamos diferencias entre ensayos correctos e incorrectos en la latencia con la que estas ratas completaban este periodo, excepto para el caso de Fase Baja, donde las distribuciones apenas alcanzaron diferencia estadística entre ellas ( $p=0.044$ ; Fig. 27A panel izquierdo).

Por su parte, para los periodos de memoria de trabajo (Fig. 27B) y toma de decisión (Fig. 27C) confirmamos que cuando las ratas pausan durante estos periodos (y por tanto agrandan sus latencias) aumenta la probabilidad de que cometan errores. Esta conclusión la sostiene el hecho de que, en estos periodos, las latencias de los ensayos incorrectos son significativamente más grandes que las de ensayos correctos (Fig. 27B paneles central y derecho, y C). Particularmente para el periodo de toma de decisión esta diferencia se ve marcada desde la Fase Baja de discriminación (Fig. 27C panel izquierdo), mientras que en el periodo de memoria de trabajo aparece hasta la Fase Media (Fig. 27B panel central).



**Figura 27. El procesamiento de información relevante para la tarea es sensible al tiempo.** Se grafican las distribuciones acumuladas de las latencias (en segundos, eje de las abscisas) de los periodos control (A), memoria de trabajo (B) y toma de decisión (C), en las Fases de discriminación Baja (paneles a la izquierda), Media (paneles centrales) y Alta (paneles a la derecha). En cada distribución acumulada se comparan los ensayos correctos (en azul) e incorrectos (en rojo) de las ratas que aprendieron.

Esta diferencia en las latencias entre ensayos correctos e incorrectos también la encontramos en las sesiones de las ratas que no aprendieron. Sin embargo, las ratas que aprendieron completaron el periodo de memoria de trabajo y tomaron decisiones correctas más rápido que las ratas que fallaron en la tarea (Fig. 28), cuando comparamos las sesiones de Fase Media de los 2 grupos de ratas. Este resultado sugiere que las ratas que aprendieron emplearon exitosamente la estrategia de completar más rápido los periodos donde se procesa información relevante, mientras que las ratas que no lograron  $d' \geq 2$  no lo hicieron así.



**Figura 28. Las ratas que lograron reducir la duración de los ensayos tuvieron éxito en la tarea.** Se grafican las distribuciones acumuladas de las latencias (en segundos, eje de las abscisas) de los periodos de memoria de trabajo (A y C) y toma de decisión (B y D), en la Fase de discriminación Media. El código de color se mantiene de la Figura 27. Las gráficas de los paneles A y B provienen de los datos de las ratas que aprendieron, mientras que las de los paneles C y D de las que no aprendieron. Las líneas punteadas verticales cruzan las medianas de los ensayos correctos de las ratas que aprendieron y se extienden hasta los paneles C y D. Note que las medianas de los ensayos correctos e incorrectos de las ratas que aprendieron son más pequeñas que las de las ratas que no aprendieron.

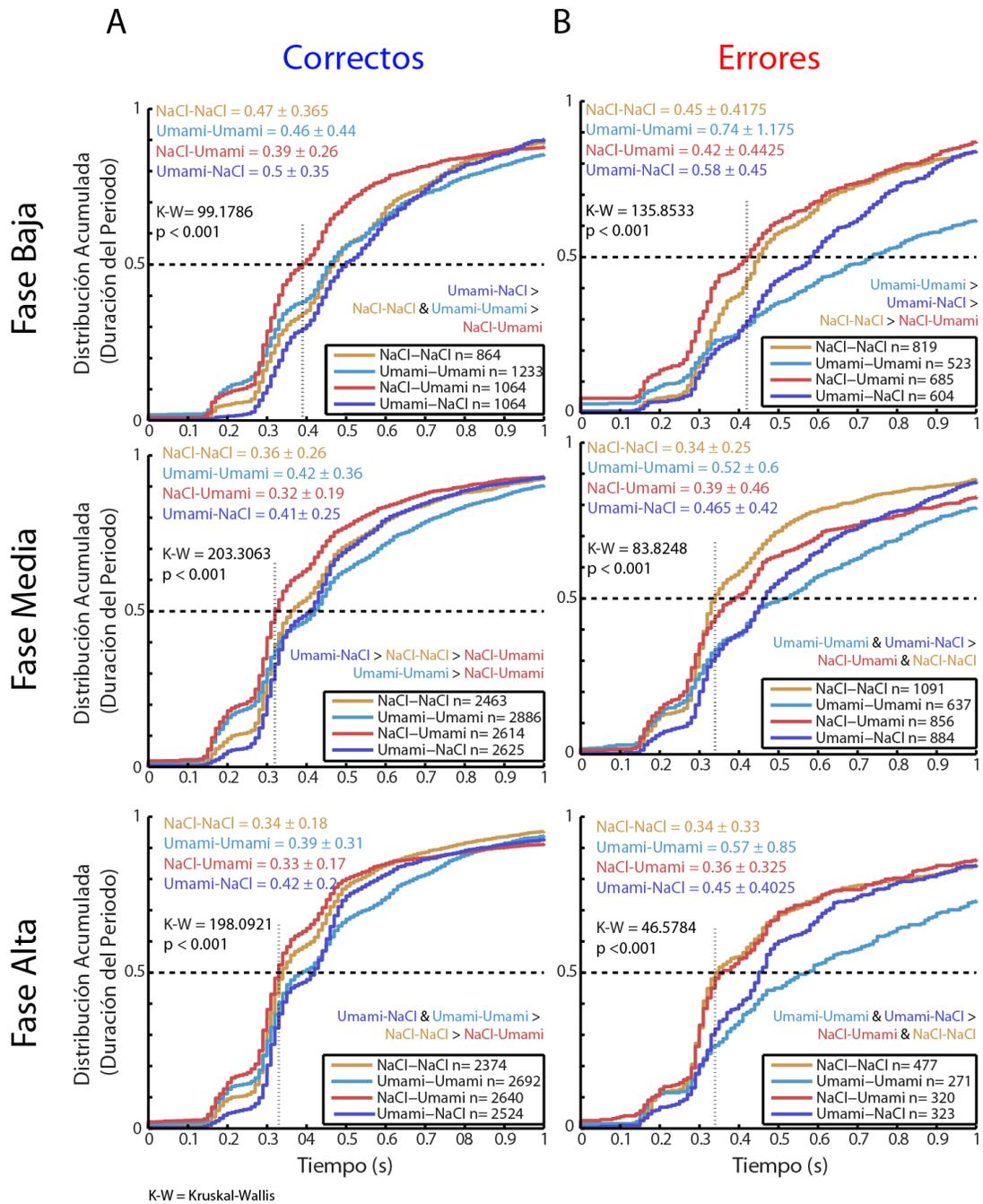
Con estos resultados demostramos que las pausas en los periodos con información relevante, pero no en el control, aumentan las probabilidades de que las ratas cometan un error. Además, la evidencia sugiere que una posible estrategia que las ratas que aprendieron usaron para tener éxito en la tarea fue reducir el tiempo de los periodos de memoria de trabajo y de toma de decisión (éste último implica detener el lengüeteo más rápido). En consistencia con datos anteriores (Fig. 24 y 26), estos resultados sugieren que detener el lengüeteo más rápido después de recibir T2 es crítico para

