

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería de las Tecnologías Industriales

Análisis comportamental de la rata mediante cámaras y sensores térmicos ante estímulos sonoros

Autora: Carmen López Marchena

Tutoras: María del Mar Elena Pérez y Susana Pilar Gaytán Guía

Dpto. de Ingeniería Electrónica y de Fisiología
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, Septiembre 2022



Trabajo fin de grado
Grado en Ingeniería de las Tecnologías Industriales

Análisis comportamental de la rata mediante cámaras y sensores térmicos ante estímulos sonoros

Autora:

Carmen López Marchena

Tutoras:

María del Mar Elena Pérez

Profesora Contratada Doctora

Susana Pilar Gaytán Guía

Profesora Titular de Universidad

Dpto. de Ingeniería Electrónica y de Fisiología

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, septiembre 2022

Trabajo Fin de Grado: Análisis comportamental de la rata mediante cámaras y sensores térmicos ante estímulos sonoros

Autora: Carmen López Marchena

Tutoras: María del Mar Elena Pérez
Susana Pilar Gaytán Guía

El tribunal nombrado para juzgar el Proyecto arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2022

El Secretario del Tribunal

A mi familia

A mis amigas

A Manuel

Agradecimientos.

A mis padres. Por dárme todo en esta vida. Por apoyarme y enseñarme que todo esfuerzo tiene su recompensa. Nunca os podré agradecer todo lo que habéis hecho por mí. Os quiero.

A Laura, por ser mi confidente, amiga y hermana en los momentos buenos y malos. Espero estar a la altura de ti cuando crezcas, siempre estaré ahí para lo que necesites, ya lo sabes.

A mis amigas, por enseñarme que, a veces, es necesario desconectar. Por todos los desahogos y las charlas, gracias.

A mis tutoras, Mar y Susana, por brindarme la oportunidad de adentrarme en la biología animal y permitirme hacer cosas que jamás me hubiera imaginado que haría en esta carrera.

Al departamento de Biología animal de la Universidad de Sevilla, en concreto a Alfonso, por permitirnos la experimentación con las ratas de su laboratorio.

A Alejandro y su equipo, por permitirme asistir a una de sus experimentaciones con ratas y resolver todas las dudas que pude ir teniendo.

Y, por último, a ti, Manuel. Gracias por las conversaciones interminables, la calma en mitad del agobio y el estrés, el apoyo y el amor incondicional. Nunca supe creer tanto en mí hasta que llegaste a mi vida. Por ser mi escape de salida en los momentos duros, pero, sobre todo, por ser la primera persona a la que quiero acudir cuando me pasen cosas buenas. Gracias por ser todo y más. Te quiero.

Este proyecto consiste en la propuesta de un diseño no invasivo que mida algunas variables fisiológicas de ratas, asociándolas a un modelo de observación de su conducta, que monitorizando el inventario de comportamientos exhibidos por el animal (etograma), permita evidenciar y, eventualmente, cuantificar la posible correlación entre ambos. Es bien sabido que las conductas que se manifiestan en un etograma en respuesta a estímulos ambientales concretos (como pueden ser los sonidos), generalmente, se definen como mutuamente excluyentes y objetivas, evitando la inferencia funcional en cuanto a su posible propósito, por lo que se describen como patrones de observación concretos.

Este objetivo requiere de una documentación previa sobre las metodologías usadas hoy en día en la investigación animal para el registro de estas variables. Todas estas metodologías se analizaron priorizando aquellas que, bajo la premisa de requerir protocolos no invasivos, se mostraron más eficaces.

Para probar el funcionamiento de estas metodologías y su correlación con el modelo conductual se realizaron una serie de pruebas de observación y análisis de la respuesta en el laboratorio en ratas que, sometidas a estímulos auditivos, mostraban diferentes tipos de modificaciones fisiológicas y conductuales que permitieron obtener diferentes resultados.

Finalmente, se efectuaron valoraciones y análisis de mejora sobre el modelo propuesto.

Del trabajo desarrollado, se puede inferir que diseñar protocolos que permitan correlacionar las medidas obtenidas (con metodología no invasiva de registro de cambios sobre variables fisiológicas) en un modelo animal sobre el que identificar modificaciones conductuales asociadas a respuestas a estímulos externos concretos (como los sonoros) puede conducir a una fructífera colaboración que conllevará, a su vez, el comienzo de una línea de investigación que conecte la Bioelectrónica con la Biología animal para que, en un futuro, puedan aportarse numerosos datos y convertirse, así, en una potente herramienta para el avance en el conocimiento de los efectos de dichos estímulos sobre el bienestar de los sujetos.

This project consists of the proposal of a non-invasive design that measures some physiological variables in rats, associating them with an observation model of their behavior, which, by monitoring the inventory of behaviors exhibited by the animal (ethogram), makes it possible to demonstrate and, eventually, quantify the possible correlation between the two. It is well known that the behaviors shown in an ethogram in response to specific environmental stimuli (such as sounds) are generally defined as mutually exclusive and objective, avoiding functional inference as to their possible purpose, and are therefore described as specific observation patterns.

This objective requires prior documentation of the methodologies used today in animal research for recording these variables. All these methodologies were analyzed prioritizing those that, under the premise of requiring non-invasive protocols, were shown to be more effective.

To test the performance of these methodologies and their correlation with the behavioral model, a series of observation and response analysis tests were carried out in the laboratory on rats that, when subjected to auditory stimuli, showed different types of physiological and behavioral modifications that allowed different results to be obtained.

Finally, evaluations and improvement analyses were carried out on the proposed model.

From the work carried out, it can be inferred that designing protocols that allow correlating the measurements obtained (with non-invasive methodology for recording changes in physiological variables) in an animal model on which to identify behavioral modifications associated with responses to specific external stimuli (such as sound) can lead to a fruitful collaboration that will, in turn, lead to the start of a fruitful collaboration that will, in turn, lead to the start of a new research project that will lead to a new research project that will, in turn, lead to the start of a new research project that will, in turn, lead to the start of a new research project, This, in turn, will lead to the start of a line of research connecting bioelectronics with animal biology so that, in the future, numerous data can be provided and thus become a powerful tool for progress in the knowledge of the effects of these stimuli on the well-being of the subjects.

Agradecimientos.	ix
Resumen	xi
Abstract	xiii
Índice	xv
Índice de Tablas	xvii
Índice de Figuras	xix
Notación	xxiii
1 Introducción	1
1.1 <i>Motivación</i>	1
1.2 <i>Objetivo</i>	3
1.3 <i>Organización de la memoria</i>	4
2 Metodología	7
2.1 <i>Método de localización, selección y evaluación de estudios</i>	7
3 Investigación	9
3.1 <i>Variables de interés</i>	9
3.2 <i>Estudio previo</i>	11
3.2.1 Radiotelemetría [10] [11] [12]	11
3.2.2 Microchips [14]	12
3.2.3 Sensores capacitivos [15]	13
3.2.4 Sensores de humedad [16]	14
3.2.5 Chaqueta de algodón para electrocardiograma [17] [18]	15
3.2.6 Método del manguito de cola [19]	16
3.2.7 Tabla resumen	18
3.3 <i>Elección de métodos y variables</i>	19
3.3.1 Fotopletiografía [20] [21]	19
3.3.2 Eulerian Video Magnification [22]	20
3.3.3 Elección de métodos y variables definitivas	21
4 Experimentación	25
4.1 <i>Introducción y preparativos para la prueba</i>	25
4.1.1 Las ratas Wistar	25
4.1.2 Exposición al estímulo	26
4.2 <i>Pruebas realizadas en el laboratorio</i>	26
4.2.1 Prueba técnica de equipo	27
4.2.2 Prueba de control	28
4.2.3 Prueba de estímulos auditivos	29
5 Resultados y análisis	33
5.1 <i>Medida conductual</i>	33
5.1.1 Resultados conductuales	33
5.1.2 Conclusiones	78
5.2 <i>Medida de temperatura</i>	80

5.2.1	Evolución de las temperaturas medidas en el experimento del grupo de machos	81
5.2.2	Evolución de las temperaturas medidas en el experimento del grupo de hembras	82
5.2.3	Conclusiones	83
6	Conclusiones, limitaciones y líneas de investigación futuras	85
6.1	<i>Conclusiones</i>	85
6.2	<i>Dificultades y mejoras</i>	85
6.2.1	Factores externos	86
6.2.2	Limitaciones	86
6.2.3	Mejoras	86
6.3	<i>Líneas de investigación</i>	87
6.3.1	Línea de investigación del proyecto	87
6.3.2	Líneas de investigación futuras	87
7	Referencias	89
8	Anexos	91
8.1	<i>Anexo 1: Software Tracker™</i>	91
8.2	<i>Anexo 2: Código de Matlab™ para la adquisición de gráficas</i>	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla resumen de todas las metodologías estudiadas para la medición de variables fisiológicas de la rata.

Tabla 2. Tabla resumen de todas las fases e intervalos de tiempo de cada una de las ratas durante la experimentación.

Tabla 3. Resumen contabilización de conductas y otras variables del macho 1.

Tabla 4. Recorrido total y velocidades máxima y mínima del macho 1.

Tabla 5. Resumen contabilización de conductas y otras variables del macho 2.

Tabla 6. Recorrido total y velocidades máxima y mínima del macho 2.

Tabla 7. Resumen contabilización de conductas y otras variables del macho 3.

Tabla 8. Recorrido total y velocidades máxima y mínima del macho 3.

Tabla 9. Resumen contabilización de conductas y otras variables de la hembra 1.

Tabla 10. Recorrido total y velocidades máxima y mínima de la hembra 1.

Tabla 11. Resumen contabilización de conductas y otras variables de la hembra 2.

Tabla 12. Recorrido total y velocidades máxima y mínima de la hembra 2.

Tabla 13. Resumen contabilización de conductas y otras variables de la hembra 3.

Tabla 14. Recorrido total y velocidades máxima y mínima de la hembra 3.

Tabla 15. Tabla resumen de las medidas de temperaturas y los gradientes correspondientes de cada sujeto.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema definición homeostasis como diagrama de regulación de temperatura. Imagen modificada. Tomada de [26]
- Figura 2. Imagen del Sistema Auditivo Periférico de la rata. Imagen modificada. Tomada de [6]
- Figura 3: Esquema de la organización de la memoria.
- Figura 4: Esquema de localización, selección y evaluación de estudios.
- Figura 5: Fotografía de ejemplo de electrodo para la monitorización inalámbrica o Radiotelemetría. Tomada de [27]
- Figura 6: Esquema del método de microchips instalados en el cerebro de la rata. Tomada de [14]
- Figura 7: Sistema de coordenadas, aceleraciones lineares y angulares y momentos del movimiento de la rata. Tomada de [14]
- Figura 8: Ejemplo del circuito integrado de 4x4 sensores capacitivos. Tomada de [15]
- Figura 9: Ejemplo de la posición de la rata en el circuito integrado durante la experimentación. Tomada de [15]
- Figura 10: Esquema del funcionamiento del sensor de humedad. Imagen modificada. Tomada de [16]
- Figura 11: Ejemplo de la chaqueta de algodón utilizada para el Electrocardiograma. Tomada de [17]
- Figura 12: Cubículo transparente donde se sitúa la rata durante el experimento. Tomada de [17]
- Figura 13: Esquema final de los electrodos. Imagen modificada. Tomada de [17]
- Figura 14: Ejemplo de la posición de la rata junto al instrumento de medida (manguito de cola). Tomada de [19]
- Figura 15: Esquematación funcionamiento de la fotoplestismografía en el rostro de un ser humano. Imagen modificada. Tomada de [21]
- Figura 16: Ejemplo de resultados obtenidos por científicos del MIR tras el desarrollo del software Eulerian Video Magnification™. Tomada de [22]
- Figuras 17 y 18: Ejemplos de la amplificación de movimiento obtenidos en el software.
- Figura 19: Posicionamiento de la cámara térmica encima de la jaula de experimentación.
- Figura 20: Logotipo del software Tracker™. Tomada de [23]
- Figura 21: Ejemplo del área de trabajo del software Tracker™. Tomada de [23].
- Figura 22: Fotografía del laboratorio de Biología animal de la Universidad de Sevilla. Área de las ratas.
- Figura 23: Normas para el alojamiento de las ratas.
- Figura 24: Esquema de la metodología a seguir en la prueba de estímulos auditivos.
- Figura 25: Dibujo de ejemplo de jaula a utilizar en las pruebas.
- Figura 26: Disposición de la rata y de la cámara termográfica en las pruebas.
- Figura 27: Ejemplo de cálculo de trayectoria de una rata. Etograma.
- Figura 28: Fotografía del día de la prueba de control. Distribución general del equipo de observación.
- Figura 29: Fotografía de la disposición del equipo de experimentación el día de la prueba de estímulos.
- Figura 30: Fotografía del generador de onda utilizado durante la prueba.
- Figura 31: Fotografía de los altavoces utilizados durante la prueba.

Figura 32: Fotografía de la cámara termográfica utilizada durante la prueba.

Figura 33: Fotografía de la jaula de experimentación vista desde arriba.

Figura 34: Ejemplo de ahuyentador de ratas. Tomada de [26]

Figura 35: Prestaciones de un ahuyentador de ratas común. Tomada de [26]

Figuras 36, 37 y 38: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 1 durante el tiempo de acondicionamiento.

Figuras 39, 40 y 41: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 1 durante el estímulo de 55 kHz.

Figuras 42,43 y 44: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 1 durante el 1º tiempo de relajación.

Figuras 45, 46 y 47: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 1 durante el estímulo de 8 kHz.

Figuras 48, 49 y 50: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 1 durante el 2º tiempo de relajación.

Figuras 51, 52 y 53: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 2 durante el tiempo de acondicionamiento.

Figuras 54, 55 y 56: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 2 durante el estímulo de 55 kHz.

Figuras 57,58 y 59: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 2 durante el 1º tiempo de relajación.

Figuras 60, 61 y 62: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 2 durante el estímulo de 8 kHz.

Figuras 63, 64 y 65: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 2 durante el 2º tiempo de relajación.

Figuras 66, 67 y 68: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 3 durante el tiempo de acondicionamiento.

Figuras 69, 70 y 71: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 3 durante el estímulo de 55 kHz.

Figuras 72,72 y 74: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 3 durante el 1º tiempo de relajación.

Figuras 75, 76 y 77: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 3 durante el estímulo de 8 kHz.

Figuras 78, 79 y 80: Etograma y gráficas de la posición y velocidad del macho 3 durante el 2º tiempo de relajación.

Figuras 81, 82 y 83: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 1 durante el tiempo de acondicionamiento.

Figuras 84, 85 y 86: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 1 durante el estímulo de 55 kHz.

Figuras 87, 88 y 89: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 1 durante el 1º tiempo de relajación.

Figuras 90, 91 y 92: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 1 durante el estímulo de 8 kHz.

Figuras 93, 94 y 95: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 1 durante el 2º tiempo de relajación.

Figuras 96, 97 y 98: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 2 durante el tiempo de acondicionamiento.

Figuras 99, 100 y 101: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 2 durante el estímulo de 55 kHz.

Figuras 102,103 y 104: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 2 durante el 1º tiempo de relajación.

Figuras 105, 106 y 107: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 2 durante el estímulo de 8 kHz.

Figuras 108, 109 y 110: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 2 durante el 2º tiempo de relajación.

Figuras 111, 112 y 113: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 3 durante el tiempo de acondicionamiento.

Figuras 114, 115 y 116: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 3 durante el estímulo de 55 kHz.

Figuras 117,118 y 119: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 3 durante el 1º tiempo de relajación.

Figuras 120, 121 y 122: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 3 durante el estímulo de 8 kHz.

Figuras 123, 124 y 125: Etograma y gráficas de la posición y velocidad de la hembra 3 durante el 2º tiempo de relajación.

Figuras 126,127 y 128: Gráficas de las temperaturas medidas en cada macho durante las pruebas.

Figuras 129, 130 y 131: Gráficas de las temperaturas medidas en cada hembra durante las pruebas.

Figura 132: Línea de investigación del proyecto.

ECG	Electrocardiograma
PPG	Fotopletismografía
Hz	Hertzios o ciclos/segundo
dB	Decibelios
FC	Frecuencia cardíaca
SAP	Sistema auditivo periférico
SNP	Sistema nervioso central
EPIC	Sensores de circuito integrado de potencial
DRL	Electrodos conectados a tierra
AIN	Nitrito de aluminio
LED	Diodo emisor de luz
IPPG	Fotopletismografía de imagen
EVM	Eulerian Video Magnification
MIT	Massachusetts Institute of Technology
k	Prefijo que indica factor de 10^3
t	Variable de tiempo (en s o segundos)
g	Gramos
°C	Grados
cm	Centímetros

1 INTRODUCCIÓN

“Lo único que podemos decidir es qué hacer con el tiempo que se nos ha dado”

El señor de los anillos (J.R.R. Tolkien, 1954)

1.1 Motivación

Existen infinidad de investigaciones sobre el análisis conductual y de variables fisiológicas en la rata que han permitido sacar datos relevantes sobre esta especie al implementarles estímulos de diferentes categorías.

Al ser el sistema auditivo la vía que mayor cantidad de información sensorial ofrece (superado solo por el sistema visual), su activación permitiría obtener datos relevantes sobre posibles cambios conductuales o fisiológicos que pueden resultar interesantes de analizar.

Las ratas albinas, una raza ampliamente empleada como modelo experimental por su fácil control y homogeneidad genética, son, como bien es sabido, mutantes que carecen de ciertos pigmentos (melanina) en sus ojos. El pigmento, la melanina, se produce en dos tipos de células muy específicos, los melanocitos y las células del epitelio pigmentado de la retina, estas últimas derivadas de la misma copa óptica y por tanto del origen neural. Dentro de estas células pigmentarias unos orgánulos especializados, derivados de los lisosomas, los melanosomas, son los responsables de acumular la mayoría de las proteínas implicadas en la biosíntesis de la melanina. En roedores adultos, los melanocitos de la piel se acumulan preferentemente en los bulbos capilares, de ahí que, la piel de estos animales, debajo del pelaje, tenga el color rosado. Pese a lo que se podría pensar, en ratones y ratas de laboratorio, el albinismo tiene su origen en la intervención humana que desde, curiosamente, muy antiguo (el albinismo en roedores está descrito en dibujos y pinturas chinas y japonesas de varios siglos de antigüedad) fue escogida al percatarse de que, estas alteraciones pigmentarias, aparecían espontáneamente en la población, y la perpetuaron de generación en generación. De hecho, se sabe que las personas responsables de su crianza se encargaban de hacer selección genética eligiendo de cada cruce aquellos animales con pelajes más atractivos o exóticos que podían ser luego vendidos. Sea como fuere, el albinismo confiere cualidades diferentes además de color del pelo. Descantan las alteraciones visuales asociadas. Los mamíferos albinos desarrollan el sistema visual de forma anormal, con múltiples alteraciones. En particular, poseen hasta un 30% menos de fotorreceptores bastones, no viéndose afectados, aparentemente, los conos (los bastones son los fotorreceptores que se activan y realizan su función fototransductora en condiciones de baja iluminación), En mamíferos albinos existe igualmente un déficit en neuronas bipolares y células ganglionares. Todo esto implica que los mamíferos albinos manifiesten fotofobia, incomodidad y daño frente a la luz directa. Esta circunstancia, es muy relevante para el bienestar animal y debe solventarse/paliarse, en su estabulación, situando las jaulas con ratones o ratas albinas en los estantes inferiores y/o posteriores, alejándolas en lo posible de la fuente de luz (que habitualmente estará situada en la parte superior de las celdas) y mitigando con ello el estrés lumínico y daño fototóxico al que se ven sometidos sus retinas.

Las graves alteraciones visuales presentes en los mamíferos albinos condicionan su visión muy limitada, y, por ello, se desaconseja su uso en experimentos de comportamiento/conducta que requieran el procesamiento adecuado de estímulos visuales, sin embargo (y aunque también pudiesen presentar alguna especificidad en la respuesta auditiva) son un buen modelo para detectar respuestas a estímulos sonoros [1 - 4].

En general los miembros del Reino animal se caracterizan por la capacidad de respuesta ante estímulos externos que se vincula al desarrollo de un sistema nervioso (inherente a la definición del Reino en sí). Estas respuestas características del organismo se considerarán adaptativas en tanto en cuanto cumplan el principal requisito de mantenimiento de la homeostasis. Cada sistema dentro del animal participa a través de su función particular en el mantenimiento de dicha homeostasis (Walter Cannon) [5], es decir, el mantenimiento de las condiciones constantes del “medio interno” (Claude Bernard). Evidentemente, por tanto, dicha homeostasis es la clave de ajustes fisiológicos en mamíferos también. Estos ajustes se mantienen estables en un determinado valor o rango establecido y para controlar este equilibrio se produce, específicamente el ajuste regido por el control neuroendocrino [6].

Un ejemplo claro del mantenimiento de la homeostasis se produce cuando la temperatura del cuerpo aumenta y el sistema hace que se sude para que vuelva a su situación inicial de equilibrio. De esta forma, cualquier agente que modifique el equilibrio va a provocar una respuesta en el animal que puede resultar interesante estudiar.

Como esquema aclaratorio sobre la definición de homeostasis se encuentra la siguiente imagen. Se aprecia como los efectores reaccionan a diferentes estímulos y actúan como respuesta a él; proporcionando estímulos, en este caso, de subida o bajada de temperaturas.

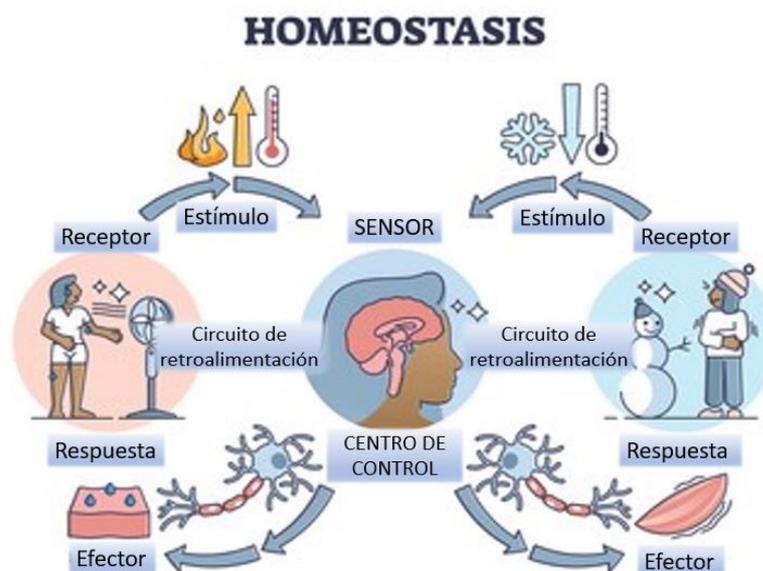


Figura 1. Esquema definición homeostasis como diagrama de regulación de temperatura. [26]

La información sensorial que advierte de la necesidad de “ajustes homeostáticos” llega a través de los diferentes receptores, (obviamente específicos para la variable a identificar). Así, un estímulo sonoro será detectado por sistemas especializados para una determinada frecuencia, por ejemplo. También, claro está, en la especie humana cuando una persona recibe un estímulo sonoro, como la música, éste es captado por el pabellón auricular, viaja por el oído medio y llega a la membrana basilar, parte del oído interno que permite identificar sonidos con distintas frecuencias, donde conecta con el nervio auditivo. A partir de ese momento, el sonido es procesado por el sistema nervioso.

El sistema auditivo se divide en dos partes fundamentales [6]:

1. La “mecánica”: Sistema Auditivo Periférico (SAP)

Es el responsable de los procesos fisiológicos de la audición. Estos procesos consisten mayoritariamente en captar el sonido y transformarlo en impulsos eléctricos. El oído es la parte fundamental de este sistema y está formado por tres partes: el oído externo, el oído medio y el oído interno.

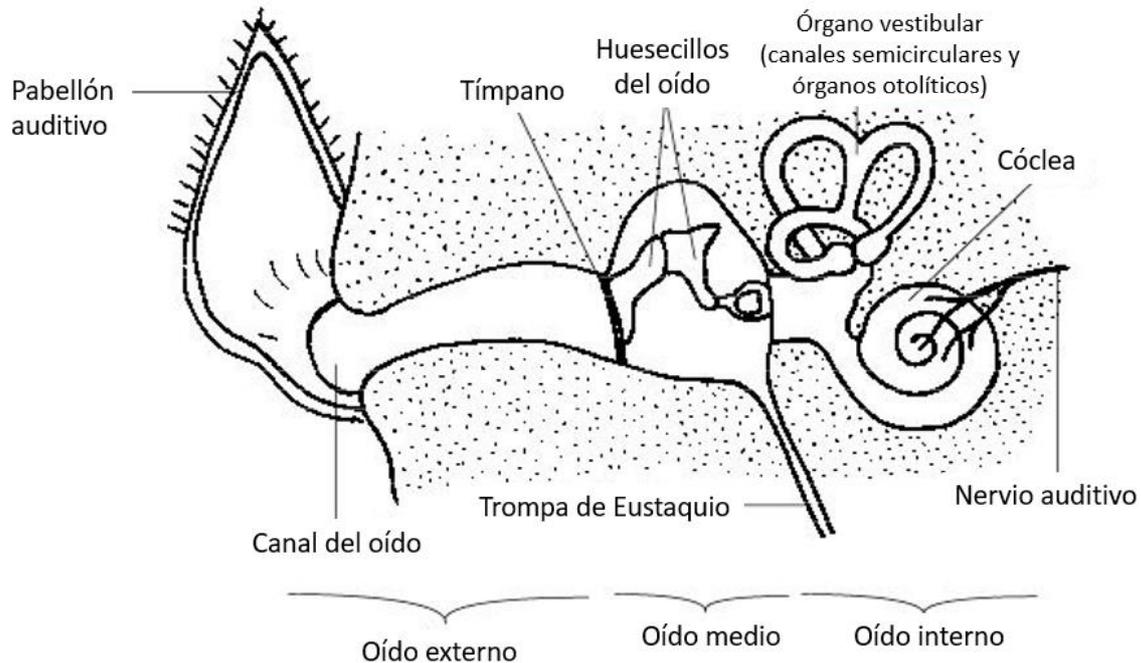


Figura 2. Imagen del sistema auditivo periférico de la rata. [6]

2. La “analítico-conductual”: Sistema Nervioso Central (SNC)

Está constituido por los circuitos de neuronas que conforman el nervio auditivo y vías del tronco cerebral, así como por su corteza, corteza auditiva primaria, corteza de asociación y cuerpo calloso.

Estas neuronas se encuentran en la cóclea, existiendo aproximadamente 30000 que llevan información aferente desde las células ciliadas de cada oído hasta el Sistema Nervioso Central.

Los parámetros de un estímulo dado son probablemente modificados de forma sucesiva en los diferentes niveles de la vía auditiva central. Esta vía es una cadena interconectada de núcleos con varios eslabones, donde los impulsos llegan por las fibras del nervio coclear y también a nivel tronco encefálico.

El sistema es estimulado con un tono modulado en frecuencia. De esta forma, la respuesta neuronal se sincroniza con el estímulo y se originan oscilaciones de la misma frecuencia que la del estímulo. Una buena forma de estudiar la respuesta neuronal sería analizar estas oscilaciones que se producen en función del tiempo o de la propia frecuencia.

1.2 Objetivo

El presente trabajo es un estudio científico, teórico y experimental sobre las distintas metodologías que se suelen utilizar para la medición de los cambios que experimentan las variables fisiológicas de la rata a causa de estímulos auditivos.

El objetivo principal de este proyecto es la propuesta de un modelo experimental sólido basado en sensores térmicos y cámaras para el posterior análisis de la respuesta de las ratas ante estímulos auditivos.

Para alcanzar el objetivo:

- Se exploran todas estas metodologías y se propone un procedimiento que permita el análisis de modificaciones conductuales de la rata, así como la posible correlación de dichas variaciones con ajustes fisiológicos o correlatos vegetativos, concretamente a través de la detección de incrementos de la temperatura corporal
- Se busca un modelo experimental sólido que permita probar dichos estímulos auditivos y que sea de fácil aplicación en el laboratorio.
- Se estudiarán los resultados obtenidos a través de la exposición a diferentes estímulos sonoros para validar la metodología. No obstante, se pretende que, el modelo se lleve a cabo para poder utilizarse en otros proyectos en los que se tenga que comprobar el nivel de estrés o tranquilidad en el animal en función de que el estímulo sonoro que se aplique sea placentero o molesto para ellos.

Por tanto, el objetivo de este proyecto consiste en desarrollar un diseño no invasivo que mida modificaciones en variables fisiológicas en las ratas junto variaciones en sus patrones conductuales para cuantificar la correlación entre ambos.

1.3 Organización de la memoria



Figura 3. Esquema de la organización de la memoria.

Este proceso comienza con un estudio de investigación en el que se analizaron múltiples metodologías para la captación de variables fisiológicas y en el que se han ido descartando y eligiendo variables de interés en función de la necesidad de la prueba y las complicaciones que podrían requerir. La elección de estas variables se ha realizado contando con un gran número de métodos para cuantificarlas que se han investigado en múltiples páginas, artículos y proyectos científicos.

Por tanto, la primera parte de la memoria constará de todas las metodologías que se han ido estudiando junto con sus pros y sus contras, el análisis de variables que podrían resultar de interés en las pruebas experimentales

y el rango característico de las ratas en cada una de ellas.

A continuación, y en función de todo el estudio previo y la valoración de los modelos, se eligieron las variables fisiológicas y de conducta oportunas para esta línea de investigación.

A raíz de esto, se propondrá adecuar un modelo experimental en el que se puedan valorar, analizar y cuantificar estas variables elegidas.

Tras la propuesta del método, se realizaron tres pruebas diferentes de experimentación cuyo objetivo principal era validar el modelo propuesto. Tras estas pruebas se pudieron reunir resultados y extraer conclusiones de estos a través del análisis de la validez del método determinando sus ventajas e inconvenientes.

El número de sujetos utilizados fue de seis (N=6), número limitado al objetivo de analizar la efectividad del modelo de sensores.

Tras analizar el método, se valoraron futuras líneas de investigación en las que se propondrían mejoras y posibles usos del software y el equipo

Por último, se han incluido al final de la memoria dos anexos. El primero describe los pasos a seguir y el principio de funcionamiento del software TrackerTM y en el segundo se encuentra el código utilizado para la extracción de gráficas de posición y velocidad de las ratas.

2 METODOLOGÍA

2.1 Método de localización, selección y evaluación de estudios

A modo de resumen, se muestra el proceso de metaanálisis de la documentación para la identificación de las fuentes primarias y secundarias utilizada en la presente revisión bibliográfica (Figura 3)

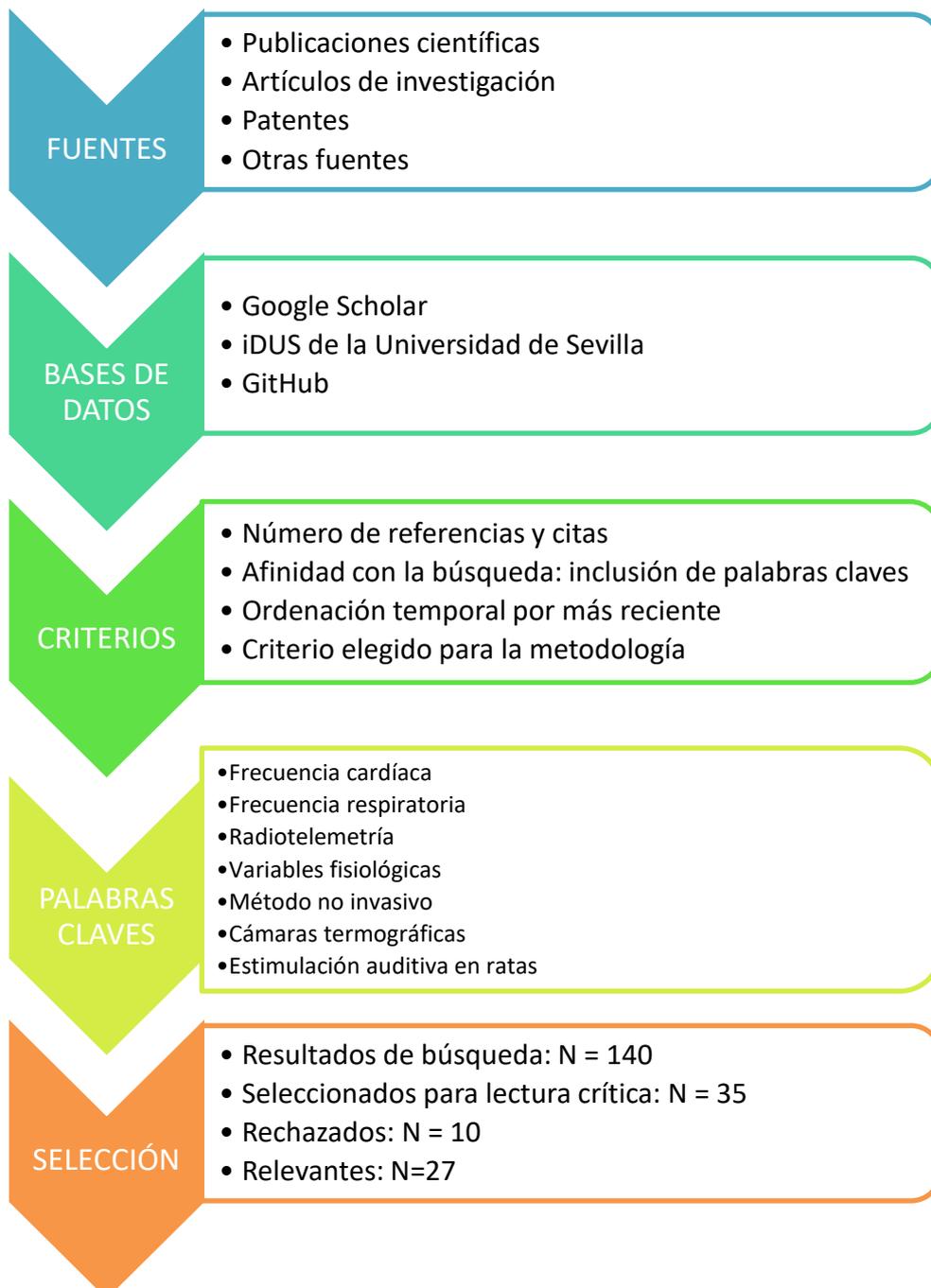


Figura 4. Esquema de localización, selección y evaluación de estudios.

3 INVESTIGACIÓN

La búsqueda de metodologías para cuantificar los cambios en las variables fisiológicas de estos animales es una parte fundamental de este trabajo porque a partir de toda esa información, se podrá ser capaz de proponer un sistema de medición que proporcione datos relevantes en la experimentación.

3.1 Variables de interés

Tras haber explicado el objetivo del trabajo, las variables que más interesarían para estudiar el comportamiento del animal tras disponer de diferentes estímulos sonoros son:

- Frecuencia respiratoria
- Frecuencia cardíaca
- Comportamiento del animal (movimientos que realiza durante el experimento)
- Vocalización de las ratas
- Temperatura
- Piloerección
- Presión arterial

Una de las variables más informativas de como un estímulo está siendo interpretado por un animal es la vocalización del roedor. En una primera instancia se pretendió utilizar un micrófono de ultrasonido en la experimentación para el estudio de los sonidos generados por la rata. La revisión de este grupo de repuestas puso de manifiesto que el estudio de los sonidos emitidos por las ratas era extenso y complejo. Es más, se evidenció que, se podría utilizar una base de datos para el desarrollo de todas las características de estos sonidos y su explicación en función de las reacciones de las ratas. Esto queda fuera del objetivo de este trabajo, pero resultará interesante en futuras investigaciones el uso de un micrófono de ultrasonido para captar estos sonidos animales. Existen gran cantidad de conductas que se pueden relacionar con la frecuencia del sonido que emite la rata en función del estímulo que se le esté proporcionando y sería de gran interés en el estudio comportamental de esta en las experimentaciones.

Concretamente, ante la aparición de alguna situación estresante o de peligro en un grupo de roedores, estos animales utilizan vocalizaciones cuando reciben un estímulo u otro, generándose una serie de códigos. La importancia de las vocalizaciones es mantener la comunicación entre los congéneres con fines de supervivencia, apareamiento, integración y defensa. En las ratas, por ejemplo, los llamados de 22 kHz son característicos durante el rechazo social y ante estímulos adversos y en condiciones de estrés suelen cambiar su tono, que suele ser un tono de baja frecuencia [7].

Los valores característicos de los ultrasonidos que producen las ratas son:

- Rango de 20 kHz: las ratas emiten vocalizaciones de este rango cuando están tristes o estresadas. Estas llamadas se emiten cuando un adulto o joven es derrotado, ve a un depredador, siente dolor o como anticipación al dolor.
- Rango de 30-50 kHz: las ratas lactantes emiten llamadas en un rango muy elevado. Estas llamadas captan la atención materna, propiciando que las crías vuelvan a ser llevadas al nido. Las ratas también emiten estos sonidos de alto rango en situaciones positivas, cuando están jugando y como anticipación a una comida.
- Machos y hembras también producen llamadas ultrasónicas en contextos sexuales. Antes de la cópula, machos y hembras emiten estas llamadas cuando se acercan y huelen. Cuando los machos emiten

estas llamadas, las hembras los solicitan más. Igualmente, las llamadas femeninas hacen que los machos estén más receptivos sexualmente.

Es bien conocido que suelen acompañar la emisión de sonidos agudos ante situaciones de miedo o estrés con pautas de comportamiento, lo cual se estudiará a nivel conductual con la cuantificación del movimiento a través de un etograma. En el etograma se analizará el comportamiento de la rata durante toda la experimentación. Estos animales suelen olisquear e investigar la zona donde se encuentran si se mantienen tranquilos y sin estímulos externos. Pero, sin embargo, cuando el agente estresante es un peligro, llevan a cabo la conocida como “*regla de las 3 F*” (*FIGHT, FLY or FREEZE*) luchar, volar o congelarse, cuyo principio vale para cualquier animal, aunque con diferencias intragrupo entre las que destacan las que se producen por el sexo del animal, lo que implica que es imprescindible realizar la experimentación con machos y hembras.

Estas tres opciones que se les presenta al captar un estímulo de peligro requieren de mucha energía. Si se quedan paralizadas tenderán a hacerse más grandes con la intención de protegerse mientras que si deciden huir o luchar la respuesta será aumentar la tasa cardíaca, aumentar la tasa respiratoria y aumentar la temperatura, es decir, aumentar el metabolismo para conseguir energía. Ya que todas estas variables funcionan a la vez y, por tanto, son solidarias, conseguir medir una de ellas servirá de indicativo para todas las demás. Si se consigue que esa medición sea lo suficientemente fiable, se podrán sacar conclusiones válidas sobre la respuesta del animal ante los diferentes estímulos auditivos.

Un breve repaso puede permitir poner de manifiesto la importancia de esta afirmación, así, la frecuencia respiratoria es una variable muy importante para estudiar pues ofrece gran interés en la respuesta del animal ante los estímulos sonoros. Para una rata, el ritmo respiratorio habitual es de 70-110 respiraciones/min en reposo. Si no permanecen inmóviles, la frecuencia puede variar desde 80 hasta 240 respiraciones/min. Estos valores pueden por tanto servir como referencia para comparar la respiración de la rata durante el experimento, y permitir valorar su aumento o disminución en función de los estímulos sonoros. [8]

De la misma manera se podría registrar la frecuencia cardíaca, otra variable fundamental en la respuesta de la rata. En este caso los valores normalizados son: 300-500 latidos/min. Como se puede apreciar, son valores muy altos para un minuto y, como ya se verá a lo largo del estudio, esto se convertirá en un inconveniente para su registro, pues son complicados de detectar. [8]

Por otro lado, se mediría la temperatura corporal de la rata durante la prueba. Las ratas toleran mejor el frío que el calor pues mantienen una temperatura relativamente alta (37.5-38.5°C) durante todo el año y son animales homeotermos, es decir, mantienen una temperatura corporal relativamente constante, independientemente de la temperatura ambiental. Que su temperatura sea prácticamente constante significa que, aunque varía, lo hará dentro de ciertos límites. En este caso, además, se puede producir una reorganización del flujo de calor haciendo que la temperatura sea mayor en las vísceras, típicamente en situación de reposo, mientras que miembros o cara elevarán su temperatura en una situación potencial de ataque, por ejemplo. Se intentará medir la temperatura y relacionar su aumento o disminución (pese a variar poco) con el resto de las variables fisiológicas de interés. [9]

Si además se consigue que se correlacione con la conducta y el movimiento del animal, se tendría un diseño óptimo que emplease una variable fisiológica que correlaciona con el cambio conductual.

Para que se materialice la anteriormente citada reorganización de la distribución de la temperatura corporal, es vital la participación del sistema vascular que, mediante ajustes del calibre de los vasos, permite los mencionados ajustes de flujo de calor. Paralelamente, dicho sistema vascular esta, obviamente, relacionado con la frecuencia cardíaca y ambos efectos son responsables del manteamiento de la presión arterial. Los valores normales en las ratas de presión en las arterias son de 80-120 mm Hg. La presión arterial, al igual que la frecuencia cardíaca o respiratoria, son variables fisiológicas que permiten relacionar conductas y cambios en el individuo de estudio según los estímulos o factores externos o internos y por las que, al medirlas, se puede llegar a conclusiones específicas según el estímulo.

El objetivo principal de este proyecto consiste en relacionar variables fisiológicas y de conducta de forma no invasiva en un modelo animal. La implementación de las medidas de frecuencia cardíaca, respiratoria, de presión arterial o de temperatura sería un gran paso para relacionarlas con una cuantificación del movimiento asociado a cada conducta de la rata. De esta manera, se conseguiría un primer modelo de medición y análisis no invasivo para la continuación de esta línea de investigación en el futuro.

Para cerrar el estudio de variables fisiológicas de interés cabe citar la piloerección. Esta respuesta tiene dos efectos: uno directamente relacionado con las modificaciones de la temperatura y otro (de carácter más emocional) con el aparente aumento de tamaño del sujeto de que de ella se deriva. La piloerección es el fenómeno de contracción involuntaria de los músculos erectores del pelo en la base de los folículos pilosos que provoca que el vello se erice. Esta variable está directamente relacionada con la presión sanguínea pues, lo que origina la contracción de los músculos erectores del pelo y el consecuente levantamiento de cada capilar, es el estrechamiento de los vasos sanguíneos continuos, es decir, el aumento de la presión sanguínea. Por tanto, al medir la piloerección se podría relacionar la presión sanguínea y obtener dos variables fisiológicas nuevas de interés.

3.2 Estudio previo

Para el estudio de todas las variables fisiológicas y los cambios conductuales que experimenta el animal, se ha realizado una revisión sobre los métodos existentes que pueden utilizarse para medir estos parámetros.

En una primera instancia, se contempló medir la frecuencia respiratoria y la cardíaca a través de una serie de métodos no convencionales y la mayoría, invasivos para la rata. Se van a ir comentando uno a uno y la explicación de por qué no se han tenido en cuenta a lo largo del proyecto.

3.2.1 Radiotelemetría [10] [11] [12]

Es una monitorización inalámbrica que permite la medición remota de magnitudes físicas y eventos electrocardiográficos a distancia. Combina sensores y transmisores muy pequeños. La adquisición de datos consta de un receptor que convierte la señal de frecuencia analógica obtenida por el sensor en una señal digital. Esta medida es muy sensible a los cambios fisiológicos y permite obtener medidas más detalladas y específicas. Con este método se realiza la adquisición de la presión arterial, la frecuencia cardíaca, el electrocardiograma y la temperatura del animal.

El único inconveniente que tiene esta metodología es que hay que implantar los dispositivos de telemetría bajo anestesia general a los animales. Esta es la principal causa por la que no se ha elegido este método pues se busca la mínima invasión física en el mamífero. Por el contrario, a su favor consta que, al implantarle los sensores y tras despertarse de la anestesia general, los animales no sufren ningún tipo de variación ni estrés que pueda afectar a la recogida de los parámetros buscados. Tienen libertad total para moverse y no les afectan restricciones físicas que puedan alterar los resultados de los parámetros medidos.

Existen muchos tipos de dispositivos de telemetría, dependen del tamaño del animal, del propósito de su estudio, etc. Para el presente proyecto se exploraron los dispositivos adecuados a ratas y ratones. Éstos se suelen implantar en la arteria carótida o abdominal y consisten en una punta de catéter con la posibilidad de transferencia por radio (de ahí el prefijo del nombre).

Aunque la telemetría representa el patrón de referencia para el registro de ECG en ratas, la implementación de sistemas telemáticos conlleva altos costos.

Los métodos no invasivos como el método de manguito de cola o electrodos que monitorean registros como un ECG suelen ser escogidos para la adquisición de datos en animales conscientes y despiertos, pero requieren de restricciones físicas y posibles niveles de estrés en el animal. [13]



Figura 5. Ejemplo de electrodo para la Radiotelemedría. [27]

3.2.2 Microchips [14]

La idea de esta metodología creada en agosto de 2021 se asemeja a la de la telemetría. Es un método muy invasivo pero que consigue resultados específicos y precisos. Permite el registro continuo a largo plazo de la frecuencia cardíaca, la actividad neurovascular del cerebro y el movimiento de la cabeza de roedores.

El sistema utiliza el registro de señales intrínsecas ópticas para medir el volumen de la sangre cerebral, el cual, se puede correlacionar con la actividad neuronal.

Este método destaca por su bajo coste gracias a la producción en masa de dispositivos electrónicos de este formato.

El procedimiento quirúrgico es convenientemente corto (menos de 30 minutos) y se realiza bajo anestesia general. Se pega el microchip al cráneo y se cierra con resina negra. Los animales, tras esto, tardan entre 3-4 días en recuperarse gracias a la administración de analgésicos.

El microchip consta de un sensor óptico, un led verde y otro azul y un sensor de movimiento. Registra la aceleración en tres direcciones y el momento angular.

Los autores de este sistema utilizaron un software llamado Open Source Computer Vision Library™. Este software, de código cerrado, permite el rastreo en tiempo real y el seguimiento de la posición de los ratones a través de un marco de visión. En adicción, controlaban las señales emitidas por el sensor del cerebro con un microcontrolador (Raspberry Pi 3b+ o 4b) que recopilaba los datos adquiridos.

Observamos que esta metodología es perfecta para el análisis de los registros que se buscan en esta investigación. Se registra tanto la frecuencia cardíaca como la actividad neuronal del cerebro y, además, gracias al software que se utiliza, son capaces de captar el registro conductual del animal (los movimientos que realiza y las posiciones que va siguiendo durante la experimentación).

Aun teniendo todas las bases para ser el método idóneo, se descartó por la misma razón por la que no se utilizó la telemetría, su gran invasión física en el animal. Se busca durante todo el proceso de investigación una metodología no invasiva y por tanto es conveniente descartar este sistema de microchips.

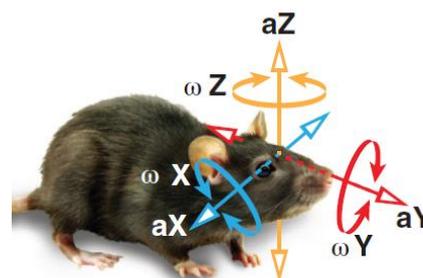
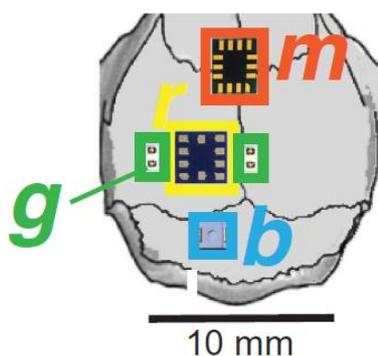


Figura 6. Método microchips en el cerebro de la rata [14] Figura 7. Coordenadas y momentos del movimiento de la rata [14]

3.2.3 Sensores capacitivos [15]

Sensores de circuito integrado de potencial eléctrico EPIC. Estos sensores se integran en una matriz 4x4 (16 sensores).



Figura 8. Ejemplo circuito integrado de sensores capacitivos [15]

En esta metodología se busca minimizar las influencias externas que podrían modificar la respuesta de los animales. Tanto el post operatorio de una cirugía con anestesia general, como factores externos que provoquen estrés a los roedores se eliminan en este método.

Se estudió en profundidad pues las posibilidades que ofrecía el sistema eran muy amplias. No es invasivo como los anteriores comentados y permite el registro tanto de la frecuencia cardíaca como de la respiratoria.

Los sensores capacitivos, creados por López y Richardson, son un tipo de electrodo seco, no requieren contacto óhmico con el cuerpo ya que funciona como un condensador colocado en serie con la piel. De esta forma, la señal que generan se acopla capacitivamente.

Lo interesante de estos sensores es que, a diferencia del resto, éstos no necesitan contacto físico con la piel, sino que se pueden usar sin contacto. Sin embargo, el inconveniente más desfavorable de este método es la existencia de altos niveles de ruido externo que interrumpen y confunden la señal que se quiere estudiar. Su sensibilidad a los movimientos también afecta al registro de los parámetros por la misma razón que el ruido externo.

Se comprobó en el artículo en el que se basa esta información, que no hay mucho conocimiento sobre el uso de estos sensores en roedores. El propio artículo se centra en la experimentación de ellos, por lo que permite conocer directamente las dificultades que presentan:

1. Pequeña amplitud de la señal cardíaca (debido al tamaño minúsculo de su corazón)
2. Uso de diferentes tipos de filtro para eliminar el ruido externo que se genera. Este último inconveniente es el que más podría afectar en la presente investigación. Si ya de por sí el sensor capacitivo captaba cualquier ruido externo, el uso de sonidos como estímulos para el experimento terminaría de eliminar cualquier señal buena de la frecuencia respiratoria.

En la experimentación del artículo, llevaron a cabo el registro de la señal de frecuencia respiratoria gracias a la matriz de sensores. Tuvieron que aplicar un filtro Notch para eliminar los ruidos de 50 Hz y sus múltiplos, un filtro de paso bajo y, por último, al no ser suficiente, un filtro polinómico de 5º orden de Savitzky-Golay. Todos estos filtros no serían suficientes para eliminar el ruido de los sonidos que se tendrían que poner como estímulos en el protocolo que se propone probar. En este caso, se podría utilizar una señal antiruido que eliminase la de la señal de los sonidos, tecnología descartada por la poca información que se encontró sobre ella.

Para el registro de la frecuencia cardíaca obligaron al roedor a tener siempre en contacto una de las patas con uno de los sensores, utilizaron electrodos DRL conectados a tierra para eliminar completamente el ruido externo. Aun así, sería una alternativa que no sería compatible con el diseño propuesto para esta investigación pues se busca la total libertad de movimiento del ratón. Es por ello por lo que también se descartó esta metodología.

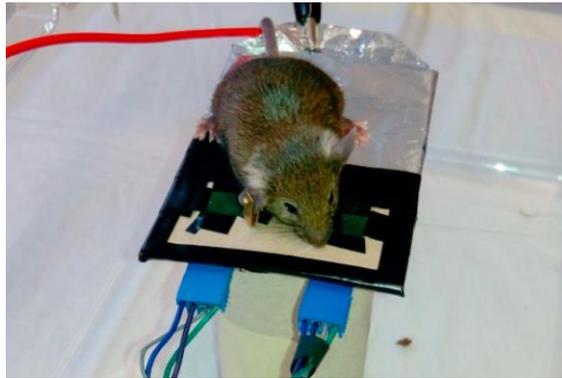


Figura 9. Ejemplo de la posición de la rata en el circuito integrado. [15]

3.2.4 Sensores de humedad [16]

En este método se encontró un sistema de medición no invasivo de bajo costo y configuración. Consiste en un sensor de humedad de alta sensibilidad.

El sensor capta la diferencia de humedad entre aliento exhalado e inhalado para sacar la frecuencia respiratoria. Está formado por una capa de silicio de 10 μm de grosor, otra capa de AIN (recubierta con una película de material de detección de humedad). AIN se define como un material piezoeléctrico debido a sus propiedades (Nitrito de aluminio). Todos los materiales que se utilizan en el diseño son hidrofóbicos, es decir, que tienen la capacidad de repeler el agua. Los cambios en la humedad se detectan mediante el seguimiento de los cambios en la frecuencia de resonancia del sensor.

El sensor se fija en una placa de circuito impreso que se integra en una máscara facial como la de la figura.

Como se puede observar, este método presenta todas las ventajas que se busca en los sistemas de medición, pues es fácil de fabricar y sobre todo es no invasivo para el animal, obteniendo una referencia de medida bastante acertada.

Se pretende la total libertad de movimiento del animal, pues uno de los factores que se va a estudiar es la conducta de éste. Para ello se necesita que el animal se mueva y no tenga restricciones. El uso de esta metodología no permitiría este aspecto primordial, y se contaría, tan solo, con un roedor parado con la cabeza cubierta por una máscara transparente.

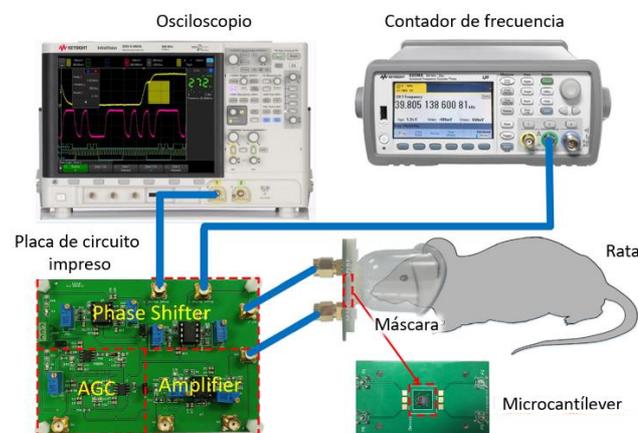


Figura 10. Esquema funcionamiento del sensor de humedad. [16]

3.2.5 Chaqueta de algodón para electrocardiograma [17] [18]

Con esta metodología, basada en el estudio realizado por Pedro P. Pereira-Junior, Moacir Marocolo, Fabricio P. Rodrigues, Emiliano Medei y Jose H.M. Nascimento, se busca probar un método no invasivo y barato para el registro de electrocardiograma en ratas conscientes, evaluando su viabilidad para el análisis de la frecuencia cardíaca.

Para la captación de la frecuencia cardíaca, utilizan electrodos como el que se utilizaban en la metodología de los sensores capacitivos. Estos electrodos se colocan en la zona del abdomen de la rata, habiéndole rasurado previamente la zona, y se sujeta gracias a la creación de una chaqueta de algodón que se coloca en al animal, dispuesta de la siguiente forma:

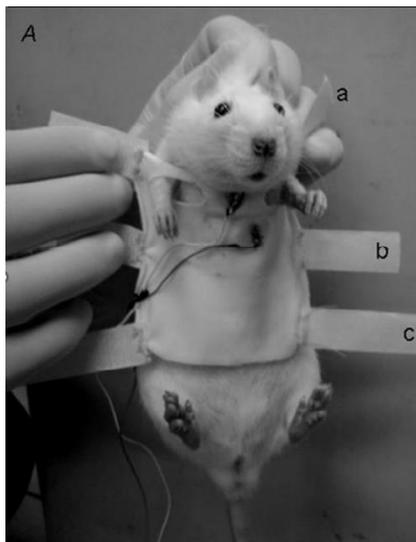


Figura 11. Ejemplo chaqueta de algodón para ECG. [17]

Como están sujetos por la chaqueta, los electrodos se encuentran en constante contacto con la piel del animal, ofreciendo así un registro de la señal nítido y bastante acertado.

Lo bueno de esta metodología es la técnica no requiere intervenciones quirúrgicas y se integra en el cuerpo del animal. No produce ningún tipo de estrés ante factores externos pues el simple contacto de electrodos en su piel no le genera, en principio, ningún malestar.

Este método se basa en la idea de la matriz 4x4 de los sensores capacitivos, en la cual, una de las patas del animal debía estar en contacto continuo con electrodos conectados a tierra para el registro de la frecuencia cardíaca.

A pesar de encontrar la forma de llevar el electrodo pegado al cuerpo del roedor, este sistema tampoco permite la total libertad en los animales. El sistema de sujeción que lleva colocado está conectado a través de cables que podrían enredarse con el roedor a lo largo de la experimentación. En el experimento del artículo en el que se basa este sistema, utilizan un tubo transparente donde se coloca el roedor durante el registro de la frecuencia cardíaca. Lo hacen de esta forma para evitar lo mencionado anteriormente, el posible enredo con los cables.

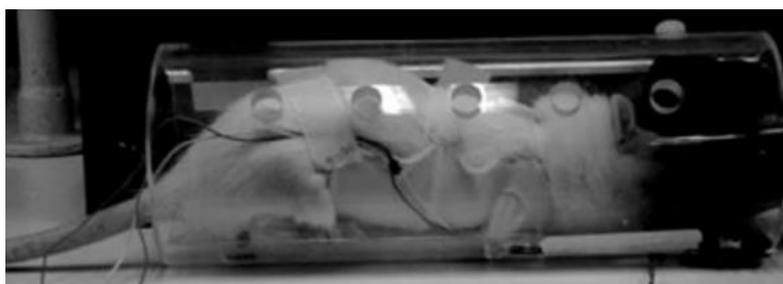


Figura 12. Cubículo transparente donde se sitúa la rata durante el experimento. [17]

Este modelo es, posiblemente, uno de los que más se asemeja al objetivo de esta investigación. No afecta al animal ni lo invade de forma física. A pesar de ello y como se restringe un porcentaje bastante alto la movilidad del sujeto fue descartado a pesar de su cómoda medición de la frecuencia cardíaca.

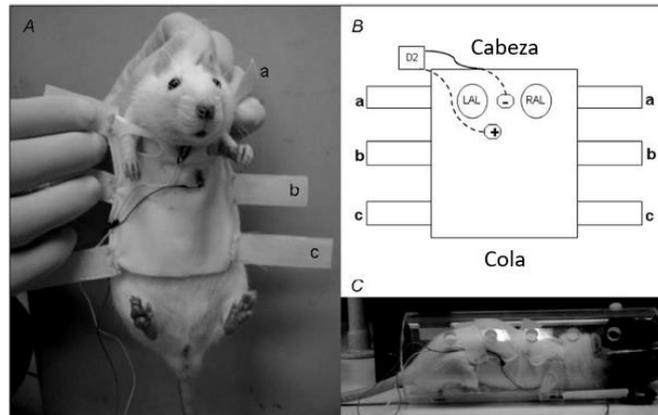


Figura 13. Esquema final de los electrodos. [17]

3.2.6 Método del manguito de cola [19]

La presión arterial es un parámetro muy importante que se puede correlacionar con varios parámetros fisiológicos como la frecuencia cardíaca o la respiratoria.

Este instrumento consigue detectar la onda de pulso de la cola de la rata no anestesiada gracias a una suficiente vasodilatación de ésta. El aparato está formado por: un compresor, un detector del pulso de la cola, un amplificador, un procesador de señal y un indicador.

El detector de pulso consiste en tubos de goma translúcida de paredes finas instalados en paralelo entre los que se coloca la cola de la rata. Una vez colocada se comprime el caudal arterial simultáneamente desde la parte superior e inferior con un compresor de aire automático.