resolver correctamente la tarea y que las ratas pueden efectivamente modular "activamente" esta latencia.

### Las ratas usaron como estrategia la identificación del sabor umami

Más adelante nos cuestionamos si la precisión de la identificación y comparación fue la misma para las diferentes combinaciones de sabores que usamos. Para contestar esta pregunta comparamos el tiempo de toma de decisión en función de las combinaciones que las ratas recibieron en cada ensayo.

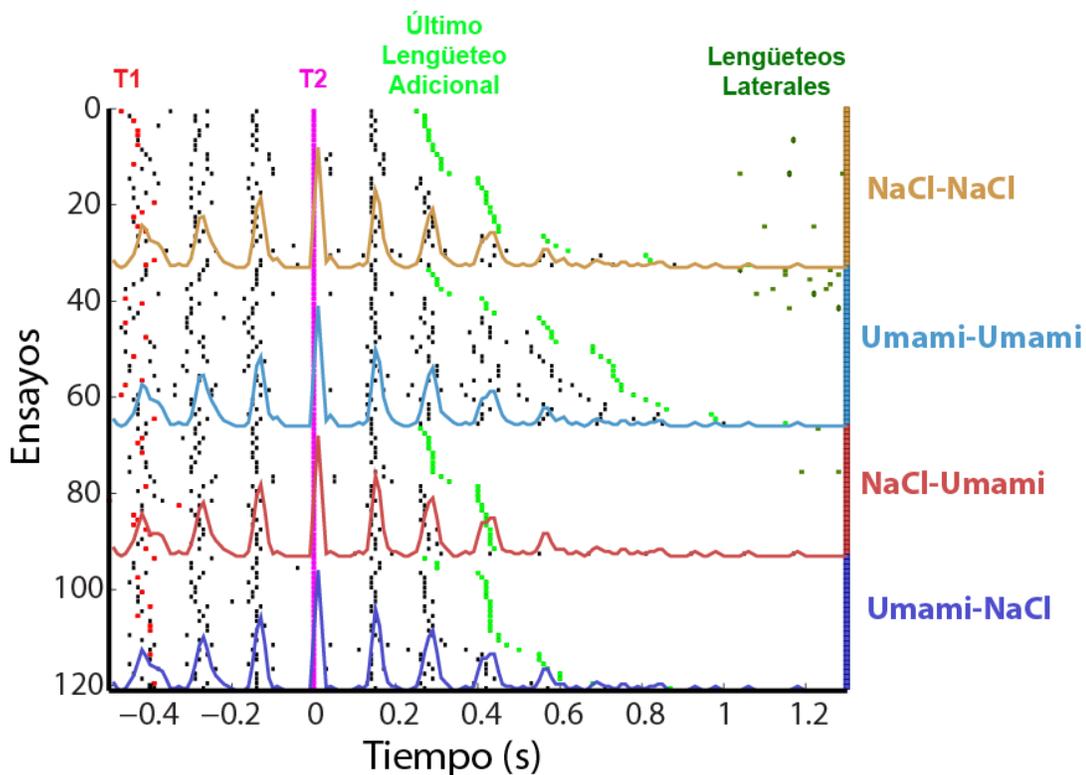
En la Figura 29 podemos ver el resultado de dicho análisis. Como tendencia general, podemos observar que en los ensayos donde las ratas recibieron combinaciones que empezaron con umami (e.g. umami-umami y umami-NaCl) incrementaron el tiempo de toma de decisión, esto para los ensayos correctos (Fig. 29A) e incorrectos (Fig. 29B). Asimismo, salta a la vista que, en comparación con los ensayos correctos, en los ensayos incorrectos la diferencia es más acentuada en el tiempo de toma de decisión, cuando la combinación empezó con umami que cuando la combinación empezó con NaCl (e.g. NaCl-NaCl y NaCl-umami). Por último, es importante destacar que no es el último sabor recibido el que modula el número de lengüeteos adicionales. Como ejemplo de esto son las combinaciones NaCl-umami y umami-umami, que, a pesar de compartir el mismo sabor en T2, provocan efectos contrarios en el número de lengüeteos.



**Figura 29. La combinación umami-umami, pero no el sabor umami, incrementa el tiempo de toma de decisión.** Se grafican las distribuciones acumuladas de las latencias (en segundos, eje de las abscisas) del periodo de toma de decisión, en las Fases de discriminación Baja (paneles superiores), Media (paneles centrales) y Alta (paneles inferiores). En cada distribución acumulada se comparan los ensayos, de las ratas que aprendieron, en función de la combinación de sabores que recibieron (e.g. NaCl-NaCl, en amarillo; umami-umami, en azul claro; NaCl-umami, en rojo; y umami-NaCl en azul oscuro). Los ensayos correctos figuran en el panel A y los incorrectos en el panel B.

En la gráfica tipo raster de la Figura 30 se puede apreciar más claramente la modulación que los lengüetes adicionales tienen de acuerdo a la

combinación de sabores que se le presentó a la rata en una misma sesión. En el primer grupo de ensayos (Fig. 30, ensayos 1-33) donde la rata recibió la combinación NaCl-NaCl, lengüeteo 2, 3 y (en pocos ensayos) 4 veces de manera adicional después de recibir el segundo estímulo gustativo (T2, tiempo 0 s), mientras que en los ensayos 34-66, donde la combinación fue umami-umami la rata dio hasta 6 lengüeteos adicionales. En los ensayos que van del 67-93, donde la rata recibió NaCl-Umami, la interrupción en el lengüeteo se ve bien marcada en hasta 3 lengüeteos adicionales, efecto que también se refleja en el tiempo de toma de decisión ( $330 \pm 170$  ms; Fig. 29A panel derecho, curva roja) en los ensayos correctos de Fase Alta. Por último, se puede observar en la gráfica tipo raster que cuando la rata recibió la combinación umami-NaCl (ensayos 94-121) emitió hasta 4 lengüeteos adicionales.

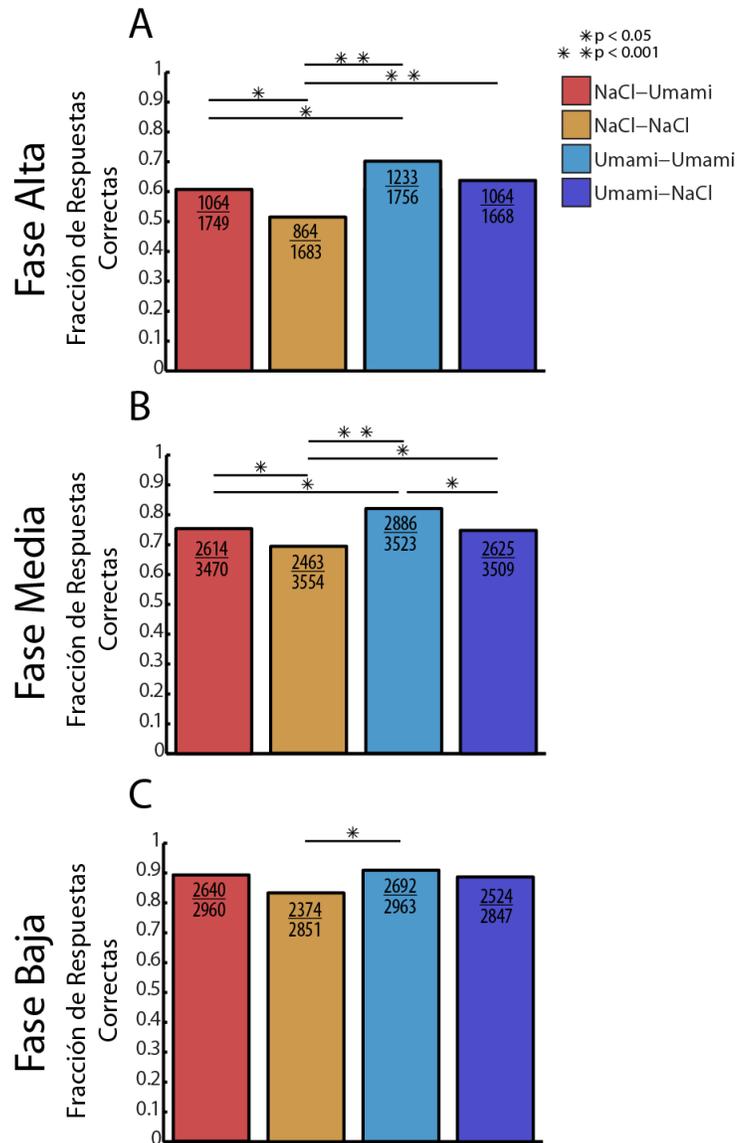


**Figura 30. La combinación umami-umami puede desencadenar hasta 6 lengüeteos adicionales.** Se muestra una gráfica tipo raster de una sesión de fase alta de discriminación. El código de colores de los eventos y la ventana de tiempo son las mismas que en la Figura 25. Pero ahora los ensayos fueron clasificados de acuerdo a la combinación de sabores que la rata recibió (en orden descendente: NaCl-NaCl, umami-umami, NaCl-umami, y umami-NaCl). Y a su vez, cada grupo de ensayos se reordenaron ascendentemente en función a la longitud en tiempo