El pulso de la cola se detecta gracias a un captador fotoeléctrico compuesto por una lámpara de lente y un diodo de silicio.

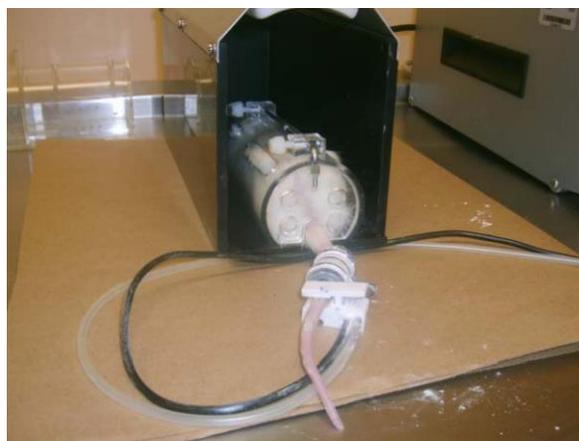


Figura 14. Ejemplo de la posición de la rata junto al instrumento de medida. [19]

Hasta ahora la detección de la presión arterial sistólica se realizaba durante el desinflado del manguito, pero existen métodos más novedosos donde la detección se realiza durante el inflado. Por lo que se ha estudiado, ambos métodos son igual de válidos y funcionan prácticamente de la misma forma.

Como se ha podido comprobar, esta metodología no requiere de un alto coste de fabricación ni resulta un método complicado. Pero por la misma razón por la que se han descartado la mayoría de las metodologías, la falta de movilidad para el propio animal durante la experimentación se ha descartado ésta.

3.2.7 Tabla resumen

	EN QUÉ CONSISTE	INVASIVO	QUÉ MIDE	INCONVENIENTES	VENTAJAS
RADIOTELEMETRÍA [10] [11] [12]	Monitorización inalámbrica con la libertad de moverse en cualquier momento y seguir registrando sus datos	Si	Registro de la actividad, Frecuencia cardíaca y la temperatura	Se necesita cirugía para implantarle a la rata los sensores en la arteria carótida	Animales conscientes y con libertad de movimientos
MICROCHIPS [14]	Sistema de microchip. Incluye diodo emisor de luz verde, sensor óptico, luz azul y sensor de movimiento	Si	Registro continuo de la actividad neurovascular y el análisis de la frecuencia cardíaca	Implantación de los microchips en el cerebro. Anestesia y cirugía (<30 mins)	Animales conscientes y con libertad de movimientos
SENSOR CAPACITIVO MATRIZ 4X4 [15]	Electrodos que no requieren contacto óhmico con el cuerpo. Actúan como condensadores en serie con la piel, de modo que la señal se acopla capacitivamente. Situados en una plataforma en forma de matriz 4x4, donde se colocaría al animal	No	Mide la frecuencia respiratoria. Para la cardíaca habría que utilizar electrodos conectados a tierra y a la pata del roedor (inconveniente)	1. Se necesita eliminar ruido externo. SOLUCIONES: · Filtro de paso bajo o Notch · Uso de electrodos conectados a tierra 2. Pata de la rata siempre conectada a electrodo	No necesita ni anestesia ni cirugía. Animales conscientes
SENSOR HUMEDAD [16]	Sensor compuesto por un micro cantiléver resonante de nitruro de aluminio recubierto con una película de óxido de grafeno. Detecta la diferencia de humedad entre el aliento exhalado y el inhalado	Medio	Puede controlar la frecuencia respiratoria en tiempo real	La cabeza del animal tiene que estar dentro de una máscara facial cerrada donde se coloca el sensor de humedad (no movimiento)	Método innovador y barato. Se contempla la idea de meter una cámara en la máscara y obtener imágenes del ojo durante el proceso
CHAQUETA ECG [17] [18]	Método no invasivo para el registro del ECG. Chaqueta de algodón elástico con electrodos implantados en ella que están en contacto con el animal para medir la frecuencia cardíaca	Medio	Mide la frecuencia cardíaca obteniendo un ECG.	Hay que rasurar el pelo de la zona abdominal para un mejor contacto con el electrodo. Posibles enredos del animal con los cables	No necesita ni anestesia ni cirugía. Animales conscientes y con libertad de movimiento. Método barato
MÉTODO MANGUITO DE COLA [19]	Manguito de goma que se coloca en la cola de la rata y que mediante el registro de la presión volumétrica mide la presión arterial	Medio	Mide la presión arterial basándose en el pulso de la cola	Método con limitaciones. Animal sin movimiento	No necesita ni anestesia ni cirugía. Animales conscientes. Método barato

Tabla 1. Tabla resumen de todas las metodologías estudiadas para la medición de variables fisiológicas de la rata.

3.3 Elección de métodos y variables

Como se ha observado a lo largo de todo el estudio previo, el registro de variables fisiológicas como la frecuencia cardíaca y la respiratoria no son métodos factibles de realizar debido a las condiciones de registro que requieren y que no son aplicables al presente proyecto de investigación.

Dado que el objetivo, como se ha explicado anteriormente, es registrar las máximas variables posibles mientras el animal está despierto y en libertad de movimiento esta premisa limita mucho el tipo de sensor de elección. Para el registro detallado de estas variables es necesario el uso de microchips o sensores muy invasivos que no permiten seguir el principio de libre movimiento. Por tanto, se debe buscar una alternativa para registrar parámetros de interés, aunque no sea de manera específica, pero que permita llegar a una serie de resultados y conclusiones con respecto a los estímulos.

Por tanto, se observa que la manera más rápida, no invasiva y de bajo coste que se debe utilizar es el acondicionamiento de cámaras, tanto térmicas como estándar, para el registro de los parámetros fisiológicos y el control conductual del roedor.

3.3.1 Fotopletismografía [20] [21]

El primer método se basa en un concepto no descrito hasta este momento llamado Pletismografía. Como es bien sabido, la pletismografía es un método basado en la medición de cambios de presión y volumen que se utiliza para medir parámetros orientados al diagnóstico de enfermedades pulmonares o cardiovasculares.

Con el método de la fotopletismografía se puede conocer el volumen de un cuerpo, estableciendo la cantidad de luz que refleja. Es una técnica ampliamente manejada por especialistas para la monitorización de la frecuencia cardíaca. Es una técnica no invasiva y se han recogido muchos datos relevantes gracias a ella. Puede suministrar el valor de la frecuencia cardíaca a través del registro y análisis de una señal de origen óptico, es decir, de señales luminosas de longitudes de onda específicas.

Esta metodología está muy avanzada hoy en día, en toda la generación de nuevos pulsómetros viene integrado un sensor óptico que constituye una buena herramienta para conocer la frecuencia cardíaca a través de la fotoplestimografía. Solo se necesitan LED verdes que proyectan su luz en la piel y llegan hasta la sangre que circula en las venas, esta luz rebota en la sangre y es captada por un fotodiodo. Estos LEDs pueden intercambiarse también por diodos láser con emisiones en el infrarrojo.

Como la fotopletismografía requiere de una fuente de luz con longitudes de onda específicas y un receptor específico para ese espectro, se trata de una metodología que requiere de dispositivos biomédicos especializados.

Por ello, se comienza a buscar técnicas de procesamiento digital de video para medir parámetros fisiológicos como la frecuencia cardíaca. Es lo que se busca en la experimentación en la que se basa el siguiente artículo que se refiere (monitoreo remoto de frecuencia cardíaca a través de fotopletismografía de imagen), en el cual, se utiliza la fotoplestismografía de imagen. Este sistema se basa en captar las señales de IPPG (fotopletismografía de imagen) de zonas específicas de videos. Es aquí donde entra el principal inconveniente de esta metodología.

En estudios anteriores se ha utilizado esta técnica para la extracción de la frecuencia cardíaca en personas, no en animales, pues su región de interés y de donde se captan las señales es la cara de estas personas. Este diseño es incompatible con su empleo en el caso de roedores. Es más, de conseguirse una adaptación a potenciales modificaciones faciales en la rata, de forma que se calculase las coordenadas de cada región de interés, en el momento en el que el roedor se desplazara o moviese se perdería la señal y se tendría que empezar el procedimiento de captación del rostro de nuevo. Por lo tanto, para obtener una buena señal captada del rostro de la rata, ésta tendría que permanecer inmóvil durante un largo período de tiempo. Una vez más, se descartaría otra metodología con la que se podría captar la frecuencia cardíaca de forma precisa por la restricción de movimiento que supondría para el animal durante la experimentación.

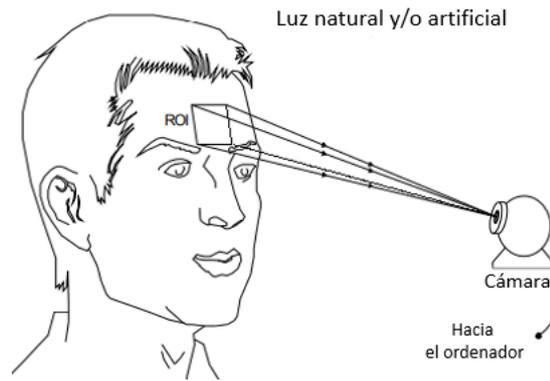


Figura 15. Esquemización de cómo funciona la fotopleletismografía en el rostro de un ser humano. [21]

3.3.2 Eulerian Video Magnification [22]

Se encontró un software desarrollado por investigadores del MIT de código abierto de magnificación de video Euleriana denominado “Eulerian Video Magnification™”.

Este software está desarrollado para amplificar los pequeños movimientos que se producen en un video. Muchos de los ejemplos que daban para su desarrollo eran interesantes para la presente investigación: El pulso de la muñeca de un ser humano o, sobre todo, el movimiento del tórax de un bebe. Este último puede asemejarse al movimiento que se produce en el tórax de una rata al respirar. Es un movimiento leve que al amplificarse con este software podría ser cuantificado para sacar la frecuencia respiratoria del roedor.

Se procedió a instalar el programa y compilar el código abierto que ofrecían. El código se desarrollaba en el programa Matlab™ (software de interés) y se veían los resultados en la propia interfaz de éste.

Un ejemplo claro de cómo funciona el software es el siguiente: se utiliza para visualizar el pulso humano. En la secuencia a) se pueden ver las imágenes del rostro de una persona sin ningún tipo de efecto mientras que en los cuatro fotogramas de b) se observan la señal de pulso del sujeto amplificada. En c) se muestra como este método amplifica la variación de color periódica. En la primera secuencia la variación es imperceptible mientras que en la sometida al programa se aprecia claramente la variación.

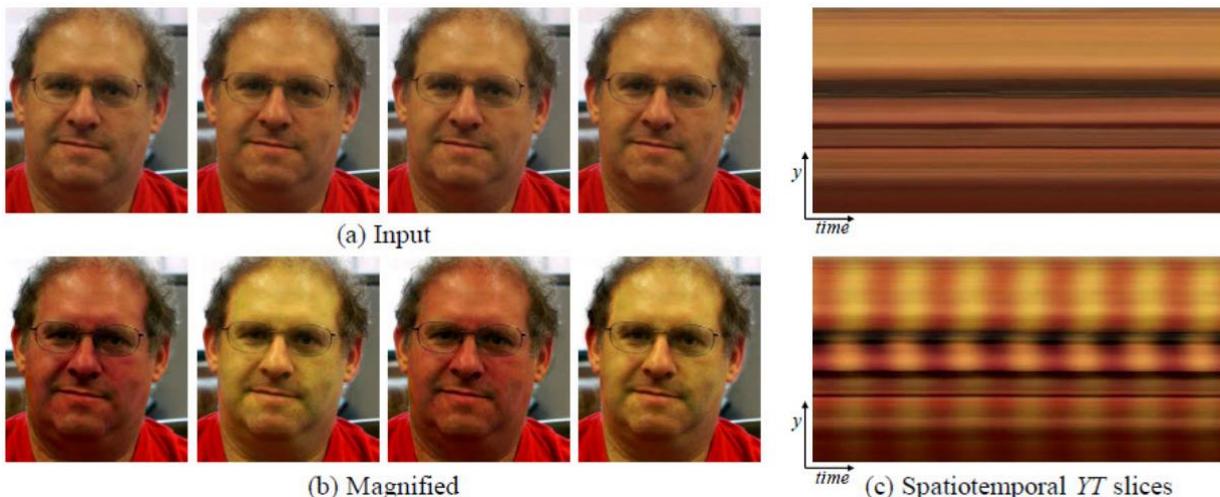


Figura 16. Ejemplo de los resultados obtenidos por los científicos de MIR tras el desarrollo del software EVM. [22]

En primer lugar, se utilizaron los vídeos de ejemplo que el equipo creador ofrecía para ver si funcionaba de manera correcta. Cuando se verificó que lo hacía adecuadamente, se procedió a utilizar un video de roedores en

movimiento en una jaula.

El problema que se obtuvo fue que, al cuantificar los movimientos, el software amplificó cualquier movimiento que detectaba en el vídeo. Se trataba de un inconveniente bastante grande ya que la finalidad de la investigación era la libertad de movimiento del roedor. El software exigía que el objeto en cuestión en el vídeo estuviera estático y solo sufriera un pequeño movimiento, para así amplificarlo. Al captar cualquier movimiento, lo amplificaba y daba como resultado un video imposible de descifrar, como se aprecia en la imagen. Resultó imposible utilizar este sistema, por interesante que fuese, por la restricción de movimiento que exigía.



Figuras 17 y 18. Ejemplos de la amplificación de movimiento obtenidos en el software.

Se amplificaba tanto el color como los movimientos y no se podía distinguir ninguna variación que resultase interesante para esta investigación.

3.3.3 Elección de métodos y variables definitivas

A partir de todo lo descrito se puede afirmar que las tecnologías disponibles no están optimizadas para diseños que permitan el máximo bienestar de los animales de estudio como se pretendía para el presente proyecto. Por tanto, es interesante trabajar en la implementación de sistemas de sensores alternativos que garanticen una mínima afectación en los animales lo que, a su vez, ofrecería una mayor fiabilidad de las inferencias conductuales que, de los resultados que se reuniesen, se concluyeran.

3.3.3.1 Temperatura

Al estar ante varias posibles soluciones, se decidió seguir un camino concreto: encontrar cualquier referencia que permitiera relacionar variables complicadas de medir con otras que fueran más sencillas.

La frecuencia cardíaca y la respiratoria tienen una relación común con varias variables fisiológicas del cuerpo de un ser vivo. La presión arterial, la dilatación de las pupilas o la temperatura son parámetros que pueden resultar más cómodos de medir y que posteriormente pueden ejercer una relación directa con la frecuencia

cardíaca y la respiratoria.

Se ha estudiado que la presión arterial podría medirse a través del método de manguito de cola. Un método barato y fácil de conseguir pero que presenta el mismo conflicto que los métodos para registrar el ritmo cardíaco o el respiratorio: no hay libertad de movimiento.

La dilatación de las pupilas sería un registro muy interesante de obtener y que podría ofrecer resultados muy buenos con respecto a los estímulos. Sería atrayente estudiar los cambios de tamaño que pueden sufrir las pupilas en función de situaciones de estrés, miedo o placer. La sensibilidad del sistema no permite identificar estos cambios en las pupilas de estos animales que, además presentan deficiencias visuales.

Por último, queda el registro de la temperatura. Un procedimiento muy habitual en el día a día y que en principio no debe dar problemas de medición. La temperatura, además, como ya se ha mencionado, guarda una relación directa con la frecuencia cardíaca y respiratoria. Cuando la temperatura sube, como puede ser en el caso de fiebre, se produce un gran aumento de la frecuencia cardíaca y, por el contrario, cuando la temperatura del cuerpo disminuye se produce una bajada de la frecuencia cardíaca, en casos extremos como la hipotermia. Estos efectos probablemente se deben al hecho de que el calor aumenta la permeabilidad de la membrana del músculo cardíaco a los iones que controlan la frecuencia cardíaca, acelerando el proceso de autoexcitación.

El organismo de forma general se encuentra en un estado de reposo, con unos niveles energéticos mínimos de funcionamiento, así como de gasto energético. En el momento en el que el cuerpo necesita responder ante un estímulo, comienza a aumentar la temperatura corporal. Esto produce un aumento del ritmo cardíaco y del volumen de aire movilizado y, además, del volumen de sangre que llega al músculo favoreciendo la irrigación y el aporte energético. Es decir, el cuerpo se prepara para la respuesta. Por tanto, es fácil concluir que es posible registrar la temperatura corporal del animal y relacionarla de manera directa con la frecuencia cardíaca y respiratoria.

Las cámaras termográficas que existen hoy día, lamentablemente, son excesivamente caras y aunque ofrecen una precisión de temperatura muy específica que favorecería bastante la investigación, están fuera del presupuesto fijado para este proyecto. Por ello, se ha elegido una cámara termográfica que no ofrece una gran precisión y que funciona a través de gradientes de temperatura.

La cámara está formada por una pantalla y un sensor de temperatura que se pondrá en dirección a la jaula y, por tanto, a la rata.

Así es como se verá la cámara junto con la imagen de la rata proyectada en la pantalla de temperaturas:

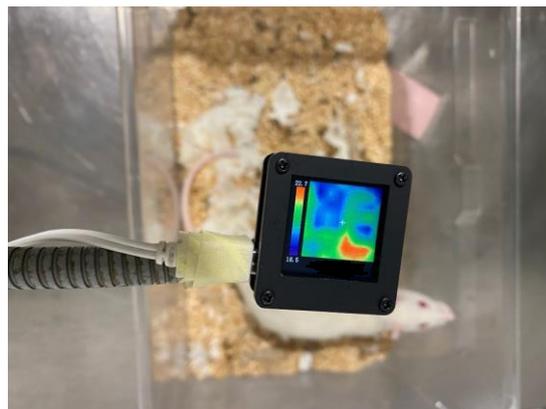


Figura 19. Posicionamiento de la cámara térmica encima de la jaula de experimentación.

Como se aprecia, la temperatura que capta la cámara y que se encuentra señalizada en la pantalla es la referida al punto blanco del centro del sensor. Como el objeto de estudio es la rata, y ésta siempre va a ser el punto más caliente que capte el sensor, la temperatura a la que se va a obedecer es la que se encuentra en la zona más caliente del diagrama de temperaturas.

Aun así, como la cámara no funciona de forma específica, sino que se basa en los gradientes que capta, se aprecia que la temperatura que señala no es la absoluta que tiene el animal, sino que, dados los límites por de precisión

del equipo y el principio del gradiente, es más pequeña. No es relevante pues el objetivo es analizar los cambios de temperatura que se producen en la rata según los estímulos auditivos. No se descarta la búsqueda de una cámara termográfica de mayor calidad para futuras investigaciones.

3.3.3.2 Comportamiento

Los dos grados de control que se quieren estudiar son la medida conductual y la medida de parámetros fisiológicos.

La medida de parámetros fisiológicos ha concluido con la medición de la temperatura gracias a una cámara termográfica de la que se ha hablado en el apartado anterior.

Para la medida conductual del animal, se investiga acerca de un mecanismo que pueda cuantificar el movimiento. Estudiar cuándo el animal se mueve rápido o lento, cuándo se queda estático o cuando intenta huir ante el estímulo proporcionado. Hasta ahora para medir la posición del animal, se utilizaba una cuadrícula y los investigadores iban contando cada cuadrado por el que pasaba el ratón y así cuantificaban su movimiento durante la experimentación.

Para mejorar esta metodología se exploró un sistema de investigación basado en un software de código abierto denominado Tracker™ que fue el elegido para la investigación final de este proyecto. [23]



Figura 20. Logotipo del software Tracker™. [23]

El software Tracker™ consigue realizar el seguimiento tanto manual como automatizado de objetos en movimiento para su análisis de posición, velocidad y aceleración.

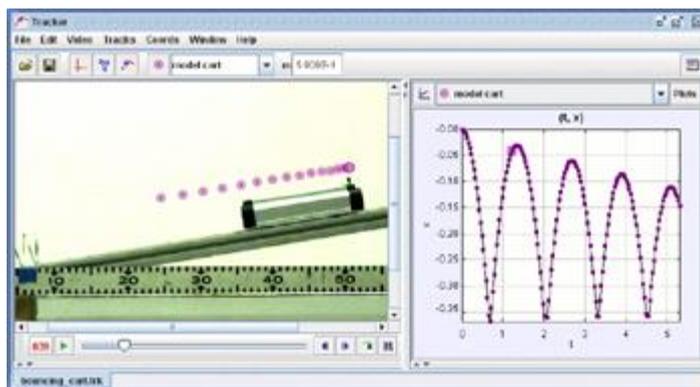


Figura 21. Ejemplo del área de trabajo del software Tracker™. [23]

Con este software se podrán sacar tablas con todas las posiciones (x,y) y velocidades (V_x, V_y) que va teniendo la rata durante las pruebas. El programa permite escalar de forma manual el sistema de coordenadas, la calibración de las medidas de interés (dimensiones de la jaula, por ejemplo) y el número de fotogramas por segundo que se quiere estudiar. Tras el registro de las variables en cuestión, el software permite la exportación de estas tablas a un archivo de texto, o más interesante, a Excel™. Desde Excel™, se sacarán las gráficas mediante Matlab™ correspondientes a estos valores y se podrá estudiar en profundidad los puntos que resulten más interesantes y la evolución tanto de la velocidad como de la posición del animal.

Se verá de forma clara como el animal se queda estático o como de forma repentina empieza a moverse gracias

al análisis de todos estos datos obtenidos a través del software. Una vez estudiado el comportamiento de la rata durante las pruebas se analizarán más en profundidad los momentos de interés que muestren claramente la respuesta de la rata a los distintos estímulos. En estos momentos entrará en juego el estudio de la temperatura del animal, con el que se comprobará cómo sube o baja según la situación de estrés o paz que esté experimentando la rata en ese instante.

4 EXPERIMENTACIÓN

4.1 Introducción y preparativos para la prueba

4.1.1 Las ratas Wistar

Respecto a lo sujetos de experimentación, se utilizaron ratas Wistar macho y hembra (280-360 g) con orejas externas limpias.

Como es sabido, la rata constituye un excelente modelo de estudio para gran cantidad de fenómenos fisiológicos, por ello, no es de extrañar que para este diseño experimental la especie de elección fuera la *rattus norvegicus*, en su variedad, wistar.

Estas ratas son más apacibles que las salvajes y menos propensas a morder. Pueden tolerar mayores niveles de hacinamiento y son fértiles antes que las ratas salvajes, por lo que pueden producir más descendencia. En general son más pequeñas y pesan menos.

Las ratas se encontraban en un recinto en condiciones de estabulación idóneas, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y condiciones de humedad en rango entre 40% a 70 % y temperatura en rango entre 18°C a 25°C, con variación $\pm 2^\circ\text{C}$.



Figura 22: Laboratorio de biología animal. Área de ratas.

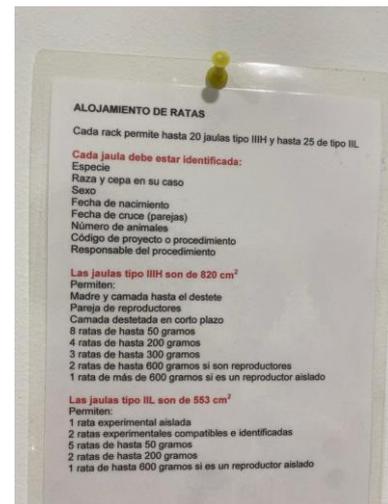


Figura 23: Normas para el alojamiento de ratas.

La disposición que se seguía para la organización habitual de las ratas era la recogida en la imagen anterior.

Cada rata fue extraída de su jaula habitual y colocada en una jaula externa para la experimentación, en la que fueron metiéndose una a una para la recogida de datos.

El empleo de ratas de ambos sexos y la recogida de los datos segregados es imprescindible para una adecuada descripción de los efectos sobre la fisiología del sujeto ante la exposición a cualquier estímulo como, desde 2013, ya recomendase el National Institute of Health (NIH) estadounidense y, en la misma línea, la Unión Europea desde la entrada en vigor del Programa Marco del Horizonte 2020 (Shansky, R.M. 2019).

4.1.2 Exposición al estímulo

Los estímulos acústicos se generaron digitalmente utilizando una fuente de onda arbitrario RIGOL dg1022 a través de altavoces ADAM a3X.

La presión sonora se calibró y se fijó en 60 dB SPL en el punto medio del semicírculo.

Se realizaron dos estímulos sonoros de distinta frecuencia, detallados posteriormente, con intervalos de tiempo similares.

Como el objetivo del estudio era validar la metodología propuesta y no necesariamente sacar conclusiones específicas sobre el comportamiento del animal, se utilizaron dos frecuencias diferentes con el objetivo de validar el modelo presentado en este trabajo. Con esto se buscaba lograr una respuesta en el animal ante los estímulos de frecuencia generados.

Debido a que el método buscaba analizar la reacción de los animales, se realizaron las diferentes pruebas en unos intervalos de tiempo bien definidos, que constan de:

- 20 segundos de acondicionamiento al entorno
- 20 segundos de periodo de estimulación auditiva

En esta fase se expuso a la rata a una onda senoidal de 50 kHz (no nociva).

- 20 segundos de recuperación tras el estímulo:

Para facilitar la comprobación de su respuesta al siguiente estímulo al que se veía expuesto el roedor.

- 20 segundos de acondicionamiento para el segundo estímulo
- 20 segundos de periodo de estimulación auditiva:

En este caso el estímulo fue una onda de 8 kHz (nocivo). Esta frecuencia se ha tomado como referencia de diversos artículos [24], donde se expone la existencia de ahuyentadores de ratas muy eficaces con frecuencias entre 4 y 17 kHz. [25]Estos estímulos son los que se emitieron en la prueba número 3.

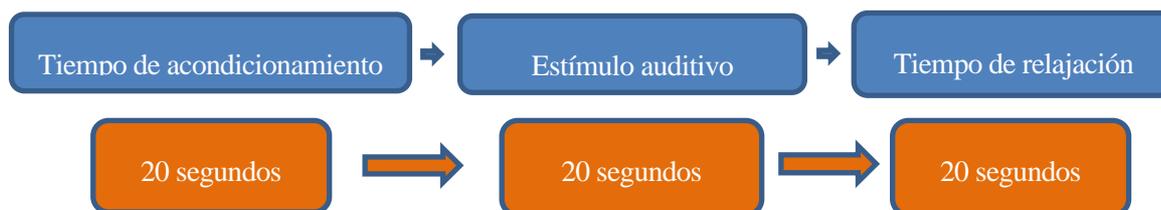


Figura 24. Esquema de la metodología a seguir en la prueba de estímulos auditivos.

4.2 Pruebas realizadas en el laboratorio

Para corroborar la efectividad en el método que se plantea se realizaron tres pruebas en diferentes escenarios y fechas utilizando roedores diferentes en cada una de ellas. En primer lugar, se realizó la prueba técnica de equipo el 1 de junio de 2022; un mes después, el 30 de junio, se realizó la prueba de control y, por último, el 4 de julio se completó el proceso con la prueba de estímulos auditivos.

Toda la experimentación se realizó en la facultad de Biología de la Universidad de Sevilla.

4.2.1 Prueba técnica de equipo

La función de esta primera prueba era la de comprobar el correcto funcionamiento de los equipos que iban a ser utilizados, así como la ubicación de estos y el desarrollo de la propia prueba. Para realizar este primer ensayo solo fue necesario el uso de una rata. Los equipos y situaciones que se analizaron en esta prueba fueron:

- La sala utilizada fue aquella en la que el resto de ratas convivían. Ante la búsqueda de respuestas a través de estímulos externos de los roedores, éste no hubiese sido un entorno correcto, dado que la presencia de otros mamíferos de la misma especie puede causar alteraciones en el sujeto objeto de estudio.
- El animal se colocó dentro de una jaula transparente de 37x 21x18.5 cm, espacio suficiente para captar sus movimientos y reacciones en pruebas venideras.

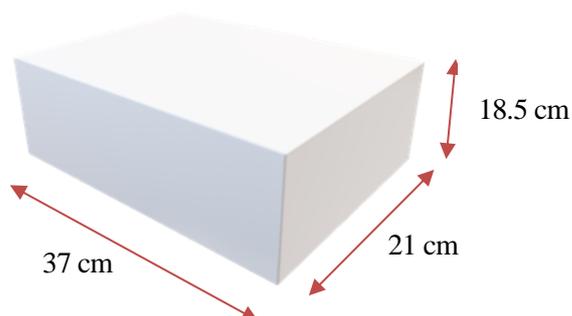


Figura 25. Dibujo de ejemplo de jaula a utilizar en las pruebas.

- La cámara térmica se colocó en la parte superior de la jaula, predispuesta para captar toda el área de movimiento del animal



Figura 26. Disposición de la rata y de la cámara termográfica en las pruebas.

- La cámara de movimiento se colocó de manera similar a la cámara térmica, y sus datos fueron analizados posteriormente haciendo uso del software TrackerTM (cuyo principio de funcionamiento ha sido explicado en el apartado 3.3.3.2)

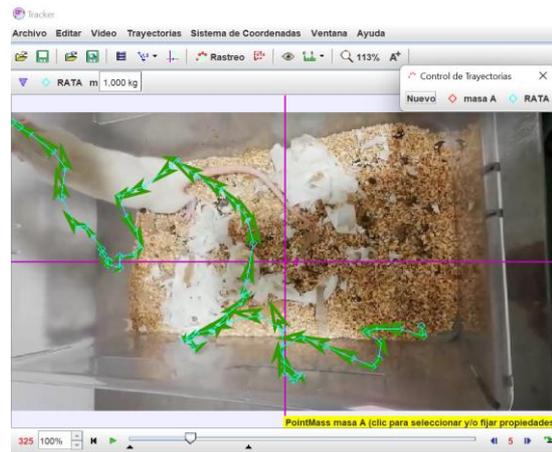


Figura 27. Ejemplo de cálculo de trayectoria de una rata. Etograma.