que hubo entre T2 y el último lengüeteo adicional. Por cada grupo de ensayos se grafica el histograma temporal peri-estímulo del lengüeteo ocurrido en esos ensayos y su código de colores obedece al de la Figura 29. Por último, el código de desempeño descrito en la Figura 20 ha sido cambiado por un código que indica la combinación en cada ensayo y usa el mismo código de color arriba descrito.

De acuerdo a la evidencia que habíamos encontrado (fig. 24c y 27c), la cual indica que las pausas en el periodo de toma de decisión tienen influencia negativa sobre el desempeño y que la duración de este periodo está asociada al grado de discriminación de las ratas, nosotros especulamos que las combinaciones que empiezan con umami son más difíciles de discriminar y comparar para las ratas, comparadas con las que empiezan con NaCl. Resolvimos esta interrogante comparando, mediante el uso de la estadística  $\chi^2$ , la fracción de respuestas correctas que cada combinación tuvo en las diferentes fases de aprendizaje.

Inesperadamente, este análisis reveló que la combinación que la rata se equivocó menos, desde la fase baja de discriminación, hasta su fase alta, fue la combinación umami-umami, mientras que la combinación NaCl-NaCl presentó la FRC más baja en las 3 fases de discriminación (Fig. 31).



**Figura 31. Las ratas usaron como estrategia la identificación del sabor umami.** Se grafican las fracciones de respuestas correctas (FRC) de cada combinación de sabores, las cuales fueron comparadas entre ellas mediante la prueba de la  $\chi^2$ . Esto se hizo por cada Fase de discriminación: Fase Baja (A), Media (B) y Alta (C). El código de color obedece al usado en las Figuras 29 y 30. Un asterisco significa una significancia de  $p < 0.05$  y dos asteriscos significan  $p < 0.001$ .

Este resultado nos ha llevado a formular la siguiente hipótesis: la estrategia principal que usaron las ratas que aprendieron aparentemente se basó en discriminar primeramente el sabor umami con respecto a otro sabor (NaCl). De ahí que 1) la combinación umami-umami haya sido la que provocó más aciertos durante el aprendizaje (Fig. 31) y 2) que la modulación en el tiempo

de toma de decisión se hizo más patente en los ensayos donde las ratas recibieron ésta combinación de estímulos (Fig. 29A vs. 29B). En otras palabras, al ser ésta la combinación a la que ponían más atención, empleaban más tiempo para tomar una decisión cuando la recibían y más tiempo aún cuando "dudaban" si habían recibido ésta combinación o no.

Sin embargo, los análisis conductuales difícilmente podrán probar esta hipótesis, lo que le abre la oportunidad a lo que los correlatos electrofisiológicos nos digan al respecto de estas interrogantes. Es decir, si nuestra hipótesis de que los animales resolvieron nuestra tarea conductual al poner atención primeramente a umami, entonces es de esperarse que las neuronas del sistema gustativo empiecen en su mayoría a responder a este sabor y a las combinaciones que lo contengan, y posteriormente respondan a la combinación NaCl-NaCl, la cual fue la más difícil de detectar.

## DISCUSIÓN

---

En este proyecto nos dimos a la tarea de determinar, por primera vez, si las ratas son capaces de mantener en la memoria de trabajo un trazo gustativo y usarlo para conducir su conducta. Para ello, diseñamos y validamos una novedosa tarea conductual (*Gustatory Delay Match to Sample*; Fig. 13) en donde las ratas deben generar un trazo gustativo, a partir de una pista gustativa (NaCl o umami), y retenerlo hasta recibir otro estímulo gustativo, con el objetivo de comparar si estos estímulos fueron iguales o diferentes. Basadas en su capacidad de detección, identificación y discriminación gustativas, así como de la generación de una memoria de trabajo gustativa, las ratas fueron capaces de resolver la tarea con una precisión sorprendente en hasta 350 ms (Fig. 17A). Además, aquí reportamos el correlato conductual de la memoria de trabajo gustativa, así como abundamos en las estrategias que las ratas usaron para resolver la tarea. En resumen, hemos demostrado que las ratas son capaces de generar una memoria de trabajo gustativa y hemos diseñado una tarea que permitirá establecer de manera clara los correlatos neuronales de este proceso cognitivo.

### las ratas son capaces de retener en la memoria de trabajo un trazo gustativo

---

Usando modelos conductuales como el condicionamiento aversivo al sabor (CAS) y atenuación de la neofobia (AN), se había demostrado que las ratas pueden mantener en una memoria de corto plazo un trazo gustativo (Fig. 7; [15]) evocado por un estímulo novedoso, como estrategia innata para evaluar su posible contenido nutritivo o nocivo. Incluso, Gutierrez et al. [15] demostró que un estímulo novedoso se percibe como seguro desde 6 h después de haberlo consumido, pero el periodo de estimación de posibles efectos nocivos no se extingue sino hasta 10 a 24 h después del consumo, sugiriendo que son independientes los mecanismos que evalúan seguridad, de los que estiman toxicidad. El fenómeno de consolidación de la memoria gustativa, es decir, el almacenamiento de la información gustativa en la

memoria de largo plazo, ocurre después del periodo de evaluación de la seguridad/toxicidad de un estímulo novedoso. Como resulta evidente, este proceso sólo ocurre una vez (cuando el estímulo es novedoso), de manera que la memoria a corto plazo expira permanentemente.

Sin embargo, hasta ahora no se sabía si las ratas eran capaces de generar un trazo de memoria gustativa, a partir de un estímulo familiar y que, a diferencia de la memoria a corto plazo, este trazo sea evocado una y otra vez cuando sea necesario. Aquí, nosotros demostramos que las ratas son capaces de generar un trazo gustativo cada vez que se presenta un estímulo gustativo conocido, y que pueden retener ese trazo en la memoria de trabajo y luego usarlo para tomar decisiones conductuales. Llevado a un paso más adelante, esto significa que las ratas pueden generar diferentes trazos gustativos a partir de un mismo estímulo, dependiendo del contexto en que esto se sitúe (e.g. cuando el estímulo sea un elemento nuevo o cuando sea usado como una pista para guiar su conducta volitivamente).

Es probable, que estos dos procesos, distintos entre sí, estén mediados por diferentes mecanismos en el SNC. Esta última hipótesis nos invita a buscar los mecanismos neuronales responsables de mantener temporalmente información gustativa útil para guiar la conducta.

### La tarea gdms como un modelo alternativo para estudiar memoria de trabajo

---

Como se ha mencionado con anterioridad, las tareas que hasta ahora se han usado para estudiar la memoria de trabajo en roedores, han explotado conductas innatas como alternar espacialmente utilizando laberintos en forma de T [28] y la exploración espontánea [27]. En particular, las tareas que refuerzan la exploración espontánea son tareas de *delayed non-matching to sample* (DNMS), es decir, donde los animales tienen que reportar que han usado la memoria de trabajo de un objeto conocido explorando un objeto nuevo [26, 29, 30]. De manera muy similar a los

estudios con CAS y AN, las tareas DNMS evocan representaciones neuronales de los estímulos (e.g. visuales, espaciales, olfativas), cuya retención durante el periodo de demora puede estar mediada por la memoria a corto plazo, más que por la de trabajo. Asimismo, una vez que ha sido presentado un estímulo, éste deja de ser novedoso, por lo que ya no se puede presentar en otro ensayo.

Por su parte, las tareas que se basan en la iteración espacial, como el laberinto en T y el de 8 brazos [26, 32], requieren que las ratas sean introducidas y retiradas continuamente del espacio donde desarrollan la tarea (el laberinto). De modo que si quisiéramos evaluar la representación neuronal de la memoria de trabajo usando estas tareas, nos veríamos expuestos a confundir neuronas que sí codifican este proceso cognitivo con neuronas que responden, por ejemplo, al cambio de caja durante la demora. Además, es muy difícil establecer en cuánto contribuye la alternación espontánea y en cuánto la memoria de trabajo, para que las ratas tengan éxito en estas tareas. Por último, en particular el laberinto de 8 brazos tiene la limitante de sólo ofrecer 8 ensayos por sesión (y se ha visto que las ratas fallan en laberintos con más brazos, e.g. con 24 brazos [27]).

No obstante estas tareas requieran de muy poco tiempo de entrenamiento, son inadecuadas para registrar la actividad neuronal relacionada con la memoria de trabajo. Nuestra tarea, por su parte, está diseñada para poder registrar la actividad de las neuronas cada vez que las ratas reciben un estímulo gustativo, incluso cientos de veces por sesión. De manera que será posible comparar la respuesta de las neuronas cuando el mismo estímulo tenga diferentes connotaciones (cuando es un sabor que hay que recordar -T1- o cuando es un estímulo que hay que comparar -T2-) el suficiente número de veces para que el correlato neuronal sea claro. Por añadidura, en nuestra tarea las ratas emplean una conducta natural como operante para resolver la tarea (el lengüeteo) que, además de ser cuantificable, nos sirve

como un reporte conductual de qué estrategias podrían estar usando las ratas para resolver la tarea.

### El lengüeteo se modula con el aprendizaje

---

Como lo mostramos, el lengüeteo gana ritmicidad (Fig. 19 y 20), al tiempo que disminuyen las interrupciones durante el mismo (Fig. 22), cuando las ratas se desempeñan en la tarea GDMS con máxima discriminación gustativa. Asimismo, a pesar de que existieron diferencias en cuanto a la probabilidad de que ocurran interrupciones en el lengüeteo cuando comparamos los diferentes periodos de la tarea (Fig. 23), las diferencias entre los periodos control y de memoria de trabajo tendieron a desaparecer en la Fase Alta de discriminación.

Dado que nosotros usamos un índice de discriminación (sensibilidad;  $d'$ ) como medida de desempeño y no el simple conteo de los ensayos correctos, es plausible suponer que la estructuración en el patrón del lengüeteo que observamos está más relacionada con una potenciación en la eficacia del sistema gustativo (discriminación gustativa) que con un aprendizaje motor. De hecho, la evidencia indica que el lengüeteo rítmico [33], así como otras conductas estereotipadas (e.g. el movimiento de las vibrisas, *whisking*; [34]), pueden optimizar el procesamiento de información sensorial, sincronizando la actividad neuronal de regiones distantes en el cerebro [35].