4.2.2 Prueba de control

La prueba de control se realizó el 1 de junio y su objetivo era realizar un ensayo de los pasos a seguir en la intervención. Consistía en una calibración del sistema de cámaras y los sensores para partir del mismo punto de situación en cada experimento.

En esta prueba se escogieron tres machos y tres hembras, con las características que se han mencionado en el apartado 4.1.1. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se situó el equipo a utilizar de la misma manera que en la prueba técnica. No se cambió de sala pues el objetivo no era obtener respuestas de los animales ante el estímulo, sino realizar un ensayo utilizando los 6 sujetos diferentes y probar los intervalos de tiempo que interesaran y que se iban a establecer en la prueba.
2. Se estableció el tiempo de prueba en un minuto y medio y por tanto se grabaron durante ese tiempo cada uno de los sujetos.
3. Se les proporcionó un estímulo de ruido externo a los 30 segundos de comenzar. En este caso, como la intención era probar los pasos que se iban a seguir, se propuso dejar 45 segundos de acondicionamiento del animal antes del estímulo. Estos 45 segundos se comprobó que podían ser reducidos a 20 en la prueba definitiva.

Primero se realizaron las pruebas a las tres hembras y posteriormente a los machos. El tiempo de acondicionamiento de la primera hembra fue más largo que el del resto de sujetos pues se situó en el lugar de experimentación unos minutos antes de comenzar a grabar. Como se comentará en los resultados de la prueba, esto afectó a su respuesta ante el estímulo y los tiempos establecidos de acondicionamiento y relajación post estímulo.



Figura 28. Fotografía del día de la prueba de control y la disposición del equipamiento.

4.2.3 Prueba de estímulos auditivos

La prueba de estímulos auditivos se realizó el 4 de julio de 2022. La finalidad de esta prueba era simular una serie de experimentaciones con estímulos auditivos en 6 ratas (tres hembras y tres machos), igual que en la prueba de control. En este caso se dispuso de un generador de onda arbitrario RIGOL dg1022 que emitía su señal acústica a través de altavoces ADAM a3X.

La zona de experimentación estaba dispuesta de la siguiente manera:



Figura 29. Fotografía de la disposición del equipo de experimentación el día de la prueba de estímulos.

1. Generador de onda arbitrario RIGOL dg1022



Figura 30. Fotografía del generador de onda utilizado.

2. Altavoces ADAM a3X



Figura 31. Fotografía de los altavoces utilizados.

3. Cámara termográfica

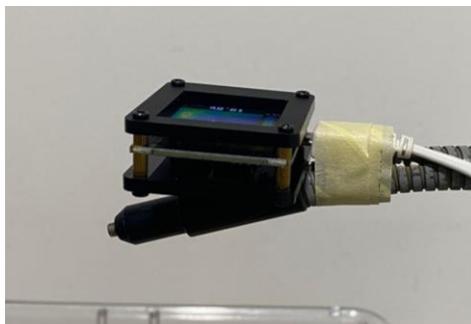


Figura 32. Fotografía de la cámara termográfica utilizada.

4. Jaula de experimentación



Figura 33. Fotografía de la jaula de experimentación vista desde arriba.

Tras la disposición de todo el equipo, la presión sonora del generador se calibra y se fija en 60 dB SPL en el punto medio del semicírculo.

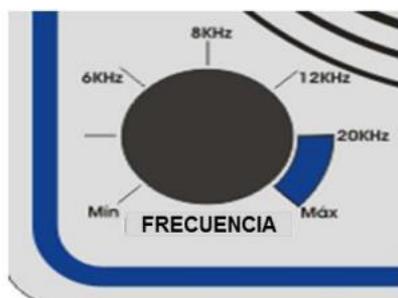
Una vez este todo preparado, se comienza con la experimentación de cada una de las ratas. Como se explicó en el apartado 4.1.2, los estímulos que se van a utilizar son dos:

1. Onda senoidal de 55 k Hz de frecuencia. Frecuencia a la que las ratas no sufren ningún tipo de estrés o miedo.
2. Onda senoidal de 8 kHz de frecuencia. Como se comentó anteriormente, esta frecuencia está sacada de varios artículos anteriores y de la búsqueda de ahuyentadores de ratas sonoros. En diversos artículos se ha estudiado que el intervalo de frecuencia que más puede molestar a las ratas es desde 7 kHz a 35 kHz [24], mientras que los ahuyentadores suelen llevar un intervalo de 3 a 55 kHz. Con toda esta información, se escogió 8 k Hz como estímulo estresante para la rata.[25]

Un ejemplo de un ahuyentador para ratas es el siguiente:



Figura 34. Ejemplo de ahuyentador de ratas. [25]



Carectísticas técnicas

- Alimentación: 90-240 Vca (automática)
- Potencia: 6W
- Consumo de Energía: 0,006kW/h (0,144kWh/día)
- Ángulo de emisión: 75°
- Frecuencia: 4kHz a 35kHz
- Capacidad para conectar 5 emisores.

Figura 35. Prestaciones de un ahuyentador de ratas común. [25]

En la prueba de estímulos auditivos, tal y como se planteó en la figura 24, se siguieron una serie de pautas y órdenes temporales para el desarrollo de las pruebas. Por factores externos (que se controlaron en la evaluación de los patrones conductuales) y en aras de garantizar el bienestar individual de cada sujeto experimental en concreto, los tiempos de adaptación se ajustaron a los comportamientos detectados en cada animal. Con las restricciones indicadas, los intervalos de tiempo correspondientes a cada estímulo y a cada rata fueron recogidos puntualmente y quedaron como sigue:

TIEMPOS (en segundos) DE LA PRUEBA								
SUJETOS	Inicio	Comienza 1° estímulo (55 kHz)	Fin del 1° estímulo	Recuperación	Comienza 2° estímulo (8 kHz)	Fin del 2° estímulo	Recuperación	Final de la prueba
	t = 0 s	t = 20 s	t = 40 s		t = 80 s	t = 100 s		t = 120 s
Macho 1	t = 0 s	t = 20 s	t = 40 s	Recuperación	t = 80 s	t = 100 s	Recuperación	t = 120 s
Macho 2	t = 0 s	t = 15 s	t = 40 s		t = 80 s	t = 100s		t = 110 s
Macho 3	t = 0 s	t = 20 s	t = 49 s		t = 50 s	t = 82 s		t = 95 s
Hembra 1	t = 0 s	t = 15 s	t = 37 s		t = 50 s	t = 88 s		t = 104 s
Hembra 2	t = 0 s	t = 20 s	t = 40 s		t = 60 s	t = 97 s		t = 120 s
Hembra 3	t = 0 s	t = 15 s	t = 45 s		t = 75 s	t = 110 s		t = 125 s

Tabla 2. Tabla resumen de todas las fases e intervalos de tiempo de cada una de las ratas durante la experimentación.

5 RESULTADOS Y ANÁLISIS

Tanto en la prueba de control como en la de los estímulos auditivos se pudo llegar a una serie de conclusiones con respecto a la respuesta del animal ante los distintos estímulos. Estas respuestas no se valoran de manera específica pues, como ya se ha comentado antes, los resultados solo interesan para validar el método propuesto. En este último apartado se extrajeron todos los datos que nos proporciona el software Tracker™ en cada uno de los intervalos de tiempo que se han establecido en las pruebas. Por otro lado, se midió la temperatura ambiental expuesta a un foco de calor, la rata, y se extrajeron los gradientes de temperatura que resultaron interesantes para el estudio.

El diseño del prototipo no incluyó controles sobre el efecto de la presencia previa de otros animales de igual o diferente sexo. En estudios posteriores éste y otros agentes ambientales que puedan afectar a la respuesta conductual deberían ser tenidos en cuenta y evitarse en lo posible. El valor de N es deliberadamente pequeño porque se trata del diseño de un prototipo inicial.

5.1 Medida conductual

5.1.1 Resultados conductuales

Medidos a través del software Tracker™ y posteriormente analizados en un etograma correspondiente a cada sujeto y en función de cada intervalo de la prueba. Se calcularon los porcentajes de las conductas en función del número de conductas totales.

Para la creación del etograma se tuvieron en cuenta las siguientes conductas propias de las ratas:

1. Atusamiento rostral (*Auto-grooming/self-grooming*):

Número de veces que el animal frota su cabeza y cara con las patas delanteras.

2. Escarbar (*Digging*)

Número de veces que el animal escarba dentro de la jaula.

3. Deambulaci3n externa

Recorrido por los sectores (campo abierto circular) o cuadrados (campo abierto cuadrado) externos. Estos sectores son los que est3n en contacto con la pared del campo o en los extremos de este.

4. Deambulaci3n interna

Recorrido por los sectores (campo abierto circular) o cuadrados (campo abierto cuadrado) internos. Estos sectores son los que no est3n en contacto con la pared del campo o en los extremos de este.

5. Explorar (*Scan*)

Número de veces que el animal mueve o levanta la cabeza para explorar el ambiente.

6. Exploraci3n erguida (*Rearing*)

Número de veces que el animal se yergue sobre sus patas traseras, pudiendo apoyarse en la pared del campo o no.

7. Congelamiento (*Freezing*)

Número de veces que el animal se queda inm3vil.

8. No responder

Conducta de impasibilidad ante cualquier estímulo. Mayor duraci3n que en el congelamiento.

5.1.1.1 Macho 1

1. Tiempo de acondicionamiento:

Duración: 20 segundos

En el tiempo de acondicionamiento el macho 1 permaneció sin respuesta y de forma prácticamente estática exploró el ambiente con un leve movimiento de cabeza. Este comportamiento se cuantifica de manera clara con el software Tracker™ en el que se puede apreciar el poco recorrido que tuvo el animal.

La velocidad del sujeto vagamente subió de 3 cm/segundo y permaneció nula la mayor parte del tiempo. De igual forma y corroborando su leve recorrido, en la gráfica de la posición extraída del software se aprecia un valor prácticamente constante tanto en la coordenada 'y' como en la 'x', sin cambios de posición.

En total se cuantificaron 2 conductas claras: la exploración del ambiente con la cabeza y la respuesta nula ante estímulos, donde la ausencia de respuesta fue la conducta que más desarrolló.



Figura 36. Etograma macho 1 durante tiempo de acondicionamiento.

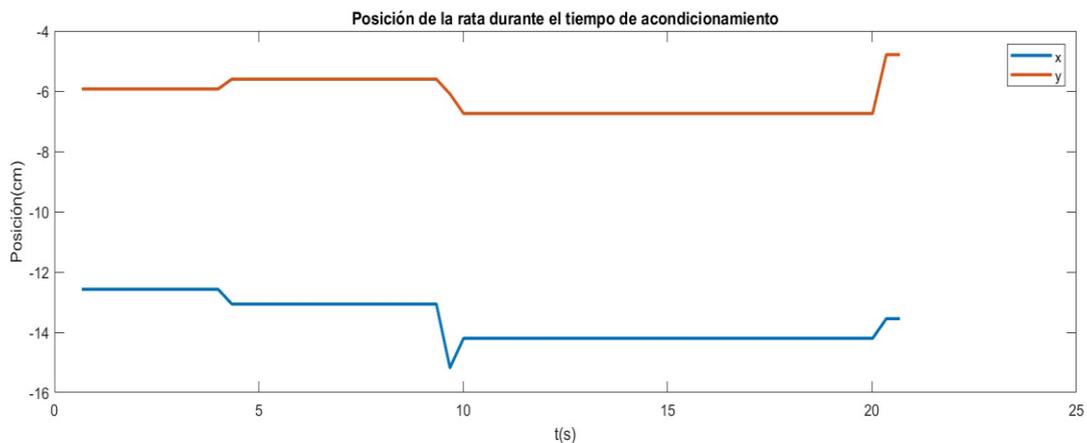
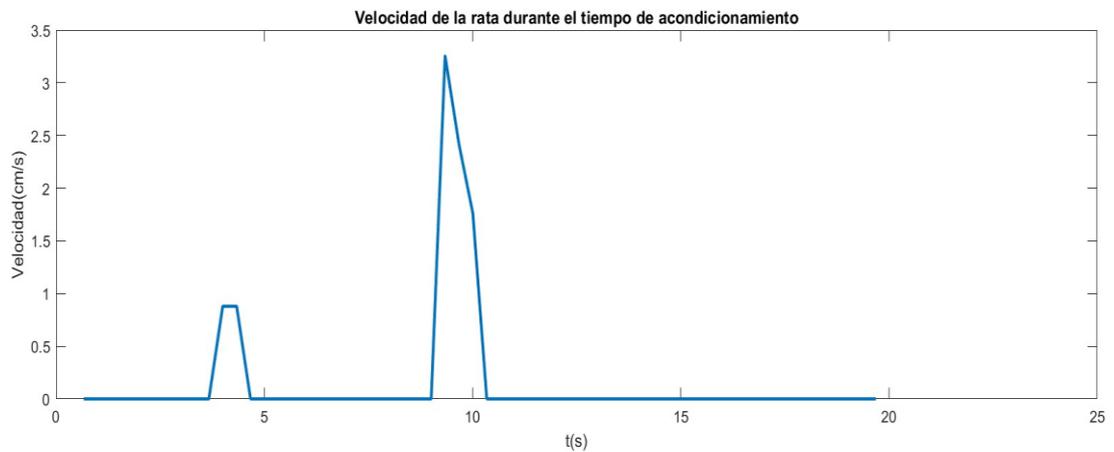


Figura 37. Gráfica de la posición del macho 1 durante el tiempo de acondicionamiento.



. Figura 38. Gráfica de la velocidad del macho 1 durante el tiempo de acondicionamiento.

2. Estímulo de 55 kHz

Duración: 20 segundos

El animal continuó con la línea conductual de la primera parte, aunque tuvo un leve aumento de respuesta, siendo la exploración con la cabeza su conducta más desarrollada.

Hubo un aumento de la velocidad llegando a los 5 cm/segundo y cambios de posición en las coordenadas más significativos que los anteriores.

Se cuantificaron 2 conductas, las mismas que en el intervalo anterior. Aunque en este caso el sujeto permaneció explorando el ambiente más tiempo que sin responder.



Figura 39. Etograma macho 1 durante el estímulo de 55 kHz.

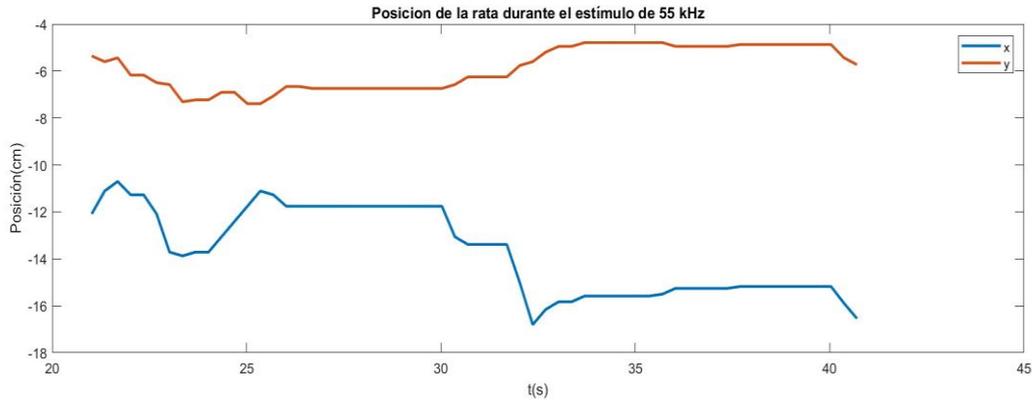


Figura 40. Gráfica de la posición del macho 1 durante el estímulo de 55 kHz.

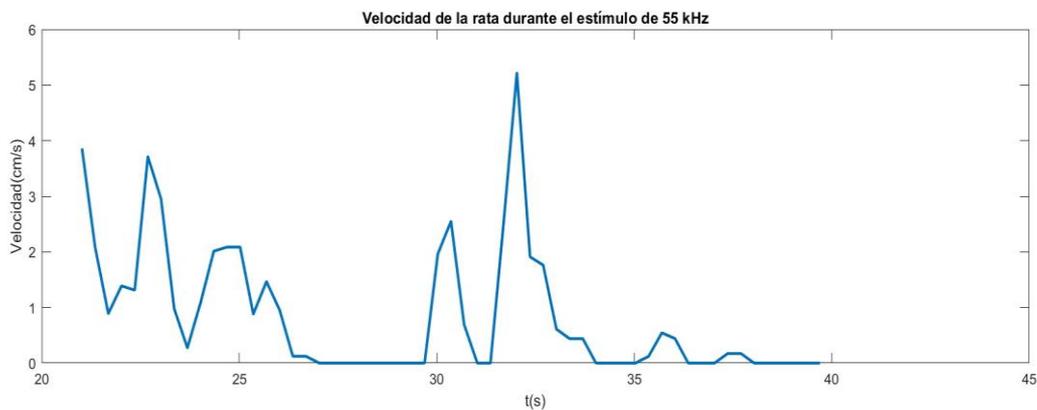


Figura 41. Gráfica de la velocidad del macho 1 durante el estímulo de 55 kHz.

3. Tiempo de relajación

Duración: 40 segundos

En esta fase el sujeto mantuvo las mismas conductas que en el intervalo anterior, pero incluyendo una nueva, la exploración erguida. Lo hizo apoyándose en la pared perteneciente a su zona de movimiento con la posterior continuación de sus conductas habituales.

En la imagen se puede apreciar esa franja de movimiento en la pared que coincide con la exploración erguida del animal.

La velocidad aumentó hasta 6-7 cm/segundo que refleja su incremento de movimiento y de igual forma ocurrió con las posiciones que sufrieron más cambios a lo largo del tiempo.



Figura 42. Etograma macho 1 durante el 1º tiempo de relajación.

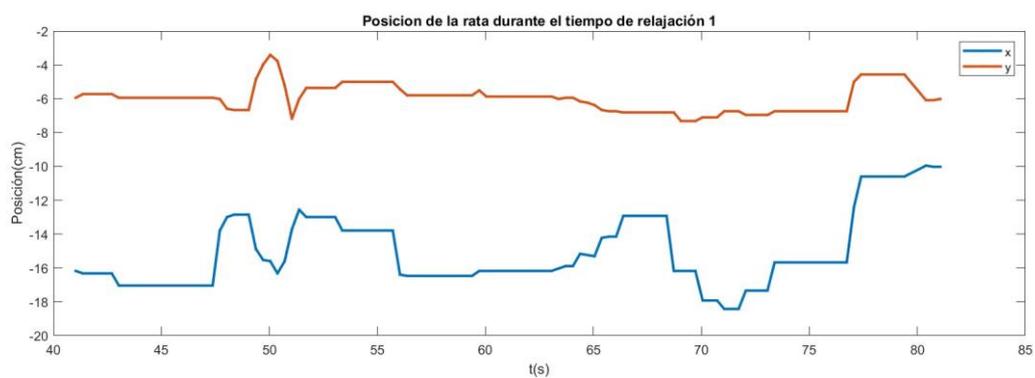


Figura 43. Gráfica de la posición del macho 1 durante el 1º tiempo de relajación.

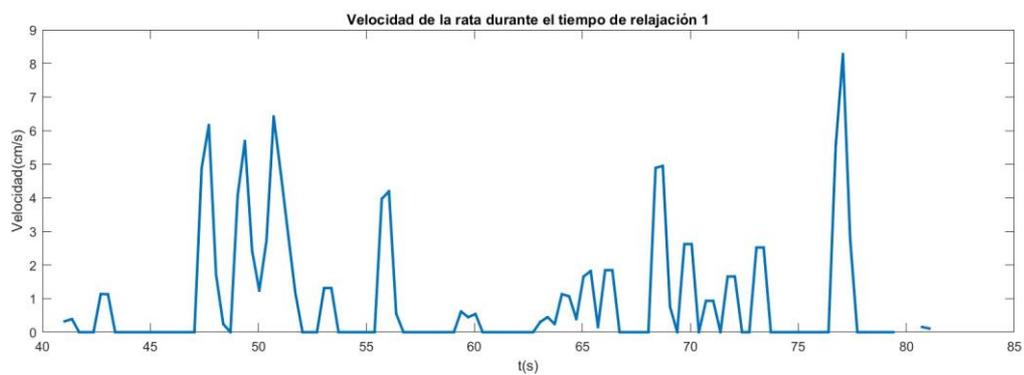


Figura 44. Gráfica de la velocidad del macho 1 durante el 1º tiempo de relajación.

4. Estímulo de 8 kHz

Duración: 20 segundos

Ante el estímulo de 8 kHz el sujeto comenzó sin ningún tipo de respuesta hasta que se dispuso a explorar con la cabeza y finalmente deambuló en dirección contraria durante todo el intervalo de prueba. Se pudo apreciar como contrajo su cuerpo ante la frecuencia proporcionada y se dirigió a la esquina superior izquierda.

Tal y como siguen sus pasos, lo hace su velocidad. En los primeros instantes permanece prácticamente nula hasta que comienza a responder ante el estímulo y aumenta hasta alcanzar los 7 cm/segundo.

Del mismo modo se aprecia en la gráfica de la posición que el sujeto permanece inmóvil hasta que se desplaza y se producen los picos en las coordenadas x e y.



Figura 45. Etograma macho 1 durante el estímulo de 8 kHz.



Figura 46. Gráfica de la posición del macho 1 durante el estímulo de 8 kHz.



Figura 47. Gráfica de la velocidad del macho 1 durante el estímulo de 8 kHz.

5. Tiempo de relajación

Duración: 20 segundos

Tras el período de frecuencia 8 kHz, se dejó una fase de relación tras el estímulo. En esta fase el sujeto siguió las pautas comportamentales anteriores.

En las gráficas se aprecia como al comienzo se mantiene explorando con la cabeza y produciéndose movimiento

en el software. Una vez terminada esa fase comienza la última de la prueba en la que el sujeto no responde y que se evalúa en las gráficas al no desarrollarse movimiento ni cambios de posición durante un largo intervalo de tiempo.



Figura 48. Etograma macho 1 durante el 2º tiempo de relajación.

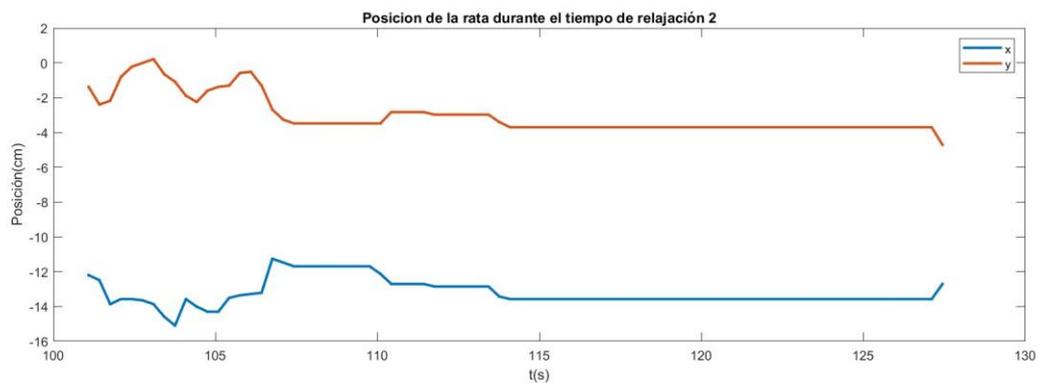


Figura 49. Gráfica de la posición del macho 1 durante el 2º tiempo de relajación

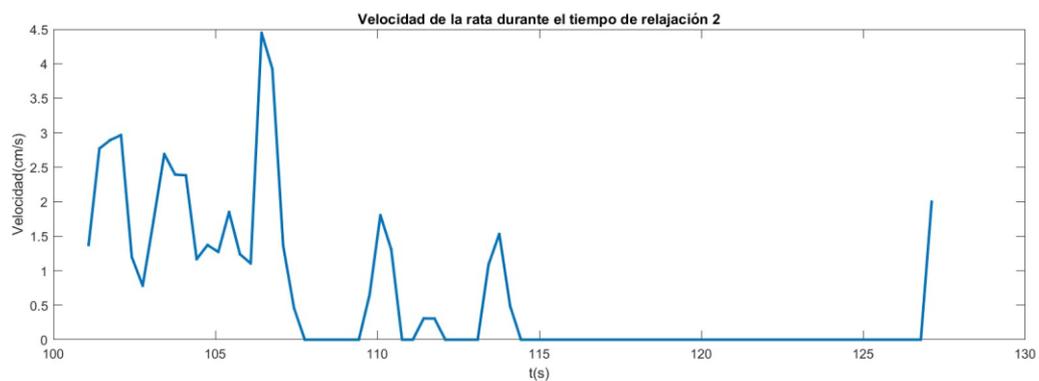


Figura 50. Gráfica de la velocidad del macho 1 durante el 2º tiempo de relajación.

6. Resumen contabilización de conductas del macho 1 durante la prueba de estímulos

	Tiempo de acondicionam. de		Estímulo de 55 kHz		Tiempo de recuperación de		Estímulo de 8 kHz		Tiempo de recuperación de	
	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%
Atusamiento										
Escarbar										
Deambulación externa							1	33.33		
Deambulación interna										
Explorar	1	33.33	2	66.67	2	50	1	33.33	2	50
Exploración erguida					1	25				
“Freezing”										
No responder	2	66.67	1	33.33	1	25	1	33.33	2	50
TOTAL Σ:	3	100	3	100	4	100	3	100	4	100
CONDUCTA MÁS REPETIDA	No responder		Explorar		Explorar		No responder		Explorar y No responder	
DISTANCIA RECORRIDA	3 cm		16 cm		32 cm		14 cm		26 cm	
VELOCIDAD MEDIA	0.16 cm/s		0.86 cm/s		0.98 cm/s		0.76 cm/s		0.61 cm/s	

Tabla 3. Resumen contabilización de conductas y otras variables del macho 1.

RECORRIDO TOTAL	VELOCIDAD MÁXIMA	VELOCIDAD MÍNIMA
91 cm	8.2 cm/s	0 cm/s

Tabla 4. Tabla del recorrido total, velocidad máxima y mínima del macho 1.

- Diferencia entre tiempo acondicionamiento y tiempo de estímulo 8 kHz

El sujeto permanece sin responder tanto al comienzo de la prueba como durante el período de estímulo 8 kHz. No hay cambio comportamental que se aprecie.

- Diferencias entre tiempo recuperación y tiempo de estímulo de 8 kHz

Durante el tiempo de recuperación la rata exploró con la cabeza y durante el estímulo de 8 kHz permaneció sin responder.

- Diferencias entre tiempo de acondicionamiento y 2º tiempo de recuperación (Principio vs Final)

En ambos períodos el animal tuvo una fase de no responder y solo en el 2º tiempo de recuperación inició una exploración con la cabeza durante un intervalo de tiempo.

- Recorrió más centímetros de superficie en la 1º fase de recuperación: 32 cm.
- Recorrió menos centímetros de superficie en la fase de acondicionamiento: 3 cm.

5.1.1.2 Macho 2

1. Tiempo de acondicionamiento:

Duración: 15 segundos

Este segundo sujeto fue introducido en la jaula segundos después de haber sacado al otro. Esto provocó un notable aumento en el número de conductas exploratorias. El animal se dedicó a deambular de manera externa mientras exploraba e incluso fue captado irguiéndose apoyado en la pared en dos ocasiones. Por otro lado, se pudo observar cómo escarbaba y cómo se atusó la cara una vez.

Todas estas conductas suman 8 conductas en total en esta primera fase de acondicionamiento.

La velocidad varió y fue bastante mayor que la del primer sujeto y se movió durante su recorrido exploratorio por gran cantidad de posiciones dentro del sistema de coordenadas.

Gracias al registro de las posiciones extraído del software Tracker™, se puede obtener una clara representación tanto de su recorrido como de las dos ocasiones en las que se irguió en la pared. Cada ocasión en esquinas opuestas (izquierda arriba y derecha abajo) donde las posiciones señalan al extremo de la jaula durante un periodo de tiempo reconocible.



Figura 51. Etograma macho 2 durante el tiempo de acondicionamiento.

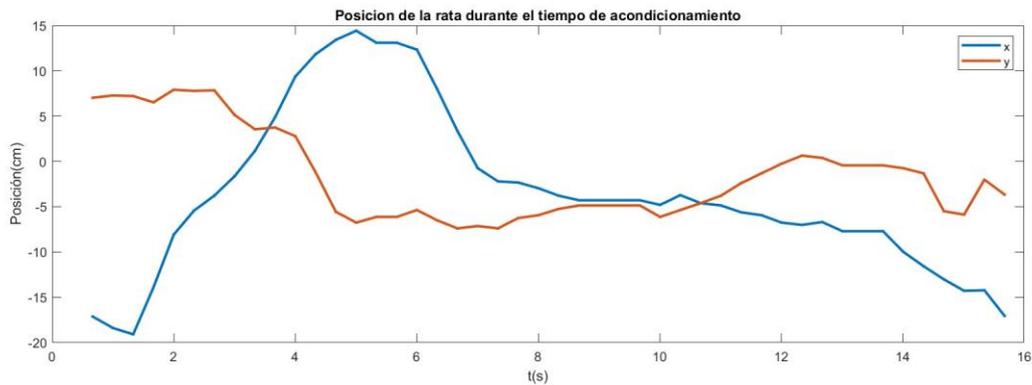


Figura 52. Gráfica de la posición del macho 2 durante el tiempo de acondicionamiento.

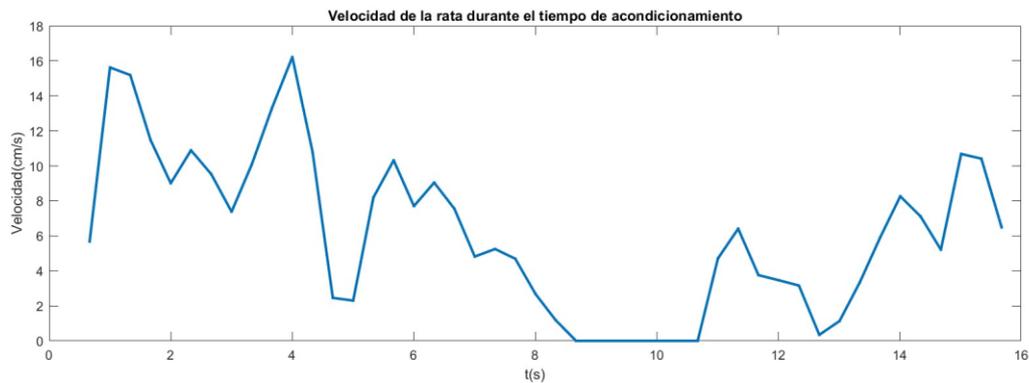


Figura 53. Gráfica de la velocidad del macho 2 durante el tiempo de acondicionamiento.

2. Estímulo de 55 kHz

Duración: 25 segundos

El comportamiento del sujeto durante esta segunda fase fue similar a la primera excepto que el número de conductas disminuyó a un total de 6 conductas. El animal pudo haberse relajado y experimentó y deambuló a lo largo del extremo de la jaula tanto como por el interior. No hubo atusamiento en esta ocasión, pero sí escarbó y se irguió una sola vez.

Aunque la media de la velocidad decrementó con respecto al primer intervalo de tiempo, en esta fase se produjo un máximo en la velocidad de 18 cm/segundo, más del doble que los máximos del sujeto número 1.

En la imagen posterior se puede apreciar la deambulación interna que se comentaba antes y que distinguía esta fase de la anterior.

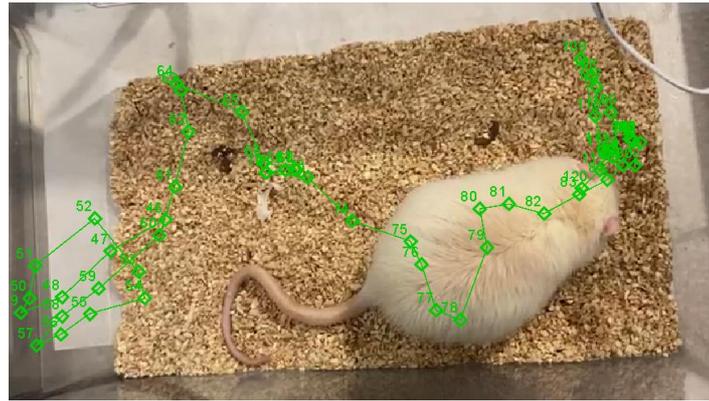


Figura 54. Etograma macho 2 durante el estímulo de 55 kHz.

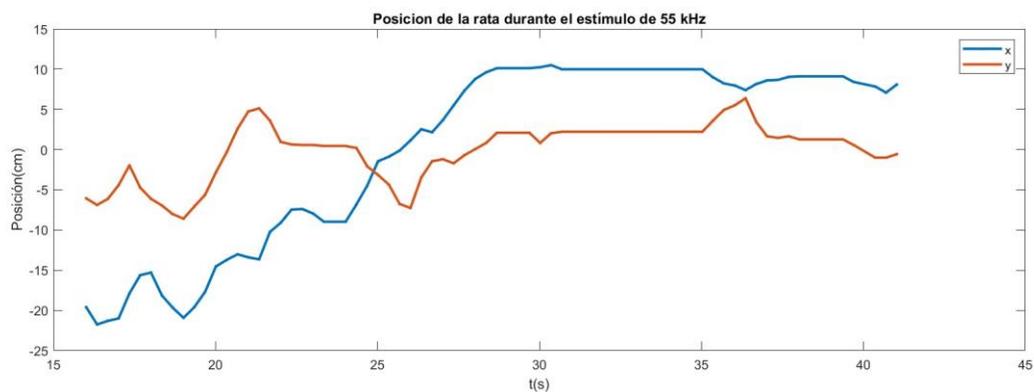


Figura 55. Gráfica de la posición del macho 2 durante el estímulo de 55 kHz.

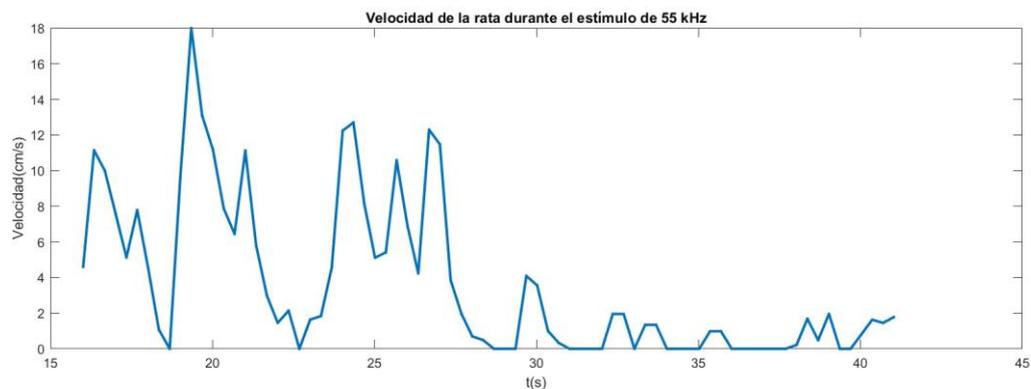


Figura 56. Gráfica de la velocidad del macho 2 durante el estímulo de 55 kHz.

3. Tiempo de relajación

Duración: 40 segundos

Durante el tiempo de recuperación o relajación, a pesar de ser una fase más larga que las anteriores se siguió produciendo un decremento del número de conductas. En esta ocasión, durante 40 segundos, el animal deambuló externa e internamente y exploró tanto con la cabeza como de forma erguida. No lo hizo en muchas ocasiones, sino que todas estas conductas las llevó a cabo de una forma más pausada que la anterior.

En total se distinguieron 5 conductas claras y la velocidad, siguiendo el hilo pausado comentado, fue más baja que la de la anterior fase.

En este intervalo se puede concluir un claro decremento del número de conductas exploratorias y mayormente de la velocidad que tuvo al realizarlas.



Figura 57. Etograma macho 2 durante el 1º tiempo de relajación.

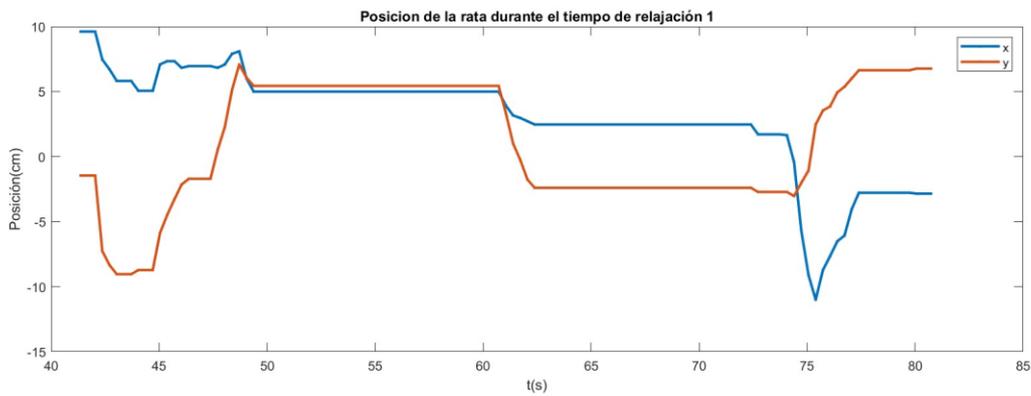


Figura 58. Gráfica de la posición del macho 2 durante el 1º tiempo de relajación.

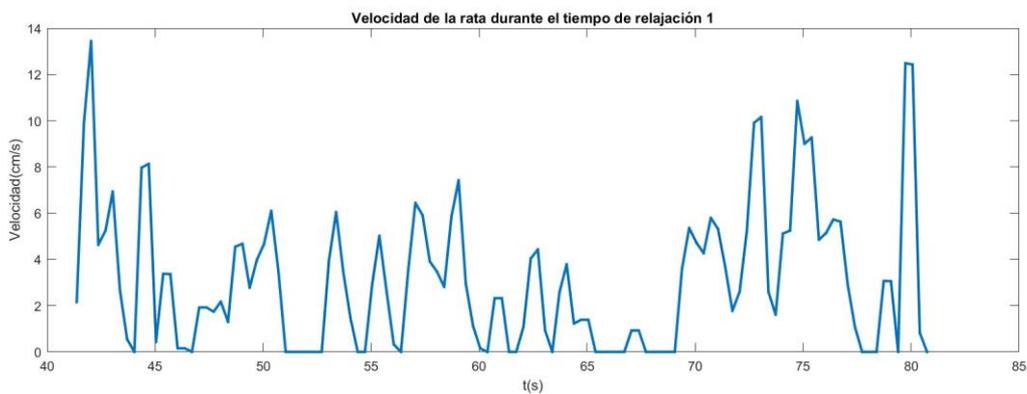


Figura 59. Gráfica de la velocidad del macho 2 durante el 1º tiempo de relajación

4. Estímulo de 8 kHz

Duración: 20 segundos

Se le proporciona el segundo estímulo, esta vez de 8 kHz y el animal continúa su comportamiento en la línea seguida hasta ahora. En este caso se mantiene explorando y deambulando durante todo el intervalo en la zona

interior de la jaula hasta el final que se irgue hacia la zona contraria de donde proviene el estímulo.

Como se aprecia en la representación de la velocidad, ésta se mantiene leve, solo incluye un pico al principio del movimiento que puede resultar una continuación de la fase anterior y varios instantes de congelamiento que sufre el animal a partir del segundo 90.

En conclusión, se ve específicamente una clara disminución del ritmo de actividad en el animal y la consecuente bajada de su velocidad.



Figura 60. Etograma macho 2 durante el estímulo de 8 kHz.

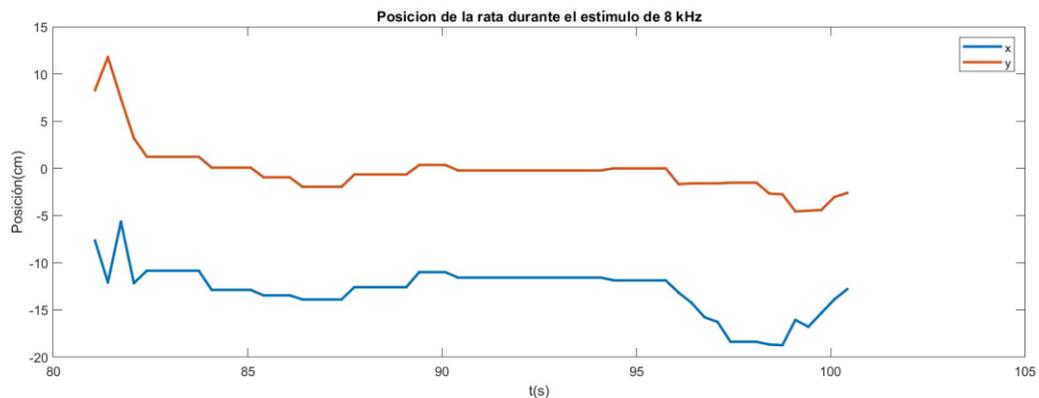


Figura 61. Gráfica de la posición del macho 2 durante el estímulo de 8 kHz.



Figura 62. Gráfica de la velocidad del macho 2 durante el estímulo de 8 kHz.

5. Tiempo de relajación

Duración: 10 segundos

Tras la incorporación del estímulo de 8 kHz, se detiene la frecuencia y se pasa a una fase de recuperación y/o relajación. En esta fase se produce la primera conducta diferencial hasta ahora, el animal se congela durante unos segundos. Esta respuesta se produce inmediatamente después de la eliminación del ruido posiblemente irritante para el animal. Además de los segundos de congelación, el sujeto solo realiza una exploración del ambiente con la cabeza y no presenta a penas movimiento de posición durante el intervalo.

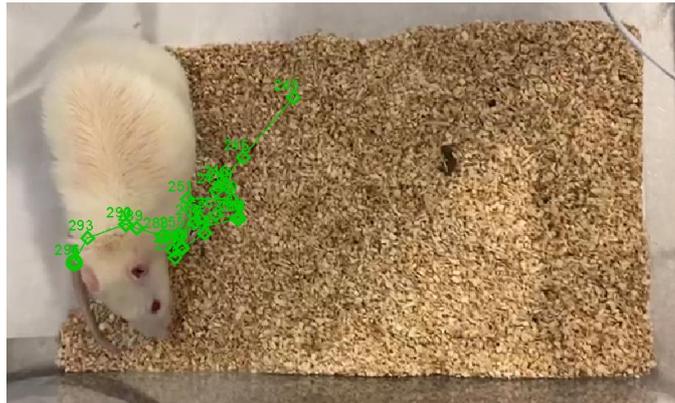


Figura 63. Etograma macho 2 durante el 2º tiempo de relajación.

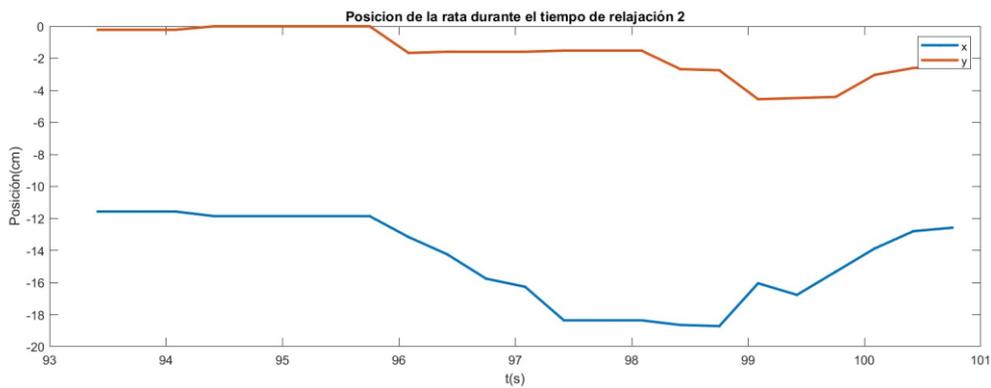


Figura 64. Gráfica de la posición del macho 2 durante el 1º tiempo de relajación

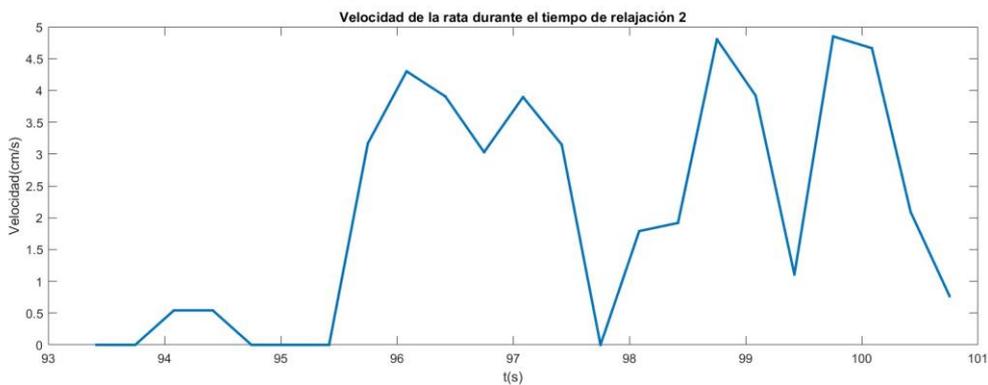


Figura 65. Gráfica de la velocidad del macho 2 durante el 1º tiempo de relajación

6. Resumen contabilización de conductas del macho 2 durante la prueba de estímulos

	Tiempo de acondicionam. de		Estímulo de 55 kHz		Tiempo de recuperación de		Estímulo de 8 kHz		Tiempo de recuperación de	
	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%
Atusamiento	1	12.5								
Escarbar	2	25	1	16.67						
Deambulaci3n externa	2	25	1	16.67	1	20				
Deambulaci3n interna			1	16.67	1	20	1	25		
Explorar	1	12.5	1	16.67	2	40	1	25	2	66.67
Exploraci3n erguida	2	25	2	33.3	1	20	1	25		
Freezing							1	25		
No responder										
TOTAL Σ:	8	100	6	100	5	100	4	100	2	100
CONDUCTA M3S REPETIDA	Escarbar, Deambulaci3n externa y Exploraci3n erguida		Exploraci3n erguida		Exploraci3n erguida		Explorar y "Freezing"		Explorar	
DISTANCIA RECORRIDA	57 cm		69 cm		33 cm		39 cm		5 cm	
VELOCIDAD MEDIA	6 cm/s		3.82 cm/s		3.12 cm/s		2.05 cm/s		2.51 cm/s	

Tabla 5. Resumen contabilizaci3n de conductas y otras variables del macho 2

RECORRIDO TOTAL	VELOCIDAD M3XIMA	VELOCIDAD M3NIMA
202 cm	18 cm/s	0 cm/s

Tabla 6. Recorrido total y velocidades m3ximas y m3nimas del macho 2.

- Diferencias entre tiempo acondicionamiento y tiempo de estímulo 8 kHz

Durante el tiempo de acondicionamiento el sujeto llevó un alto nivel de actividad durante todo el intervalo, llegando a los 6 cm/s y realizando hasta 8 conductas diferentes. En cambio, durante la fase del estímulo de 8 kHz, solo llevó a cabo 4 conductas distintas, siendo una de ellas la congelación. La velocidad en esta última fase fue prácticamente la mitad que en la primera.

- Diferencias entre tiempo recuperación y tiempo de estímulo de 8 kHz

La única diferencia entre estas dos fases fue que mientras que en el tiempo de recuperación el animal deambuló externamente por la jaula, en el tiempo de estímulo se dedicó a explorar y sufrir 'Freezing' en una ocasión.

- Diferencias entre tiempo de acondicionamiento y 2º tiempo de recuperación (Principio vs Final)

Igual que en el primer apartado de diferencias: La velocidad en esta última fase fue prácticamente la mitad que en la primera. El número de actividad disminuyó considerablemente, siendo 8 conductas las realizadas en el tiempo de acondicionamiento y 2 en el 2º de recuperación.

- Recorrió más centímetros de superficie en la fase de estimulación de frecuencia 55 kHz: 69 cm.
- Recorrió menos centímetros de superficie en la 2º fase de recuperación: 5 cm.

5.1.1.3 Macho 3

1. Tiempo de acondicionamiento:

Duración: 20 segundos

Se comenzó la prueba del sujeto número 3 con 20 segundos de tiempo de acondicionamiento. Durante este intervalo el animal deambuló a lo largo del interior de la jaula demostrando una clara intención de exploración.

El número total de conductas es de 5. Tres de ellas identificables con la exploración y las demás con la deambulación sobre el campo de estudio.

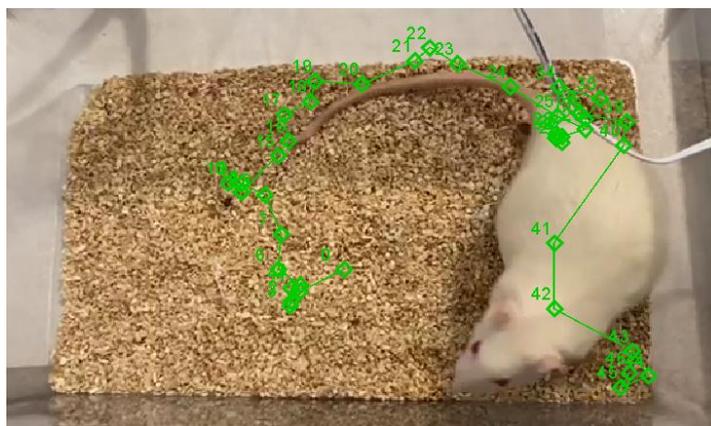


Figura 66. Etograma macho 3 tiempo de acondicionamiento

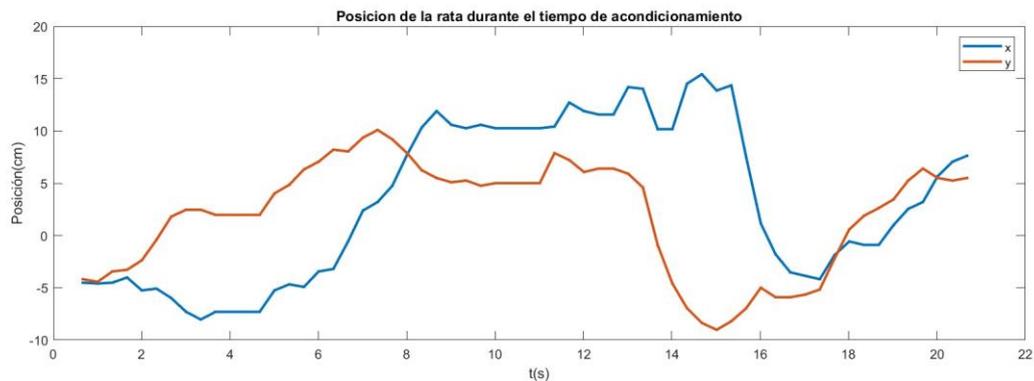


Figura 67. Gráfica de la posición del macho 3 durante el tiempo de acondicionamiento.

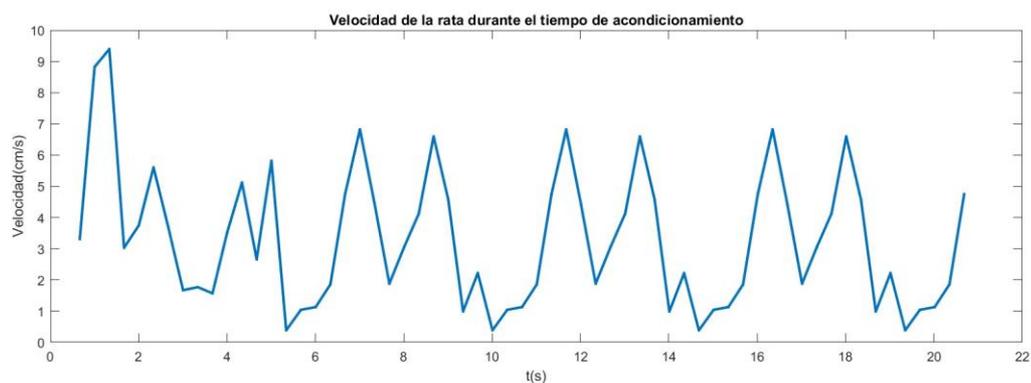


Figura 76. Gráfica de la velocidad del macho 3 durante el tiempo de acondicionamiento

2. Estímulo de 55 kHz

Duración: 22 segundos

Este sujeto se encontraba claramente más nervioso que los anteriores y mantuvo una conducta exploratoria durante todo el intervalo. El sujeto intentó escapar en varias ocasiones casi consiguiéndolo en una de ellas. Este hecho afectó al experimento pues el tiempo de prueba tuvo que ser disminuido por el recurrente intento del animal por escapar. Se contabilizaron en total 4 conductas claras.

En el gráfico extraído del software se aprecia esa deambulación constante tanto interior como exteriormente y la exploración erguida que tuvo durante bastantes unidades de segundos. La velocidad, a pesar de no ser excesivamente alta fue variando durante el intervalo, reflejo de los movimientos que tuvo la rata.



Figura 69. Etograma macho 3 estímulo de 55 kHz

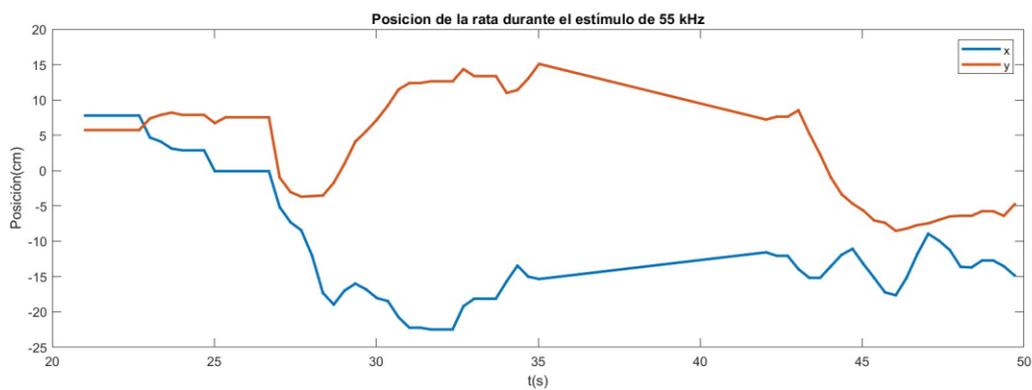


Figura 70. Gráfica de la posición del macho 3 durante el estímulo de 55 kHz

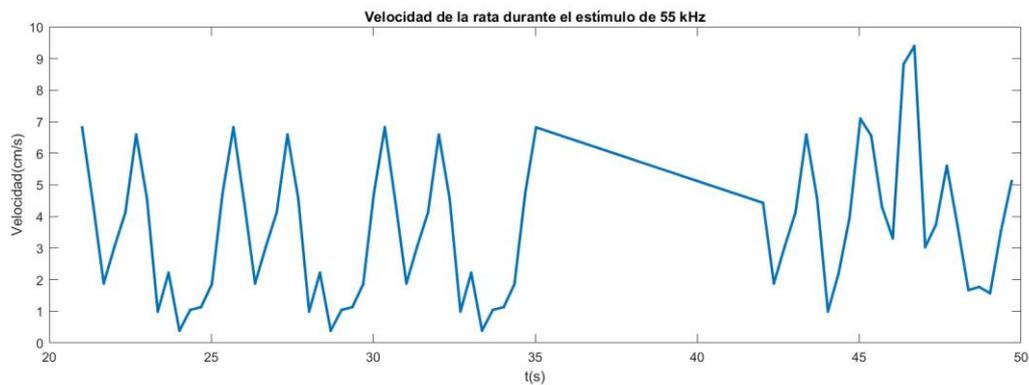


Figura 71. Gráfica de la velocidad del macho 3 durante el estímulo de 55 kHz

Debido a los numerosos intentos del animal por escaparse, se decidió prescindir del tiempo de recuperación y pasar directamente al segundo estímulo de interés.

3. Estímulo de 8 kHz

Duración: 32 segundos.

Durante el transcurso de este intervalo hubo en la rata una disminución considerable de movimiento con respecto al inicio de la prueba.

Deambuló a lo largo del interior del campo con una media en velocidad menor a las anteriores y sufrió el fenómeno de “Freezing” en dos ocasiones.

Este fenómeno se aprecia en la gráfica de la velocidad durante los intervalos de tiempo: 70 seg-72 seg y 73 seg-75 seg. En estos intervalos la velocidad se sitúa nula mientras que en la gráfica de la posición coincide con una detención de la variación de las coordenadas x e y, en la que ambas permanecen en un valor constante.

El número de conductas total es de 4 siendo en dos ocasiones el fenómeno de “Freezing” y en el resto la exploración.



Figura 75. Etograma macho 3 estímulo de 8 kHz

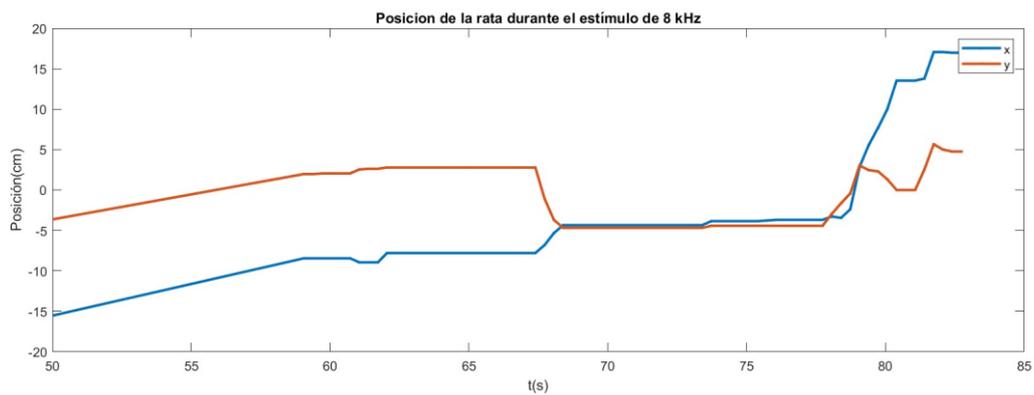


Figura 76. Gráfica de la posición del macho 3 durante el estímulo de 8 kHz

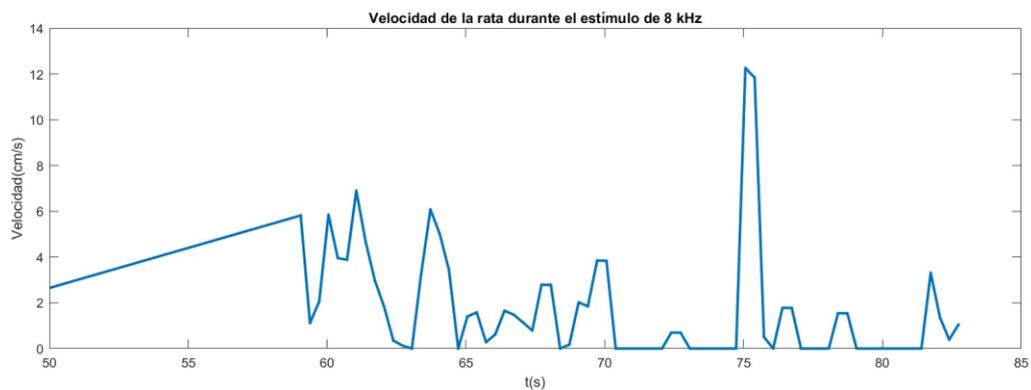


Figura 77. Gráfica de la velocidad del macho 3 durante el estímulo de 8 kHz

4. Tiempo de relajación

Duración: 13 segundos

Durante la fase final de la prueba el animal exploró de forma erguida como lo había hecho en el resto de las fases y volvió a sufrir “Freezing”, esta vez puede que acrecentado por estímulos externos ajenos al protocolo.