Por otra parte, una actividad motora homogénea (e.g. del lengüeteo) durante la realización de la tarea puede ser crucial para señalar a cierta actividad neuronal, que tendría que ocurrir durante el periodo de memoria de trabajo, como el correlato neuronal de la memoria de trabajo gustativa. De otra manera, no estaríamos seguros si dicha actividad codifica tal proceso cognitivo o simplemente un patrón específico del lengüeteo.

## Características temporales de la memoria de trabajo

---

Una característica típica de la memoria de trabajo es que su eficiencia esta negativamente relacionada con el tiempo de demora [23, 27, 29, 32], es decir, mientras mayor sea el tiempo de demora, menor es la capacidad de retener la información durante esa latencia.

Aquí, nosotros mostramos que cuando las ratas decidían pausar durante el periodo de memoria de trabajo, aumentaba la probabilidad de que se equivocaran (Fig. 27). Aún más, la latencia que presentaron las ratas que fallaron en aprender la tarea, tendió a ser más grande en comparación a la latencia de las ratas que finalmente sí aprendieron (Fig. 28A vs. Fig. 28C).

Estos resultados sugieren, en consistencia con lo que se ha reportado, que una estrategia que las ratas usaron para resolver la tarea, fue acortar, en la medida de lo posible, el tiempo que tenían que retener el primer estímulo en la memoria de trabajo. Las ratas que no redujeron la latencia del periodo de memoria de trabajo, no lograron desempeñarse eficientemente en la tarea.

Asimismo, de esta evidencia se desprende que las ratas que aprendieron fueron capaces de generar un trazo gustativo del primer estímulo T1 (esto incluye la detección y la identificación), más rápido que las que no aprendieron y, de esta manera, pudieron activar la memoria de trabajo gustativa a tiempo, antes de recibir el segundo estímulo T2 y hacer la comparación de ambos estímulos.

## Tiempo de identificación gustativa

---

Nuestros resultados agregan evidencia a favor de que el tiempo de identificación gustativa es un proceso rápido. Como se mostró, las ratas fueron capaces de detectar e identificar un estímulo gustativo (T2), compararlo con el trazo de memoria gustativa que dejó otro estímulo (T1) y tomar decisiones correctas hasta en ~350 ms.

En contraste, Katz y su grupo de investigación han propuesto que el procesamiento gustativo es lento, pues han mostrado evidencia que indica que durante los primeros 120-200 ms, después de recibir un estímulo gustativo, las ratas no disponen más que de información somatosensorial (Fig. 4; [16, 36]), es decir, sólo se ha llevado a cabo el proceso de detección. Según este mismo modelo, a partir de 200 hasta 800-1000 ms después del estímulo, se codifica la identificación del estímulo. Y desde 1000 hasta 2500 ms después del estímulo aparece información relacionada a la palatabilidad. Hay que decir que estos datos fueron generados mediante registros de la actividad neuronal de la corteza insular (CI) de ratas despiertas, que recibían los estímulos gustativos a través de una cánula intraoral mientras tenían la cabeza restringida [16, 36]. Es muy probable que sea éste el motivo por el que nuestros resultados difieran.

Otros trabajos, donde se midió el tiempo de identificación gustativa en animales en libre movimiento, han presentado resultados más acorde con los nuestros. Halpern y Tapper demostraron, mediante un experimento que se volvió clásico, que las ratas podían reportar conductualmente la detección e identificación de un estímulo gustativo hasta en ~200 ms (Fig. 5; [17]). Más recientemente, Stapleton et al. lograron mostrar que las neuronas de CI de ratas que lengüeteaban libremente, codificaban la identificación de diferentes concentraciones de varios sabores en menos de 150 ms (1 lengüeteo; Fig. 6; [19]).

No obstante, Di Lorenzo y col. mostraron que sólo cuando existe aprendizaje previo o cuando la información es suficientemente abundante, las ratas en libre movimiento pueden identificar un estímulo tan rápido (~580 ms; [20]). Este grupo de investigación definió como identificación gustativa a un incremento significativo en las interrupciones del lengüeteo después de que las ratas recibieran quinina (un sabor aversivo a cual, además, se les condicionó previamente a las ratas a rechazarlo) en comparación a las ocasiones donde recibieron otros sabores. Lamentablemente, ellos no

repararon en que, a menos que el estímulo aversivo fuera lo suficientemente intenso, las ratas (privadas de agua) podían soportar la quinina y continuar lengüeteando, pues luego de esto recibían en total 5 gotas de agua.

A pesar de que en nuestra tarea las ratas no recibían estímulos aversivos ni eran reforzadas a detener o continuar el lengüeteo después de recibir el segundo estímulo gustativo, reportaron latencias de identificación, comparación y toma de decisión muy pequeñas. Dichas latencias, sí fueron moduladas por el aprendizaje (Fig. 24C) como lo propuso acertadamente Di Lorenzo. Sin embargo, aún en la Fase Baja de discriminación, las ratas lograron tomar decisiones correctas, basadas en la identificación y discriminación gustativas, en  $450 \pm 370$  ms (Fig. 24C, curva gris claro).