En total se detectaron 2 conductas claras, la exploración erguida y la congelación.

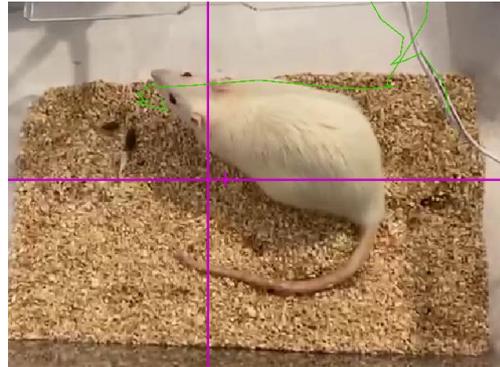


Figura 78. Etograma macho 3 tiempo de relajación

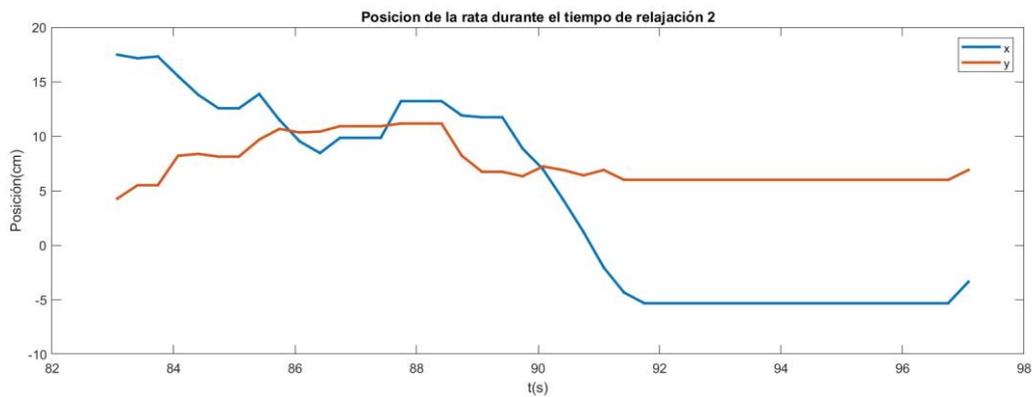


Figura 79. Gráfica de la posición del macho 3 durante tiempo de relajación

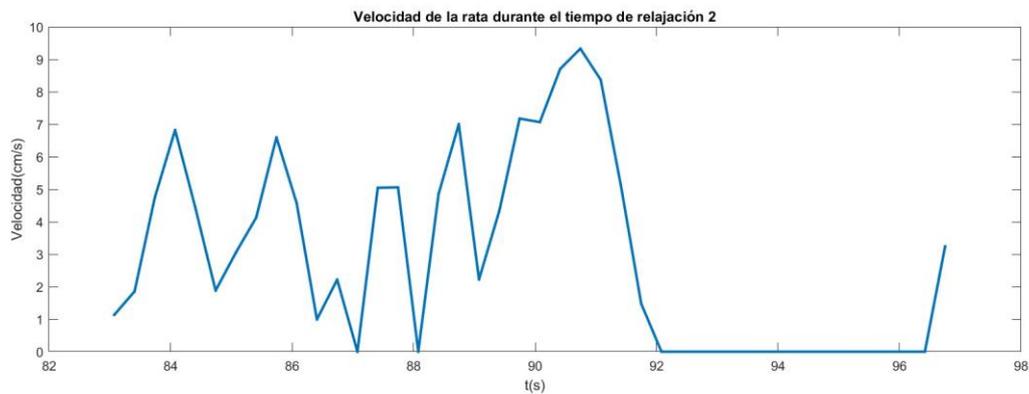


Figura 80. Gráfica de la velocidad del macho 3 durante tiempo de relajación.

5. Resumen contabilización de conductas del macho 3 durante la prueba de estímulos

	Tiempo de acondicionamiento		Estímulo de 55 kHz		Estímulo de 8 kHz		Tiempo de recuperación	
	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%
Atusamiento								
Escarbar								
Deambulaci3n externa								
Deambulaci3n interna	2	40	1	25				
Explorar	2	40	1	25	2	50		
Exploraci3n erguida	1	20	2 (se escapa)	50			1	50
“Freezing”					2	50	1 (estímulo externo)	50
No responder								
TOTAL Σ:	5	100	4	100	4	100	2	100
CONDUCTA M3S REPETIDA	Deambulaci3n externa y Explorar		Exploraci3n erguida		Explorar y “Freezing”		Exploraci3n erguida y “Freezing”	
DISTANCIA RECORRIDA	68.3 cm		58.6 cm		49.56 cm		30.54 cm	
VELOCIDAD MEDIA	3.36 cm/s		3.25 cm/s		2.63 cm/s		2.33 cm/s	

Tabla 7. Resumen contabilizaci3n de conductas y otras variables del macho 3

RECORRIDO TOTAL	VELOCIDAD M3XIMA	VELOCIDAD M3NIMA
207 cm	12.3 cm/s	0 cm/s

Tabla 8. Recorrido total y velocidad m3xima y m3nima del macho 3.

- Diferencias entre tiempo acondicionamiento y tiempo de estímulo 8 kHz

Aunque durante el estímulo de 8 kHz el macho número 3 siguió con su tendencia exploratoria llevada durante toda la prueba, hubo una novedad en la fase: el fenómeno de 'Freezing'.

- Diferencias entre tiempo recuperación y tiempo de estímulo de 8 kHz

Las diferencias entre estas dos fases no difieren prácticamente de las diferencias entre las dos fases anteriores.

- Diferencias entre tiempo de acondicionamiento y 2º tiempo de recuperación (Principio vs Final).

Igual que en la fase de acondicionamiento, en la del 2º tiempo de recuperación, el sujeto exploró de forma erguida en varias ocasiones y congelándose en una ocasión probablemente provocada por factores externos. La actividad en esta segunda fase fue menor.

- Recorrió más centímetros de superficie en la fase de estimulación de frecuencia 8 kHz: 98.94 cm.
- Recorrió menos centímetros de superficie en la 2º fase de recuperación: 42.52 cm.

5.1.1.4 Hembra 1

1. Tiempo de acondicionamiento:

Duración: 15 segundos

Durante el tiempo de acondicionamiento de la hembra número 1 se cuantificaron un número alto de conductas. Se atusó el rostro una vez y escarbó el suelo en varias ocasiones, en concreto, en tres.

En los intervalos de tiempo en los que se aprecia bajada de velocidad y variación nula de la posición, el animal estuvo escarbando o atusándose el rostro, mientras que en el resto del tiempo deambuló, exploró (de forma erguida o sin moverse) y mantuvo actividad a lo largo de la jaula.

Este sujeto fue el primero de las hembras y se pudo comprobar un aumento de su actividad y exploración posiblemente causado por el rastro dejado por los machos anteriormente expuestos.

Su velocidad más alta fue de 12 cm/s y la más baja de 0 cm/s.

En total se cuantificaron cinco conductas claras distintas, siendo la conducta más repetida la de escarbo.

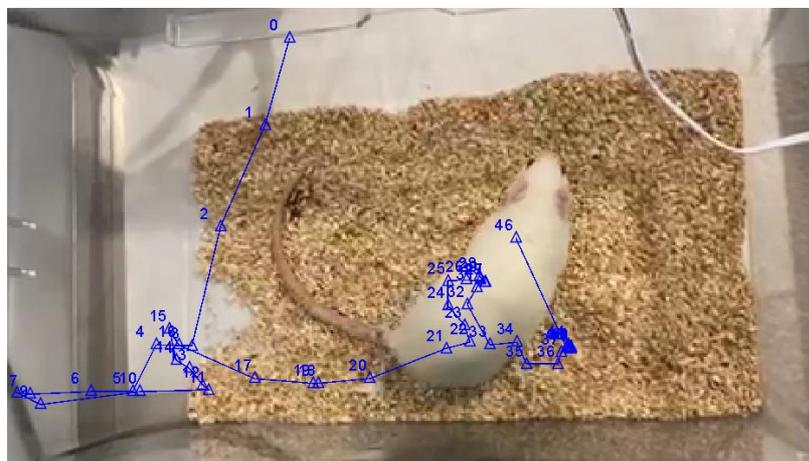


Figura 81. Etograma hembra 1 durante el tiempo de acondicionamiento.

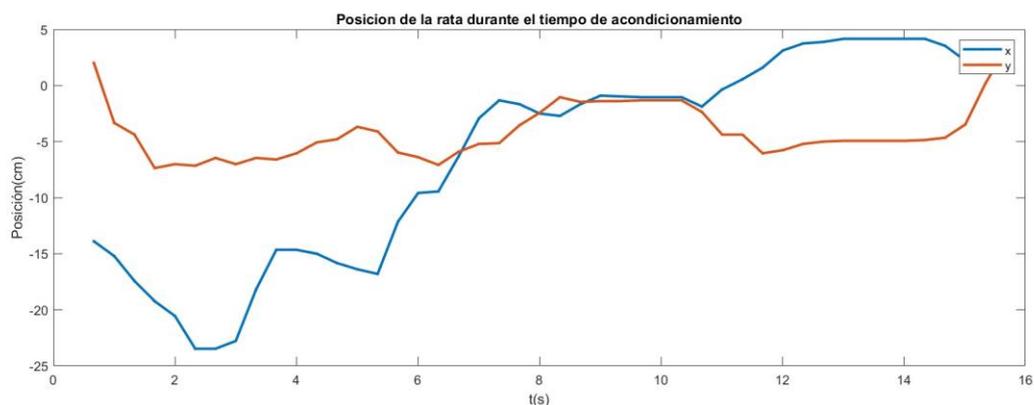


Figura 82. Gráfica de la posición de la hembra 1 durante el tiempo de acondicionamiento.

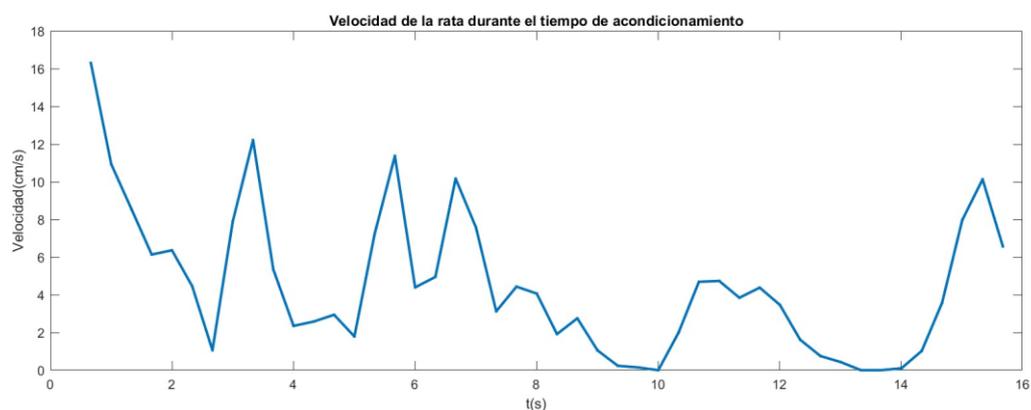


Figura 83. Gráfica de la velocidad de la hembra 1 durante el tiempo de acondicionamiento.

2. Estímulo de 55 kHz

Duración: 22 segundos

Durante la primera fase de estímulo el animal siguió con su tendencia a explorar y deambular por la superficie de la jaula. También escarbó en varias ocasiones, pero de forma más momentánea, y se irguió en sus dos patas traseras dos veces.

Llegó a 18 cm/s, valor sumamente más alto que el de la mayoría de los machos y la velocidad mínima fue de 0 cm/s en el momento de escarbar la superficie.

En este período se sumaron en total 4 conductas diferentes: exploración, deambulación interna y externa y escarbo. La conducta más repetida fue la de la exploración erguida.

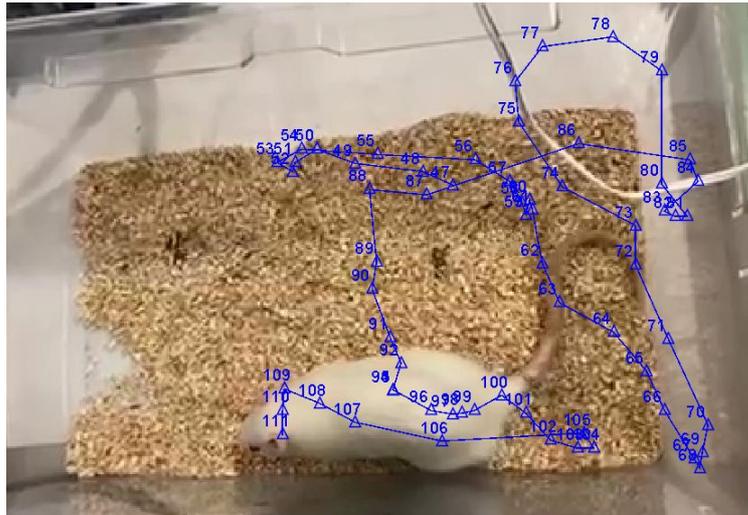


Figura 84. Etograma hembra 1 durante el estímulo de 55 kHz.

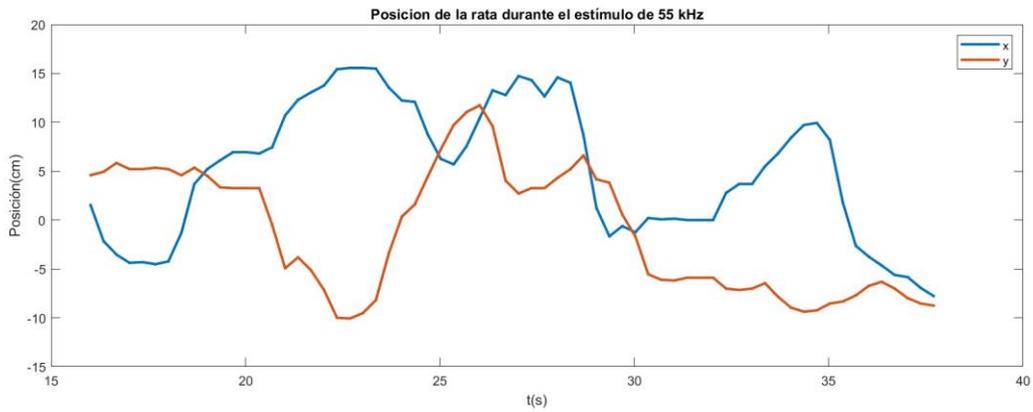


Figura 85. Gráfica de la posición de la hembra 1 durante el estímulo de 55 kHz

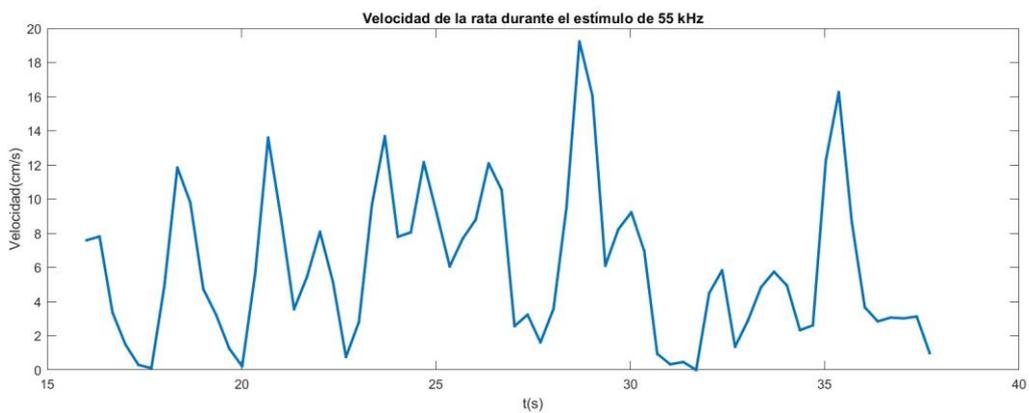


Figura 86. Gráfica de la velocidad de la hembra 1 durante el estímulo de 55 kHz

3. Tiempo de relajación

Duración: 13 segundos

Este período duró 13 segundos el animal volvió a atusarse el rostro. Se mantuvo deambulando externamente apoyándose en las paredes de la jaula.

Llegó a 16 cm/s y su velocidad mínima fue de 1 cm/s en dos ocasiones, coincidiendo con el instante de atusamiento rostral y la exploración erguida, en los que permaneció prácticamente inmóvil.

En total se cuantificaron tres conductas diferentes, siendo la deambulación externa la más repetida y continuada en el tiempo.

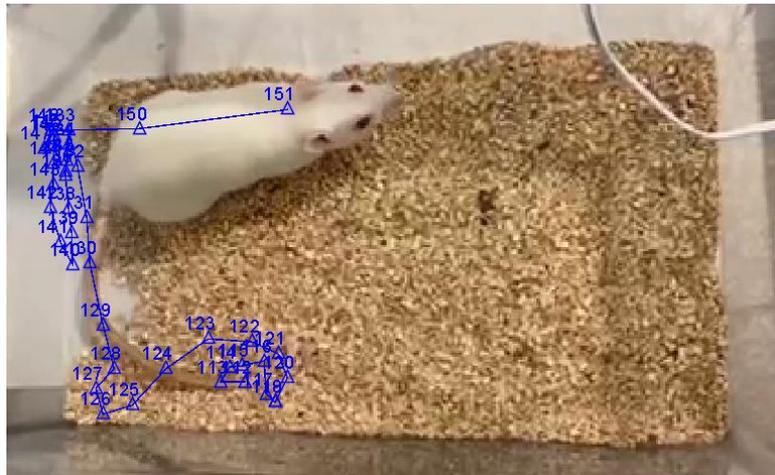


Figura 87. Etopograma hembra 1 durante el 1º tiempo de relajación.

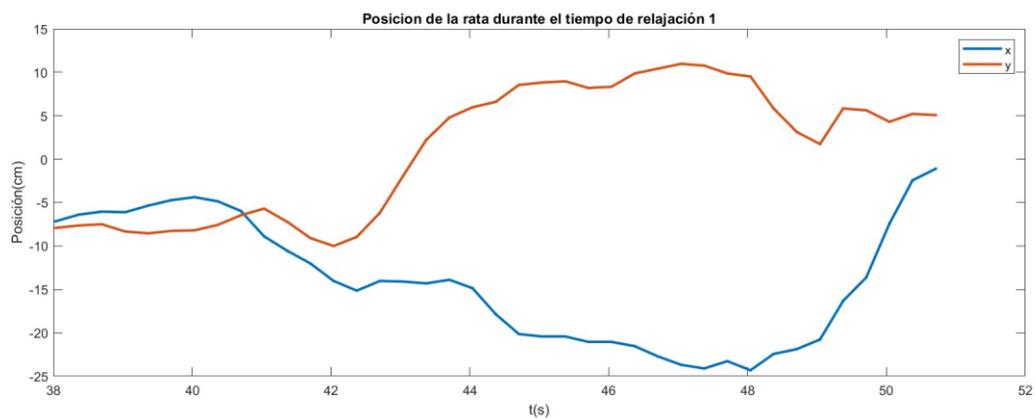


Figura 88. Gráfica de la posición de la hembra 1 durante el 1º tiempo de relajación.

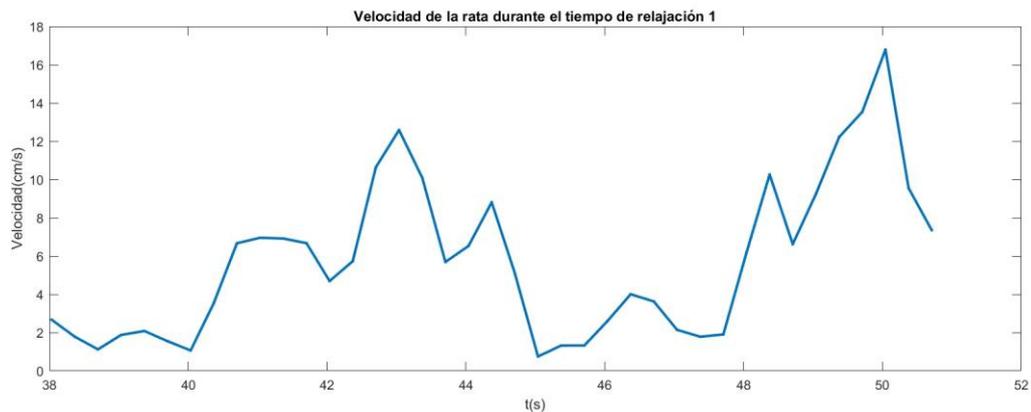


Figura 89. Gráfica de la velocidad de la hembra 1 durante el 1º tiempo de relajación

4. Estímulo de 8 kHz

Duración 38 segundos

Durante el período de estimulación de frecuencia 8 kHz, el sujeto aumentó su actividad considerablemente.

Deambuló internamente durante un primer período de tiempo y a continuación, se dirigió hacia el lado contrario de donde se encontraba el altavoz con el estímulo sonoro. Permaneció explorando esa zona y deambulando por ella hasta el final de la fase de estimulación. En este período final también se atusó el rostro en una ocasión.

Llegó hasta casi 19 cm/s y casi 0 cm/s en las ocasiones en las que se paraba y exploraba con la cabeza.

En total se sumaron cuatro estímulos diferentes, siendo la deambulación externa y la exploración las más repetidas.

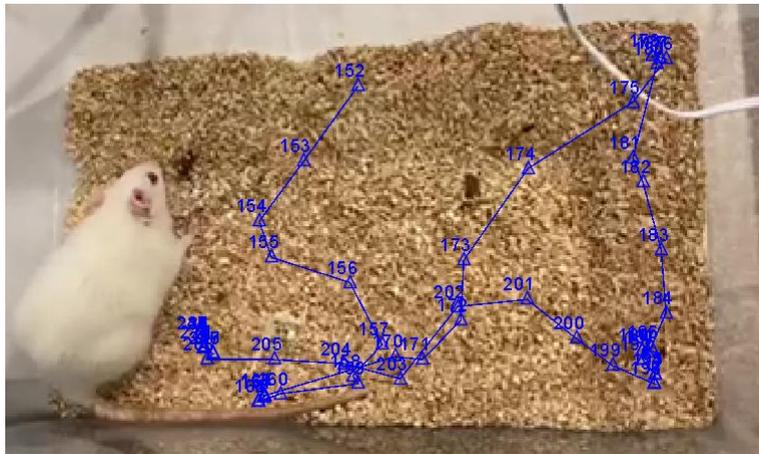


Figura 90. Etograma hembra 1 durante el estímulo de 8 kHz

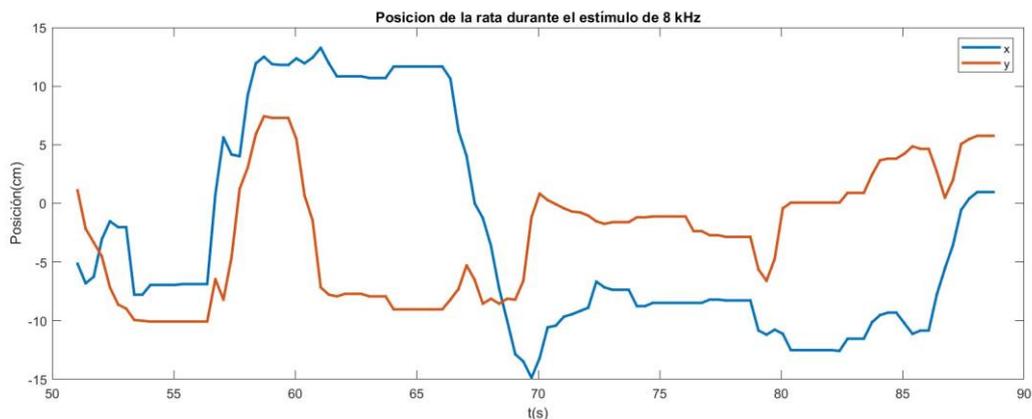


Figura 91. Gráfica de la posición de la hembra 1 durante el estímulo de 8 kHz

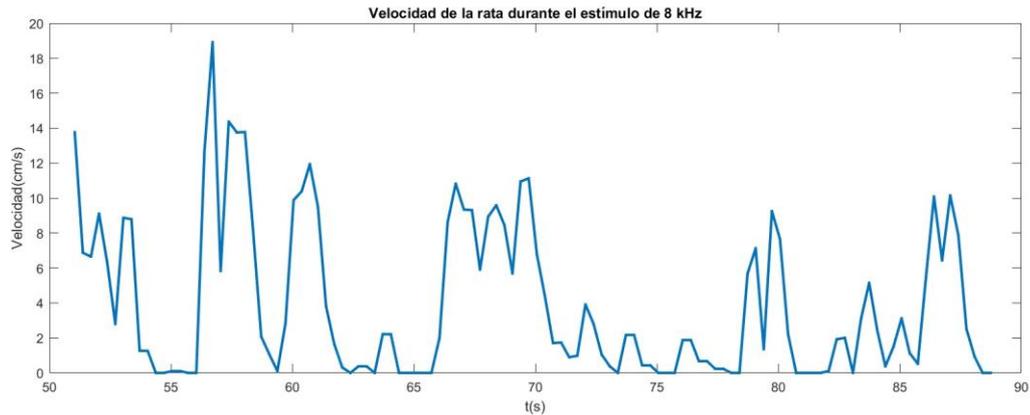


Figura 92. Gráfica de la velocidad de la hembra 1 durante el estímulo de 8 kHz

5. Tiempo de relajación

Duración: 16 segundos

Tras el período de estimulación se dejó, como al resto de sujetos, un tiempo de relajación antes de extraer al animal de la jaula.

Durante ese intervalo la rata siguió deambulando externamente. Un poco antes del segundo 95 sufrió un congelamiento durante pocos segundos que pudo ser causado por algún factor externo.

En total se cuantificaron dos conductas diferentes siendo la deambulación externa la más repetida.

Su velocidad máxima fue de casi 18 cm/s en dos ocasiones y su mínima de 0 cm/s cuando el animal sufrió el fenómeno de 'Freezing'.

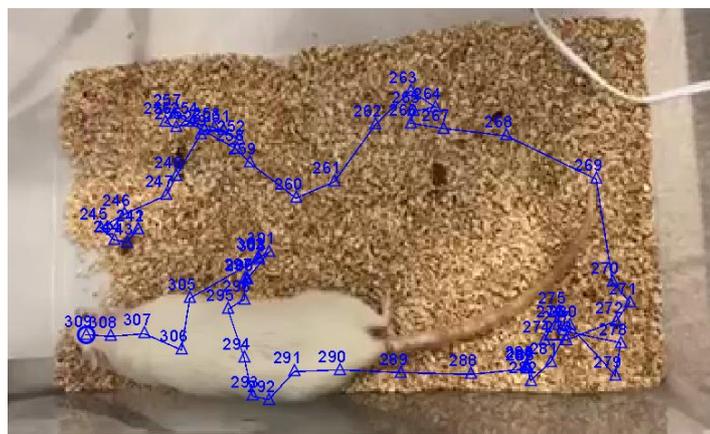


Figura 93. Etograma hembra 1 durante el 2º tiempo de relajación.

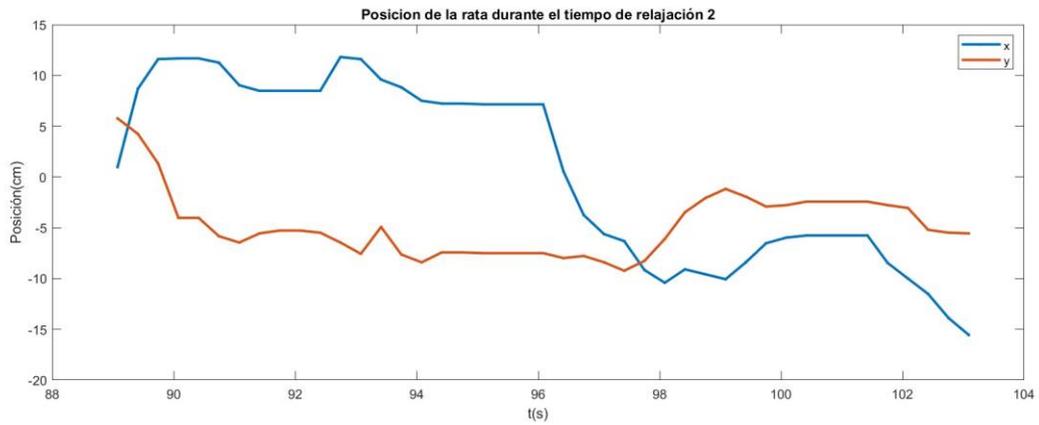


Figura 94. Gráfica de la posición de la hembra 1 durante el 1º tiempo de relajación

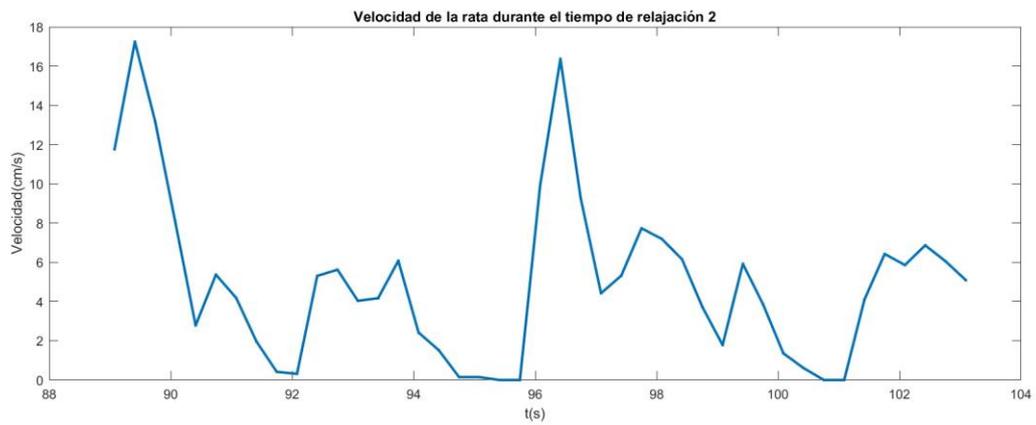


Figura 95. Gráfica de la velocidad de la hembra 1 durante el 1º tiempo de relajación

6. Resumen contabilización de conductas de la hembra 1 durante la prueba de estímulos

	Tiempo de acondicionam.		Estímulo de 55 kHz		Tiempo de recuperación		Estímulo de 8 kHz		Tiempo de recuperación	
	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%
Atusamiento	1	10			1	33.33	1	14.2		
Escarbar	3	30	2	33.33						
Deambulaci3n externa			1	16.67	1	33.33	2	28.5	2	75
Deambulaci3n interna	2	20	1	16.67			1	14.2		
Explorar	2	20					1	14.2		
Exploraci3n erguida	2	20	2	33.33	1	33.33	2	28.5		
“Freezing”									1	25
No responder										
TOTAL Σ:	10	100	6	100	3	100	7	100	3	100
CONDUCTA M3S REPETIDA	Escarbar		Escarbar y Exploraci3n erguida		Atusamiento y Exploraci3n erguida		Deambulaci3n externa y Exploraci3n erguida		Deambulaci3n externa y “Freezing”	
DISTANCIA RECORRIDA	46.3 cm		85.24 cm		49.9 cm		98.94 cm		42.52 cm	
VELOCIDAD MEDIA	4.58 cm/s		6.15 cm/s		5.41 cm/s		4.06 cm/s		4.73 cm/s	

Tabla 9. Resumen contabilizaci3n de conductas y otras variables de la hembra 1

RECORRIDO TOTAL	VELOCIDAD M3XIMA	VELOCIDAD M3NIMA
323 cm	19.24 cm/s	0 cm/s

Tabla 10. Recorrido total y velocidad m3xima y m3nima de la hembra 1.