Son necesarios más estudios de tipo electrofisiológico, donde se tome en cuenta la evidencia conductual para conciliar todos estos puntos de vista. Por ahora, una posible explicación para nuestros resultados conductuales se encuentre en el análisis individual de los diferentes estímulos que las ratas recibieron.

#### La velocidad de la formación del trazo gustativo depende del estímulo recibido

De manera inesperada, nosotros encontramos que aquéllas combinaciones que incrementaron la latencia de la toma de decisión fueron las que se mostraron con más FRC a lo largo del aprendizaje (umami-umami y umami-NaCl; Fig. 29 y 31). Para explicar este fenómeno presentamos algunas hipótesis.

Tomando en cuenta que las ratas necesitan generar un trazo de memoria gustativo del primer estímulo gustativo T1, antes de recibir el segundo (T2), es plausible suponer que sea la identidad de T1 la que module el tiempo de toma de decisión. En consistencia con esto, nosotros encontramos que las combinaciones "rápidas" fueron las que empezaron con NaCl (NaCl-NaCl y NaCl-umami), mientras que las "lentas" fueron las que empezaron con

umami (umami-umami y umami-NaCl), siendo el primer sabor el que definió la velocidad de tiempo de toma de decisión.

Siguiendo esta idea, lo más parsimonioso por suponer es que la diferencia en las latencias que observamos se deba a los mecanismos de recepción y transducción de cada sabor. Como se ha mencionado antes, la percepción del sabor salado está mediado principalmente por el canal epitelial de sodio (ENaC; [1, 12]). El resto de la percepción se le atribuye al receptor vaniloide tipo 1 (VR1; [13]). Mientras que la percepción del sabor umami está mediado por un heterodímero de receptores transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs), el T1R1-T1R3, el cual es de activación más lenta [9]. Por tanto, cabe suponer que el trazo gustativo generado por el NaCl puede ser más rápido debido a que las células receptoras al sabor (CRS) que expresan el canal ENaC podrían señalizar más rápido, al tiempo que la señalización podría verse "reforzada" por la activación de las CRS que expresan el VR1, que como ya se señaló, estas dos proteínas no se traslapan en los mismos tipos celulares [1].

Sin embargo, las diferencias que observamos no se encuentran solamente en el tiempo de toma de decisión, sino también en el desempeño de las ratas para discriminar cada combinación de sabores. De manera que, aunque el NaCl pudiera señalizar más rápido, las ratas no pudieron identificarlo y compararlo tan bien como lo hicieron para el umami.

Tomando en cuenta este último punto -que evidencia la importancia de los datos conductuales- nos vemos forzados a pensar que las ratas emplearon una estrategia, basada en la discriminación diferencial de las combinaciones, para resolver la tarea. Esta hipótesis la sostiene la evidencia de que el tiempo de toma de decisión está relacionada con el desempeño de las ratas (Fig. 27C): cuando las ratas se demoran más en tomar una decisión, la probabilidad de que se equivoquen aumenta. Asimismo, el aprendizaje reduce esta latencia, indicando que las ratas pueden detener el lengüeteo

más rápido cuando el grado de discriminación aumenta. Sin embargo, el tiempo de toma de decisión no es el mismo ante todas las combinaciones.

En los ensayos correctos de la Fase Alta, las combinaciones umami-umami y umami-NaCl fueron las que tuvieron un mayor tiempo de toma de decisión (Fig. 29A, panel inferior). Pero en los ensayos incorrectos de esa misma Fase, la combinación umami-umami incrementó dramáticamente esta latencia (Fig. 29B, panel inferior), seguida de la combinación umami-NaCl. Pero las combinaciones NaCl-NaCl y NaCl-umami, casi no modificaron el tiempo de toma de decisión comparando ensayos correctos e incorrectos. Pareciera, entonces, que las ratas aprendieron a discriminar el umami con respecto a otro sabor (NaCl) y que necesitan emplear un poco más de tiempo para asegurarse de discriminarlo correctamente, y aún más cuando no tienen la certeza suficiente de haberlo recibido.

Esta hipótesis, sin embargo, serán mejor contestadas mediante el registro de la actividad neuronal encargada de codificar el trazo de memoria gustativa y nuestra tarea es una herramienta ideal para contestar estas interrogantes.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

En este proyecto nosotros demostramos, por primera vez, que las ratas son capaces de mantener en la memoria de trabajo un trazo gustativo generado a partir de estímulos familiares y que pueden usar esta memoria para conducir su conducta para resolver tareas complejas.

Además, diseñamos y validamos una novedosa tarea conductual que permitirá encontrar y caracterizar los correlatos electrofisiológicos de la memoria de trabajo gustativa. Con esta tarea también fue posible caracterizar la conducta de las ratas mientras ponían en acción distintos procesos cognitivos como la detección, identificación y comparación de estímulos gustativos, así como el uso de la memoria de trabajo gustativa y la toma de decisión.

## REFERENCIAS

---

1. Chandrashekar, J., et al., *The cells and peripheral representation of sodium taste in mice*. Nature, 2010. **464**(7286): p. 297-301.
2. Adler, E., et al., *A novel family of mammalian taste receptors*. Cell, 2000. **100**(6): p. 693-702.
3. Chandrashekar, J., et al., *The receptors and cells for mammalian taste*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 288-94.
4. Zhang, Y., et al., *Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways*. Cell, 2003. **112**(3): p. 293-301.
5. Mueller, K.L., et al., *The receptors and coding logic for bitter taste*. Nature, 2005. **434**(7030): p. 225-9.
6. Huang, A.L., et al., *The cells and logic for mammalian sour taste detection*. Nature, 2006. **442**(7105): p. 934-8.
7. Bigiani, A., et al., *Responses to glutamate in rat taste cells*. J Neurophysiol, 1997. **77**(6): p. 3048-59.
8. Zhao, G.Q., et al., *The receptors for mammalian sweet and umami taste*. Cell, 2003. **115**(3): p. 255-66.
9. Nelson, G., et al., *An amino-acid taste receptor*. Nature, 2002. **416**(6877): p. 199-202.
10. Simon, S.A., et al., *The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(11): p. 890-901.
11. Perez, C.A., et al., *A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells*. Nat Neurosci, 2002. **5**(11): p. 1169-76.
12. J.A., H.G.L.M.S.D., *Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway*. Science, 1984. **223**(4634): p. 403-05.
13. Lyall, V., et al., *The mammalian amiloride-insensitive non-specific salt taste receptor is a vanilloid receptor-1 variant*. J Physiol, 2004. **558**(Pt 1): p. 147-59.
14. S.A., K.D.B.N.M.A.S., *Gustatory processing is dynamic and distributed*. Current Opinion in Neurobiology, 2002. **12**(4): p. 448-54.
15. Gutierrez, R., et al., *Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes*. Neurobiol Learn Mem, 2003. **80**(3): p. 323-31.
16. Katz, D.B., S.A. Simon, and M.A. Nicolelis, *Dynamic and multimodal responses of gustatory cortical neurons in awake rats*. J Neurosci, 2001. **21**(12): p. 4478-89.
17. Halpern, B.P. and D.N. Tapper, *Taste stimuli: quality coding time*. Science, 1971. **171**(3977): p. 1256-8.
18. Beidler, L.M., *Properties of chemoreceptors of tongue of rat*. J Neurophysiol, 1953. **16**(6): p. 595-607.
19. Stapleton, J.R., et al., *Rapid taste responses in the gustatory cortex during licking*. J Neurosci, 2006. **26**(15): p. 4126-38.
20. Weiss, M.S. and P.M. Di Lorenzo, *Not so fast: Taste stimulus coding time in the rat revisited*. Frontiers in Integrative Neuroscience, 2012. **6**.
21. Rodriguez-Ortiz, C.J., et al., *Long-term aversive taste memory requires insular and amygdala protein degradation*. Neurobiol Learn Mem, 2011. **95**(3): p. 311-5.
22. Miller, E.K. and R. Desimone, *Parallel neuronal mechanisms for short-term memory*. Science, 1994. **263**(5146): p. 520-2.

23. Baddeley, A., *Working memory*. Science, 1992. **255**(5044): p. 556-9.
24. Khan, Z.U. and E.C. Muly, *Molecular mechanisms of working memory*. Behav Brain Res, 2011. **219**(2): p. 329-41.
25. Wilson, F.A., S.P. Scialidhe, and P.S. Goldman-Rakic, *Dissociation of object and spatial processing domains in primate prefrontal cortex*. Science, 1993. **260**(5116): p. 1955-8.
26. R.J., O.D.S.S., *Remembrance of places passed: Spatial memory in rats*. Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Process, 1976. **2**(2): p. 97-116.
27. P.A., D., *An overview of the tasks used to test working memory in rodents*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2004. **28**(7): p. 699-709.
28. P., R.C.L.D.W.N.K., *Spontaneous alternation behavior in animals: a review*. Current Psychological Research & Reviews, 1986. **5**(4): p. 358-391.
29. Ennaceur, A. and J. Delacour, *A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data*. Behav Brain Res, 1988. **31**(1): p. 47-59.
30. H., D.P.A.W.E.R.E., *Neurotoxic hippocampal lesions have no effect on odor span and little effect on odor recognition memory but produce significant impairments on spatial span, recognition, and alternation*. Journal of Neuroscience, 2000. **20**(8): p. 2964-77.
31. Holt, G.R., et al., *Comparison of discharge variability in vitro and in vivo in cat visual cortex neurons*. J Neurophysiol, 1996. **75**(5): p. 1806-14.
32. Dudchenko, P.A., *How do animals actually solve the T maze?* Behav Neurosci, 2001. **115**(4): p. 850-60.
33. Gutierrez, R., S.A. Simon, and M.A. Nicolelis, *Licking-induced synchrony in the taste-reward circuit improves cue discrimination during learning*. J Neurosci, 2010. **30**(1): p. 287-303.
34. Kleinfeld, D., E. Ahissar, and M.E. Diamond, *Active sensation: insights from the rodent vibrissa sensorimotor system*. Curr Opin Neurobiol, 2006. **16**(4): p. 435-44.
35. Nicolelis, M.A., et al., *Sensorimotor encoding by synchronous neural ensemble activity at multiple levels of the somatosensory system*. Science, 1995. **268**(5215): p. 1353-8.
36. Sadacca, B.F., J.T. Rothwax, and D.B. Katz, *Sodium concentration coding gives way to evaluative coding in cortex and amygdala*. J Neurosci, 2012. **32**(29): p. 9999-10011.