- Diferencias entre tiempo acondicionamiento y tiempo de estímulo 8 kHz

Durante el tiempo de acondicionamiento el animal se dedicó a escarbar mientras que en el período de estímulo de 8 kHz deambuló interna y externamente y exploró de forma erguida en dos ocasiones.

- Diferencias entre tiempo recuperación y tiempo de estímulo de 8 kHz

En el tiempo de recuperación el número de conductas fue casi la mitad que en el tiempo de estimulación.

- Diferencias entre tiempo de acondicionamiento y 2º tiempo de recuperación (Principio vs Final)

En el tiempo de acondicionamiento el sujeto mantuvo varias conductas diferentes como la exploración, la exploración erguida, el atusamiento rostral, etc., mientras que en el 2º tiempo de recuperación se dedicó sobre todo a deambular externamente a lo largo de la jaula y en una ocasión al principio del intervalo se mantuvo congelado durante dos segundos.

- Recorrió más centímetros de superficie en la fase de estimulación de frecuencia 8 kHz: 98.94 cm.
- Recorrió menos centímetros de superficie en la 2º fase de recuperación: 42.52 cm.

5.1.1.5 Hembra 2

1. Tiempo de acondicionamiento:

Duración: 20 segundos

Desde el primer instante de prueba, esta segunda hembra comenzó a deambular externa e internamente la jaula y a explorarla tanto con la cabeza como de forma erguida. En una ocasión se atusó el rostro poco después del segundo 6, instante en el que se aprecia velocidad nula en las gráficas y sin cambio de posición en las coordenadas.

Este sujeto pudo oler y detectar el rastro tanto de machos como de una hembra y eso pudo influenciar su conducta exploratoria.

En total se cuantificaron 5 conductas diferentes, siendo la deambulación externa y los dos tipos de exploración las más repetidas.

Su velocidad máxima fue de poco más de 16 cm/s y su mínima de 0 cm/s en el momento de atusamiento. La velocidad permaneció bajando y subiendo bruscamente durante toda la prueba.



Figura 96. Etograma hembra 2 durante el tiempo de acondicionamiento.



Figura 97. Gráfica de la posición de la hembra 2 durante el tiempo de acondicionamiento.

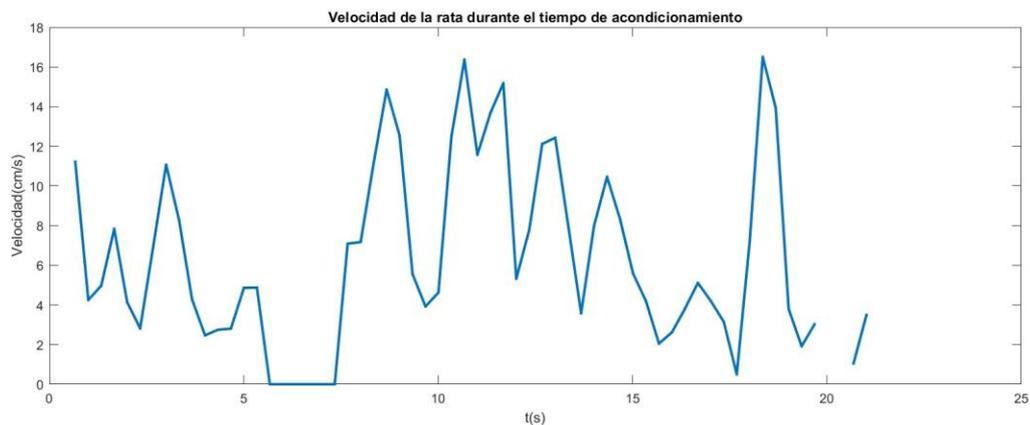


Figura 98. Gráfica de la velocidad de la hembra 2 durante el tiempo de acondicionamiento

2. Estímulo de 55 kHz

Duración: 20 segundos

En el período de estimulación de 55 kHz, la hembra número dos deambuló externamente, por la zona donde se encontraba el altavoz y exploró de forma quieta y erguida en varias ocasiones. También escarbó en una ocasión casi al final de la fase.

En total fueron cuatro conductas claramente reconocibles siendo la más repetida la exploración erguida en las paredes de la zona del altavoz.

Su velocidad máxima fue de 20 cm/s, la más alta hasta ahora registrada y la mínima de 0 tanto al principio como al final del período.

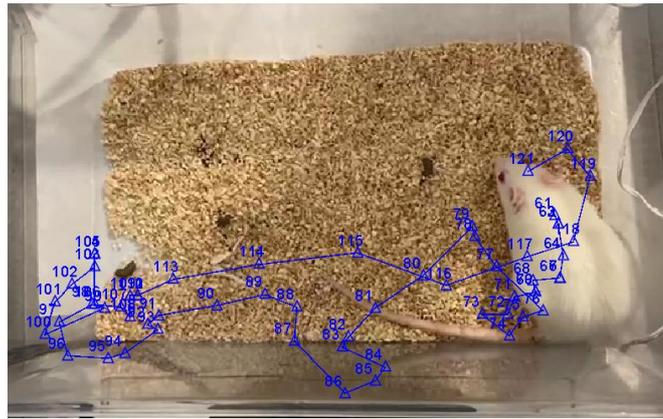


Figura 99. Etograma hembra 2 durante el estímulo de 55 kHz.



Figura 100. Gráfica de la posición de la hembra 2 durante el estímulo de 55 kHz.

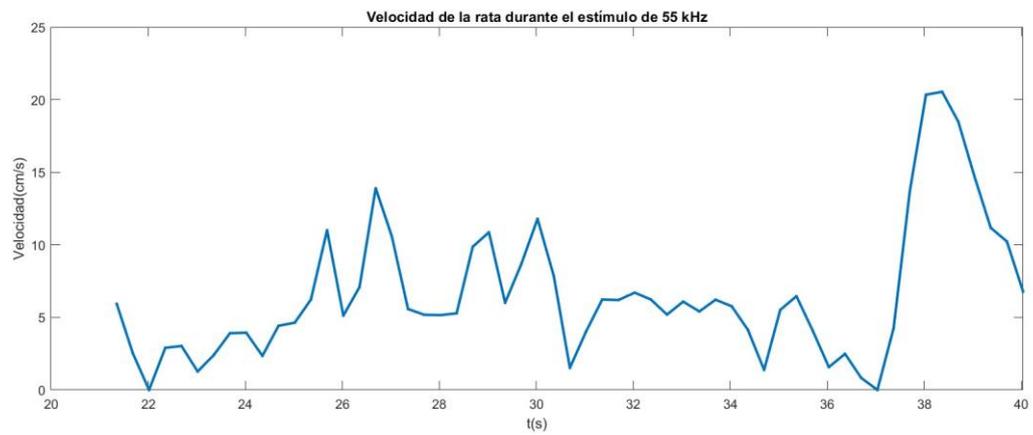


Figura 101. Gráfica de la velocidad de la hembra 2 durante el estímulo de 55 kHz.

3. Tiempo de relajación

Duración: 20 segundos

Durante el tiempo de relajación el animal se mantuvo la mayor parte del tiempo atusándose el rostro. Exploró con la cabeza, pero permaneciendo prácticamente inmóvil durante ese período. Por último, en una ocasión, se apoyó sobre sus patas traseras de cara a la pared de la jaula.

Su nivel de actividad dinámica disminuyó considerablemente como se puede apreciar en el etograma calculado, pues su posición prácticamente no cambió durante la fase.

Su velocidad máxima fue de casi 6 cm/s, menor que las otras velocidades que mantuvo previamente, y su velocidad mínima fue, efectivamente, de 0 cm/s.

En total se sumaron tres conductas claras: atusamiento rostral (la mayor parte del tiempo), exploración y exploración erguida.

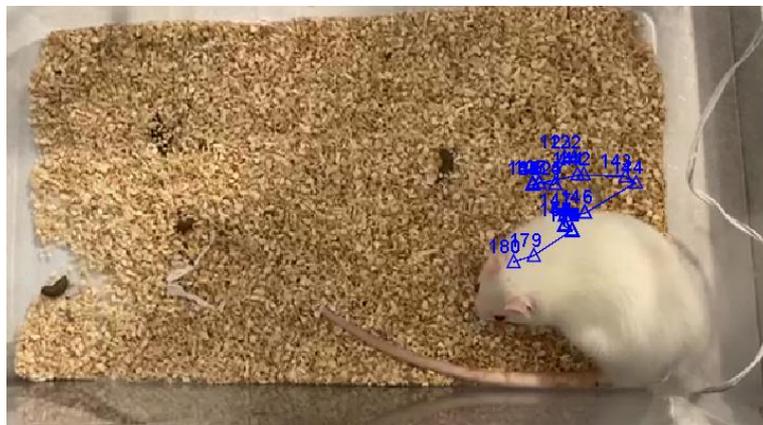


Figura 102. Etograma hembra 2 durante el 1º tiempo de relajación.

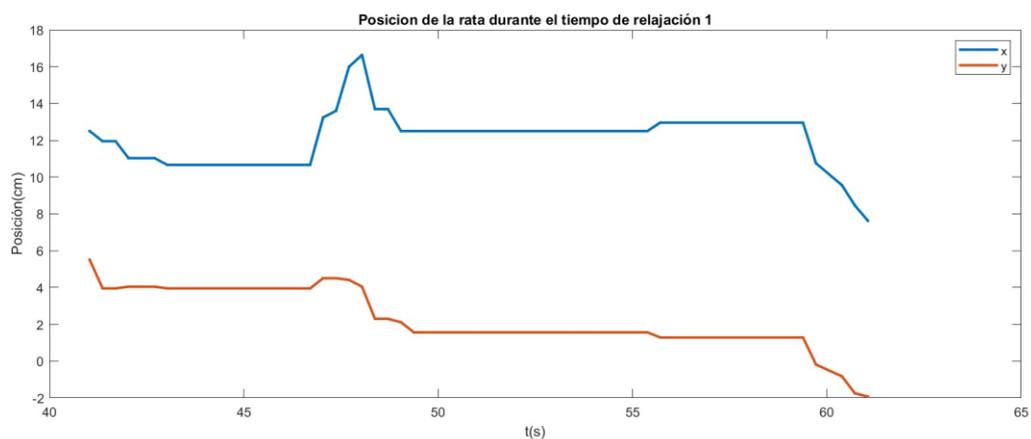


Figura 103. Gráfica de la posición de la hembra 2 durante el 1º tiempo de relajación

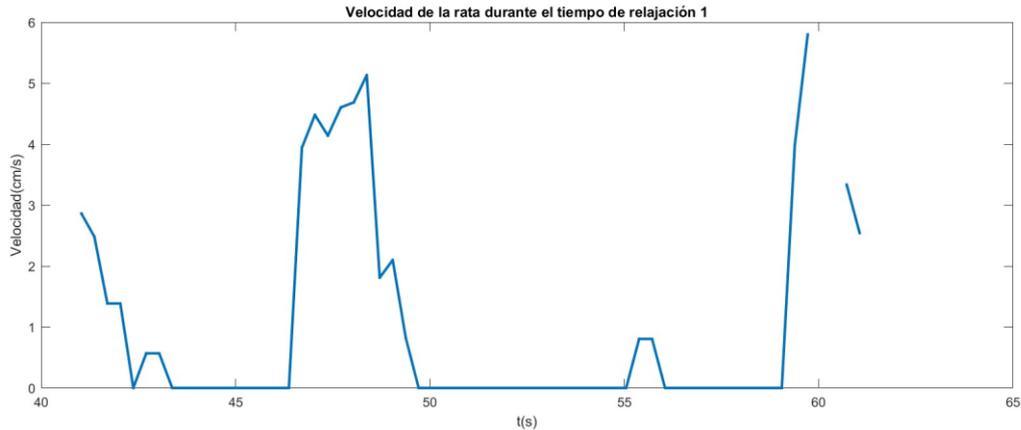


Figura 104. Gráfica de la velocidad de la hembra 2 durante el 1º tiempo de relajación

4. Estímulo de 8 kHz

Duración: 57 segundos

Durante el período de estimulación de 8 kHz, el sujeto siguió la tendencia de la fase anterior. Siguió explorando con la cabeza y también se atusó el rostro en una ocasión. Como novedad, se pudo apreciar como el animal escarbó el suelo durante unos segundos, deambuló internamente por la jaula y sufrió congelamiento hasta dos veces al final del período.

Estos instantes de congelación se pueden apreciar en las gráficas de la velocidad y posición a partir del segundo 82.

La velocidad máxima fue de casi 20 cm/s en el momento de la deambulación (prácticamente al principio del período) y su velocidad mínima fue de 0 cm/s, durante los 'Freezings', el atusamiento rostral y cuando escarbó casi llegando al segundo 75.

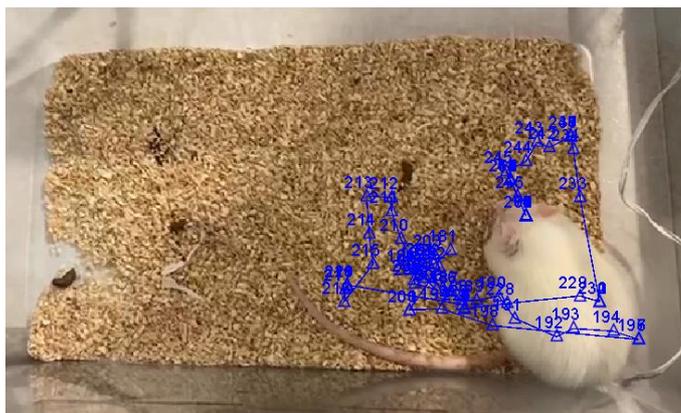


Figura 105. Etograma hembra 2 durante el estímulo de 8 kHz.

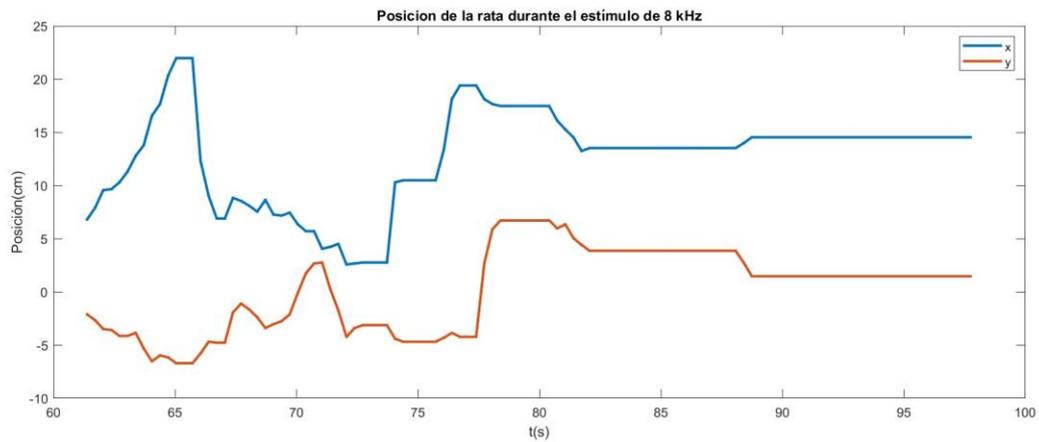


Figura 106. Gráfica de la posición de la hembra 2 durante el estímulo de 8 kHz.

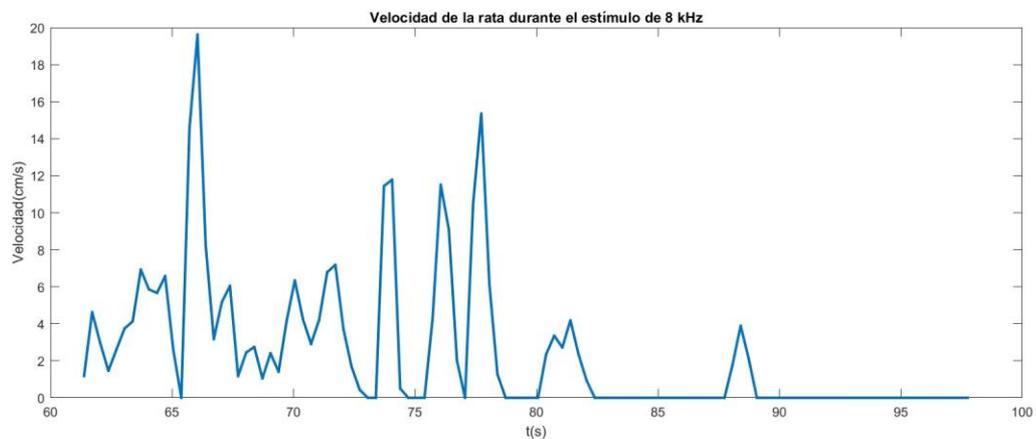


Figura 107. Gráfica de la velocidad de la hembra 2 durante el estímulo de 8 kHz.

5. Tiempo de relajación

Duración: 23 segundos

Tras el intervalo de estimulación, la hembra número 2 se dedicó a deambular externamente por la jaula y en varias ocasiones a explorar de manera erguida sobre sus patas traseras, tal y como se aprecia en la imagen del etograma.

También se atusó el rostro y escarbó en una ocasión, siendo éstos los momentos en los que la velocidad se hace nula.

En total se cuantificaron cuatro conductas, siendo la exploración erguida la más repetida con diferencia.

Su velocidad máxima fue de 16 cm/s y la mínima de 0 cm/s.

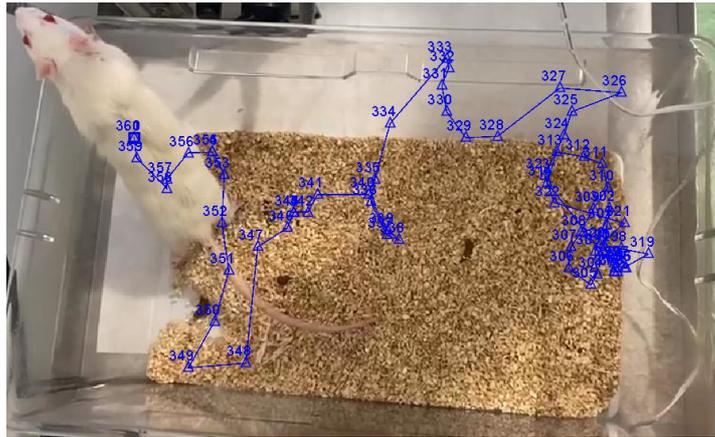


Figura 108. Etograma hembra 2 durante el 2º tiempo de relajación.

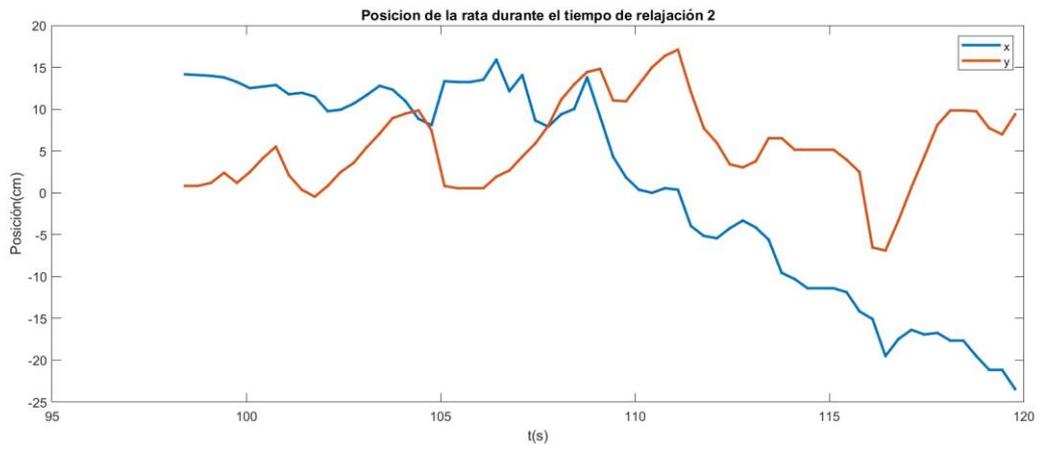


Figura 109. Gráfica de la posición de la hembra 2 durante el 2º tiempo de relajación

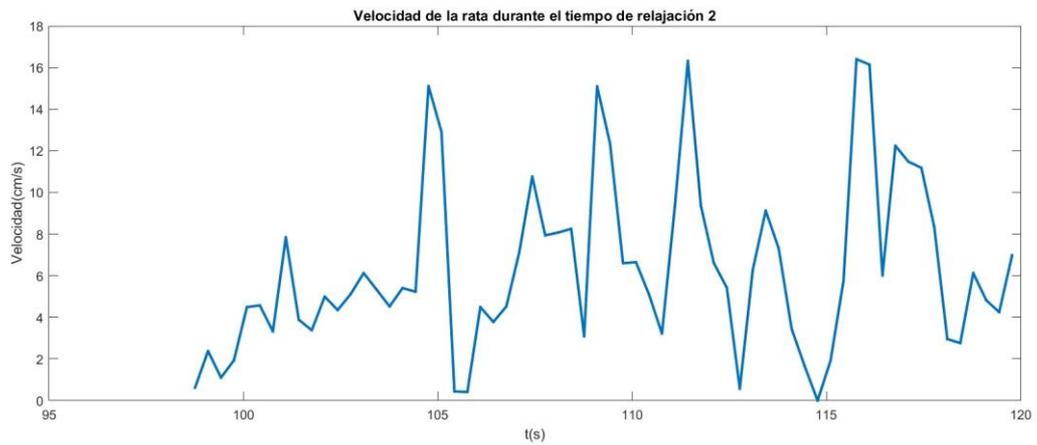


Figura 110. Gráfica de la velocidad de la hembra 2 durante el 2º tiempo de relajación

6. Resumen contabilización de conductas de la hembra 2 durante la prueba de estímulos

Tabla 11. Resumen contabilización de conductas y otras variables de la hembra 2

	Tiempo de acondicionam. de		Estímulo de 55 kHz		Tiempo de recuperación de		Estímulo de 8 kHz		Tiempo de recuperación de	
	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%
Atusamiento	1	12.5			2	50	1	12.5	1	20
Escarbar			1	12.5			1	12.5	1	20
Deambulaci3n externa	2	25	2	25					1	20
Deambulaci3n interna	1	12.5					1	12.5		
Explorar	2	25	2	25	1	25	3	37.5		
Exploraci3n erguida	2	25	3	37.5	1	25			2	40
“Freezing”							2	25		
No responder										
TOTAL Σ:	8	100	8	100	4	100	8	100	5	100
CONDUCTA M3S REPETIDA	Deambulaci3n externa, Explorar y Exploraci3n erguida		Exploraci3n erguida		Atusamiento		Explorar y “Freezing”		Exploraci3n erguida	
DISTANCIA RECORRIDA	72.8 cm		97.19 cm		21.14 cm		66.41 cm		99.33	
VELOCIDAD MEDIA	6.49 cm/s		6.41 cm/s		0.92 cm/s		2.47 cm/s		6.11 cm/s	

RECORRIDO TOTAL	VELOCIDAD M3XIMA	VELOCIDAD M3NIMA
357 cm	20.54 cm/s	0 cm/s

Tabla 12. Recorrido total y velocidades m3xima y m3nima de la hembra 2.

- Diferencias entre tiempo acondicionamiento y tiempo de estímulo 8 kHz

Se nota una clara diferencia de actividad de un período a otro. Mientras que en el tiempo de acondicionamiento la rata se dedica a deambular y explorar a lo largo de toda la jaula manteniendo una actividad bastante alta, durante el período de estímulo de 8 kHz, el sujeto permanece prácticamente inmóvil explorando exclusivamente con la cabeza llegando a sufrir 'Freezing' en dos ocasiones.

- Diferencias entre tiempo recuperación y tiempo de estímulo de 8 kHz

La tendencia en ambos intervalos de tiempo es parecida, pero diferenciándose en el fenómeno de congelación que sufre el animal durante el estímulo de 8 kHz.

- Diferencias entre tiempo de acondicionamiento y 2º tiempo de recuperación (Principio vs Final)

Al final de la experimentación y tras el período de estimulación, el sujeto vuelve a su tendencia exploratoria de forma erguida y a deambular externamente como lo hacía en la fase de acondicionamiento.

- Recorrió más centímetros de superficie en la 2º fase de recuperación: 99.3 cm.
- Recorrió menos centímetros de superficie en la 1º fase de recuperación: 21.14 cm.

5.1.1.6 Hembra 3

1. Tiempo de acondicionamiento:

Duración: 15 segundos

Durante esta primera fase de acondicionamiento, la hembra número tres se dedicó a deambular tanto externa como internamente y a explorar de manera erguida en tres ocasiones.

Esta deambulación y las tres ocasiones en las que explora de forma erguida apoyada en la pared de la jaula se pueden apreciar en el etograma calculado.

Desde el primer instante en el que se colocó a este sujeto en la jaula comenzó a deambular y no estuvo quieto en ningún momento durante este período.

Su velocidad máxima fue de casi 20 cm/s y la mínima de 0 cm/s.

En total se cuantificaron tres conductas distintas: la deambulación tanto interna como externa y la exploración erguida.

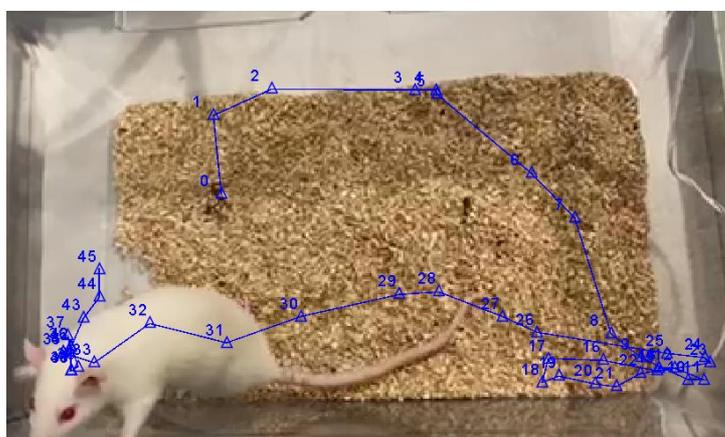


Figura 111. Etograma hembra 3 durante el tiempo de acondicionamiento.

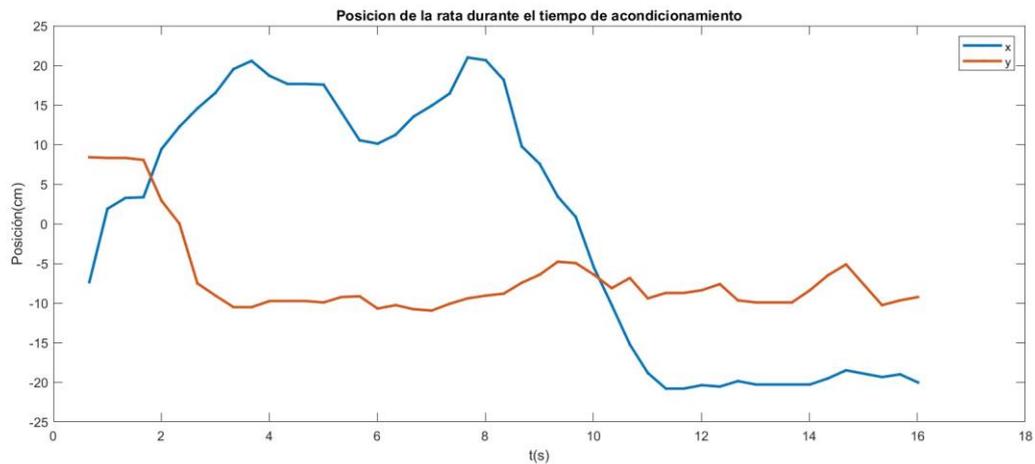


Figura 112. Gráfica de la posición de la hembra 3 durante el tiempo de acondicionamiento

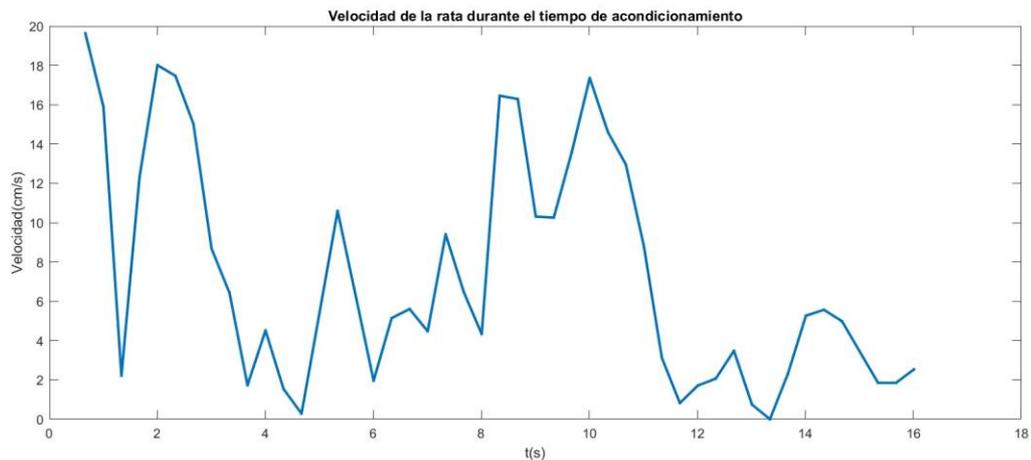


Figura 113. Gráfica de la velocidad de la hembra 3 durante el tiempo de acondicionamiento

2. Estímulo de 55 kHz

Duración: 30 segundos

Durante la fase del primer estímulo, la rata sigue deambulando y explorando, pero con dos conductas nuevas: escarba y explora con la cabeza en varias ocasiones.

Su velocidad máxima fue de 18 cm/s, llevando velocidades altas durante la mayoría del transcurso del período. Por otro lado, su velocidad mínima fue de 0 cm/s en las ocasiones en las que exploró con la cabeza y se mantuvo inmóvil y en las que escarbó el suelo de la jaula.

En total se sumaron 4 conductas destacables.

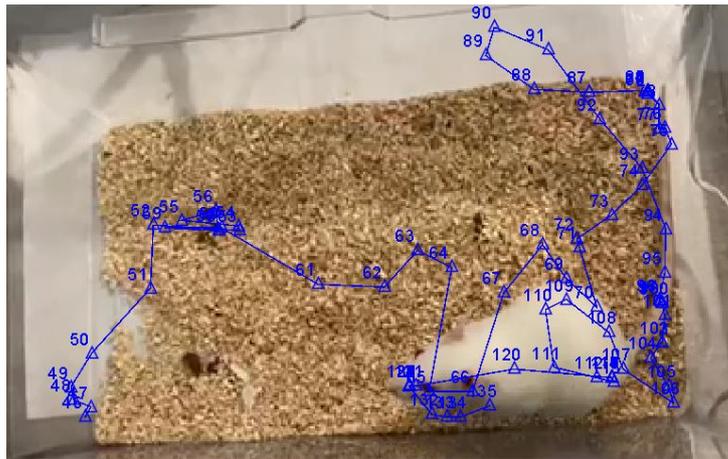


Figura 114. Etograma hembra 3 durante el estímulo de 55 kHz



Figura 115. Gráfica de la posición de la hembra 3 durante el estímulo de 55 kHz

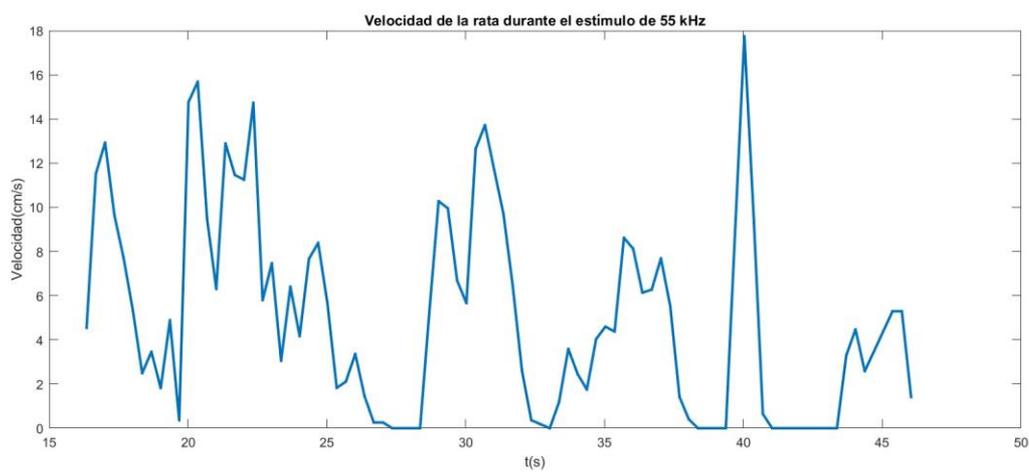


Figura 116. Gráfica de la velocidad de la hembra 3 durante el estímulo de 55 kHz

3. Tiempo de relajación

Duración: 30 segundos

Durante el tiempo de relajación el animal siguió exactamente con las mismas pautas que en el período de estímulo de 55 kHz, solo añadió una conducta nueva al final de la fase que fue el atusamiento rostral en dos ocasiones.

Su actividad disminuyó de forma leve teniendo un parón de velocidad y posición en el momento del atusamiento, el cual comenzó en el segundo 64 hasta el 73.

Su máxima velocidad fue de 10 cm/s al final del período y el comienzo del siguiente, y la mínima fue de 0 cm/s durante el atusamiento.

En total se cuantificaron 5 conductas, siendo las más repetidas la exploración erguida y el atusamiento rostral.

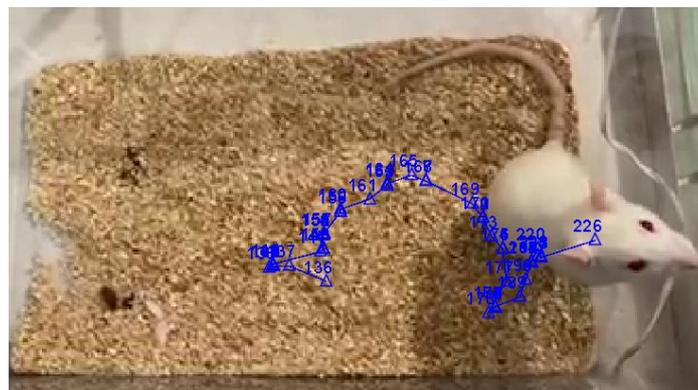


Figura 117. Etograma hembra 3 durante el 1º tiempo de relajación.

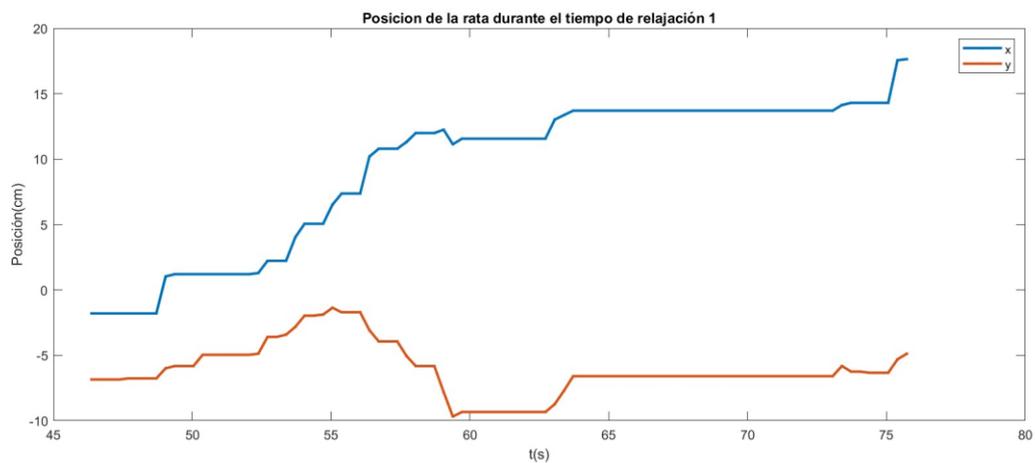


Figura 118. Gráfica de la posición de la hembra 3 durante el 1º tiempo de relajación

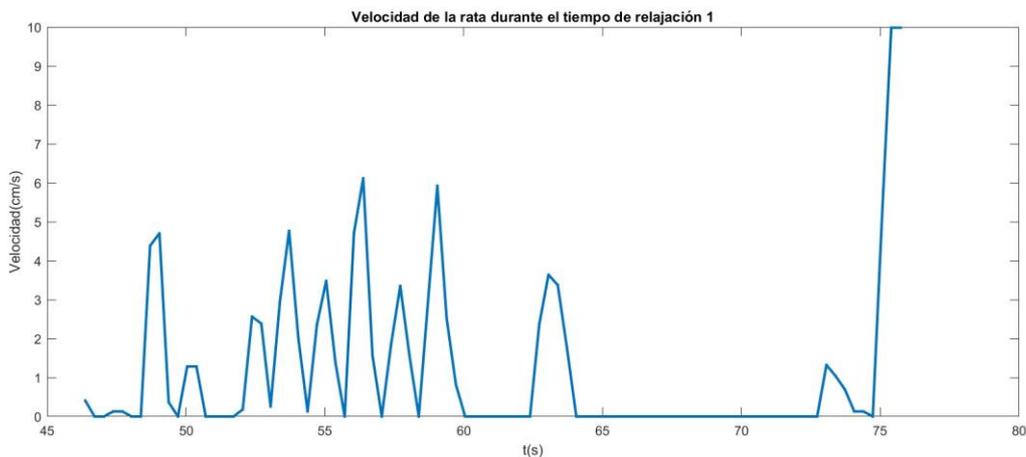


Figura 119. Gráfica de la velocidad de la hembra 3 durante el 1º tiempo de relajación

4. Estímulo de 8 kHz

Duración: 35 segundos

Tras el 1º tiempo de relajación, comenzó la segunda estimulación con una frecuencia de 8 kHz. En este intervalo el animal mantuvo al principio la tendencia exploratoria previamente seguida hasta que en el segundo 100 sufrió congelamiento durante 10 segundos completos.

Durante el intervalo de tiempo exploratorio, el sujeto tuvo paradas menos continuas referidas a un atusamiento rostral o en dos ocasiones a exploración erguida.

En total se sumaron cinco conductas, tres exploratorias y dos de congelación.

Su velocidad máxima fue de casi 12 cm/s (menor que la de sus compañeras hembras), y la mínima de 0 segundos.

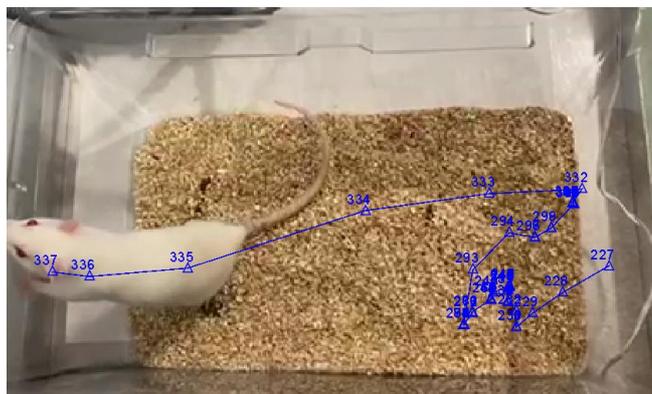


Figura 120. Etograma hembra 3 durante el estímulo de 8 kHz

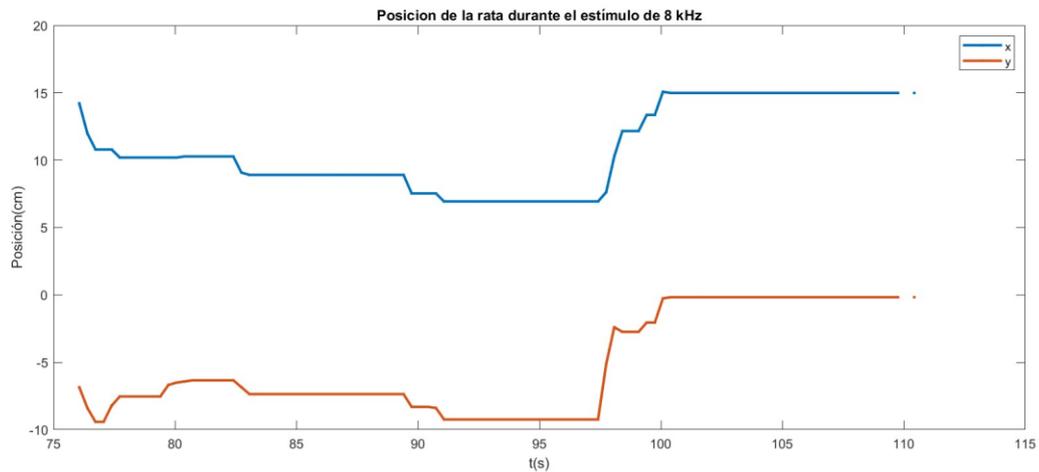


Figura 121. Gráfica de la posición de la hembra 3 durante el estímulo de 8 kHz

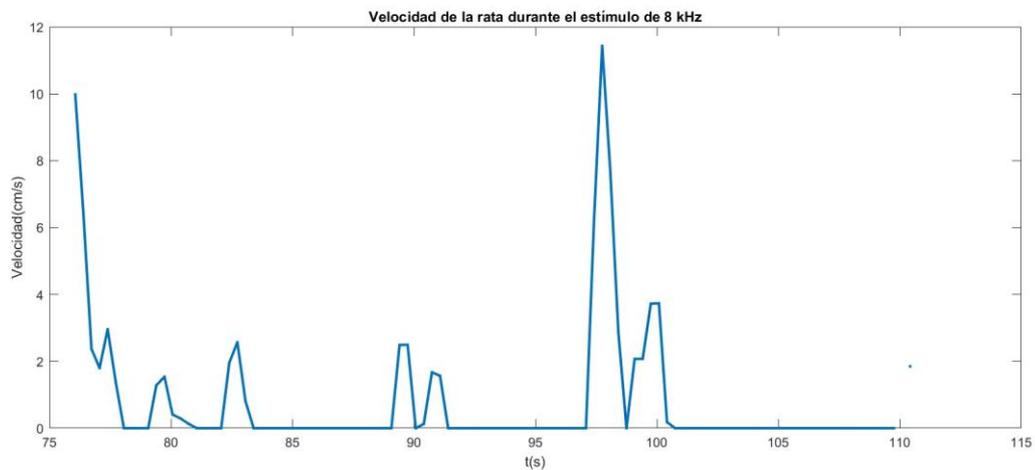


Figura 122. Gráfica de la velocidad de la hembra 3 durante el estímulo de 8 kHz

5. Tiempo de relajación

Duración: 15 segundos

Durante este último intervalo de prueba la rata se dedicó a explorar con la cabeza y a explorar de manera erguida en reiteradas ocasiones. Se ve la diferencia clara con el parón que había sufrido su actividad durante el estímulo de 8 kHz y cómo en esta fase la recupera.

Su velocidad máxima fue de casi 20 cm/s y la mínima de 0 cm/s en intervalos cortos de tiempo, que coinciden con las ocasiones en las que la rata se irguió sobre sus patas traseras.

Se sumaron en total dos conductas destacables. Las dos fueron exploratorias.

6. Resumen contabilización de conductas de la hembra 3 durante la prueba de estímulos

	Tiempo de acondicion.		Estímulo de 55 kHz		Tiempo de recuperación		Estímulo de 8 kHz		Tiempo de recuperación	
	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%	Número conductas	%
Atusamiento					2	28.6	1	14.3		
Escarbar			2	28.6	1	14.3				
Deambulaci3n externa	2	28.6	1	14.3	1	14.3	2	28.6		
Deambulaci3n interna	2	28.6	1	14.3	1	14.3				
Explorar			1	14.3			1	14.3	1	33.33
Exploraci3n erguida	3	42.86	2	28.6	2	28.6	2	28.6	2	66.67
“Freezing”							1	14.3		
No responder										
TOTAL Σ:	7	100	7	100	7	100	7	100	3	100
CONDUCTA M3S REPETIDA	Exploraci3n erguida		Escarbar y Exploraci3n erguida		Atusamiento		Deambulaci3n externa y “Freezing”		Exploraci3n erguida	
DISTANCIA RECORRIDA	82.8 cm		104.1 cm		17.04 cm		19 cm		170 cm	
VELOCIDAD MEDIA	7.72 cm/s		4.97 cm/s		1.04 cm/s		0.98 cm/s		5.91 cm/s	

Tabla 13. Resumen contabilizaci3n de conductas y otras variables de la hembra 3

RECORRIDO TOTAL	VELOCIDAD M3XIMA	VELOCIDAD M3NIMA
392 cm	19 cm/s	0 cm/s

Tabla 14. Recorrido total y velocidades m3xima y m3nima de la hembra 3.

- Diferencias entre tiempo acondicionamiento y tiempo de estímulo 8 kHz

Durante el tiempo de estímulo de 8 kHz, la hembra número 3 bajó su actividad llegando a tener poco menos de 1 cm/s de velocidad, mientras que en el tiempo de acondicionamiento superó los 7 cm/s. Durante la fase de estimulación sufrió el fenómeno de congelación mientras que en la primera fase de la prueba llevó una actividad exploratoria.

- Diferencias entre tiempo recuperación y tiempo de estímulo de 8 kHz

La mayor diferencia entre ambas fases fue que durante el tiempo de estimulación sufrió congelación, en cambio en la de recuperación no.

- Diferencias entre tiempo de acondicionamiento y 2º tiempo de recuperación (Principio vs Final)

Tras el período de estimulación de 8 kHz, la hembra 3 volvió a su actividad exploratoria sobrepasando los 5 cm/s y siguiendo la tendencia llevada en la fase de acondicionamiento.

- Recorrió más centímetros de superficie en la 2º fase de recuperación: 170 cm.
- Recorrió menos centímetros de superficie en la fase de estimulación de frecuencia 8 kHz: 19 cm.

5.1.2 Conclusiones

Una vez realizadas las pruebas a los sujetos y su posterior estudio conductual, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- Las conductas más repetidas dentro del grupo de los machos fueron la exploración realizada con el movimiento de la cabeza y la exploración erguida, hecha mayoritariamente en los extremos de la caja.
- La conducta más repetida de las hembras fue la exploración erguida y la deambulación externa.
- Por tanto, la conducta más repetida entre los seis sujetos en total fue la exploración erguida.
- Las hembras, en general, realizaron un mayor número de conductas que los machos.
- Dentro de los machos, el que tuvo más actividad fue el macho número 3, que incluso llegó a intentar escapar de la jaula.
- La hembra número 2 fue la que más número de conductas realizó y quien tuvo más actividad dentro de las féminas.
- En total, la rata con más actividad y más cambios conductuales fue la hembra número 2.
- El sujeto que recorrió más centímetros de superficie durante la prueba fue la hembra número 3.
- El sujeto que recorrió menos centímetros de superficie durante la prueba fue el macho número 1.
- La velocidad máxima que se midió fueron 20 cm/s y perteneció a la hembra número 2. Tuvo lugar durante el período de estimulación de frecuencia 8 kHz.
- La velocidad mínima fue de 0 cm/s y se obtuvo en todos los sujetos menos en la hembra 2. Éstos llegaron a permanecer inmóviles, incluso llegando a “Freezing” en varios casos, en algún momento durante el transcurso de la prueba.
- La hembra número 1 realizó 0.28 conductas/segundo de media durante su prueba de experimentación.
- La hembra número 2 realizó 0.29 conductas/segundo de media durante su prueba de experimentación.
- La hembra número 3 realizó 0.25 conductas/segundo de media durante su prueba de experimentación.

- La hembra que más número de conductas por segundo realizó fue la hembra número 2.
- El macho número 1 realizó 0.14 conductas/segundo de media durante su prueba de experimentación.
- El macho número 2 realizó 0.22 conductas/segundo de media durante su prueba de experimentación.
- El macho número 3 realizó 0.16 conductas/segundo de media durante su prueba de experimentación.
- El macho que más número de conductas por segundo realizó fue el macho número 2.
- La media entre las tres hembras fue de 0.28 conductas/seg.
- La media entre los tres machos fue de 0.17 conductas/seg, un poco más de la mitad que la media de las hembras.
- Durante el período de estimulación de 8 kHz, todas las hembras se dedicaron a deambular por el lado contrario a donde se encontraba el altavoz. Sin embargo, solo sufrieron el fenómeno de 'Freezing' las hembras número 2 y 3.
- La hembra número 1 sufrió congelamiento durante la fase de relajación, probablemente causado por un factor externo de la habitación.
- Durante el período de estimulación de 8 kHz, los machos tuvieron menos actividad que las hembras. Tanto el macho 2 como el 3 sufrieron 'Freezing' en más de una ocasión, y el resto del tiempo no tuvieron excesivo movimiento dentro de la jaula.
- El macho número 1 fue el único sujeto que permaneció sin responder prácticamente todo el tiempo. Este tipo de conductas suelen ser causadas por factores previos a la experimentación que condicionan el buen seguimiento de ésta. Podría estar enfermo o excesivamente estresado, es por ello por lo que se escoge a más de un animal para este tipo de pruebas.
- En total, 4 de 6 sujetos sufrieron congelamiento durante el período de estimulación de 8 kHz.

5.2 Medida de temperatura

Las temperaturas medidas con el sensor termográfico son más bajas de lo esperado por dos aspectos diferentes. En primer lugar, el instrumento funciona a base de gradientes de temperatura, es decir, el sensor tiene en cuenta tanto la temperatura corporal del animal como la del ambiente y estima un gradiente que es el que mide y expone. A este factor también hay que sumarle el rango de precisión que el sistema ofrecía (asociado a su coste). Hay que tener todo esto en cuenta a la hora de analizar los resultados recogidos en la siguiente tabla que se refiere a incrementos y no, obviamente a valores absolutos de temperatura en función de los intervalos de tiempo en los que se midieron. Por ello, el protocolo compara las medidas de temperatura obtenidas en pre 1° estímulo, 1° estímulo, post estímulo y recuperación (pre 2° estímulo), 2° estímulo y post estímulo y calcula la diferencia entre ellas.

	MACHO 1	MACHO 2	MACHO 3	HEMBRA 1	HEMBRA 2	HEMBRA 3
2 seg antes del 1° estímulo	23.75 °C	22.85 °C	22.5 °C	23.7 °C	21.9 °C	24.25 °C
$\Delta 1$	-0.25	0.15	-0.5	-0.2	-0.2	-0.05
Seg 0 del 1° estímulo	23.5 °C	23 °C	22 °C	23.5 °C	21.7 °C	24.2 °C
$\Delta 2$	0	0.2	1.2	-2.5	1.5	-0.2
Punto medio 1° estímulo	23.5 °C	23.2 °C	23.2 °C	21 °C	23.2 °C	24 °C
$\Delta 3$	0.45	-0.3	0	2.25	0	-0.4
2 seg después del 1° estímulo	23.95 °C	22.9 °C	23.2 °C	23.25 °C	23.2 °C	23.6 °C
$\Delta 4$	0.05	0.2	-0.2	0.65	-0.4	-0.2
2 seg antes del 2° estímulo	24 °C	23.1 °C	23 °C	23.9 °C	22.8 °C	23.4 °C
$\Delta 5$	0	0.2	0.3	0.1	0.2	0
Seg 0 del 2° estímulo	24 °C	23.3 °C	23.3 °C	24 °C	23 °C	23.4 °C
$\Delta 6$	0	0.9	1	0.5	1	0.9
Punto medio 2° estímulo	24 °C	24.2 °C	24.3 °C	24.5 °C	24 °C	24.5 °C
$\Delta 7$	-0.15	-0.2	-0.4	-0.6	-0.65	-0.7
2 seg después del 2° estímulo	23.85 °C	24 °C	23.9 °C	23.9 °C	23.4 °C	23.8 °C

Tabla 15. Tabla resumen de las medidas de temperaturas y los gradientes correspondientes de cada sujeto.

5.2.1 Evolución de las temperaturas medidas en el experimento del grupo de machos

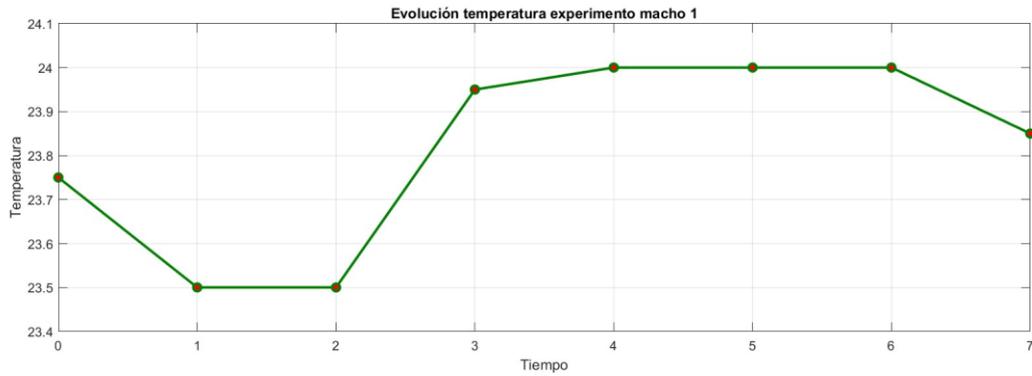


Figura 126. Evolución temperatura macho 1.

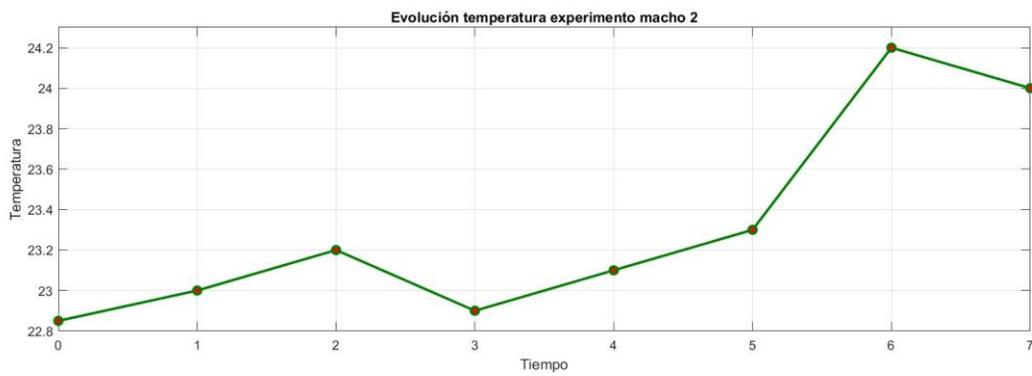


Figura 127. Evolución temperatura macho 2

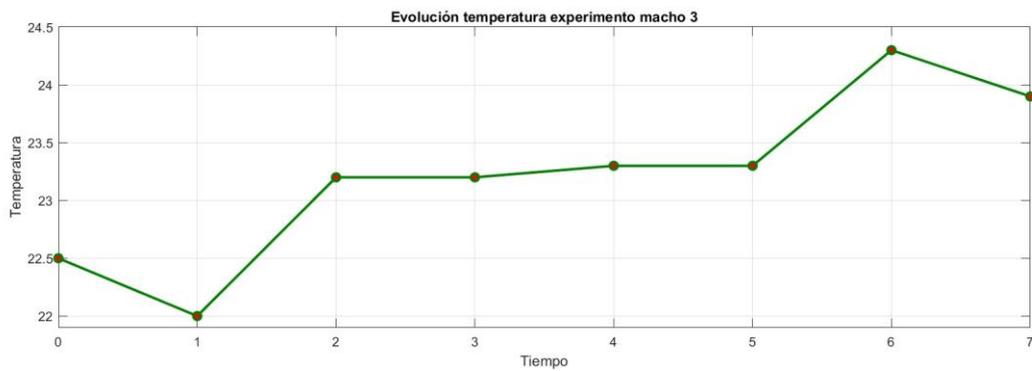


Figura 128. Evolución temperatura macho 3

5.2.2 Evolución de las temperaturas medidas en el experimento del grupo de hembras

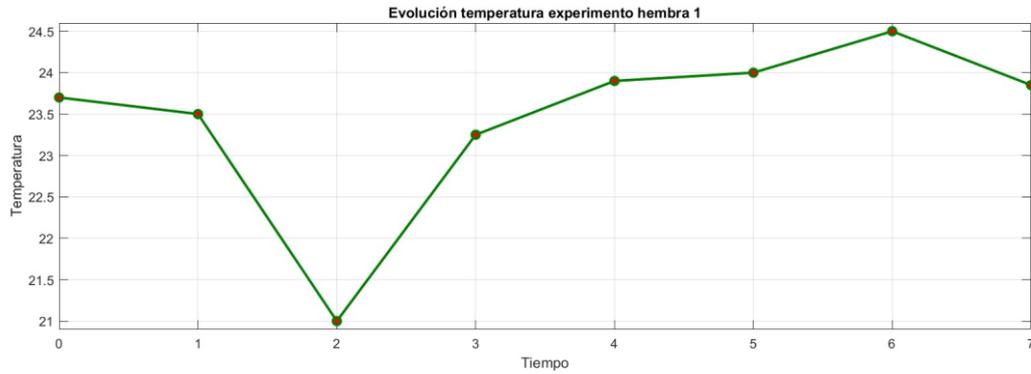


Figura 129. Evolución temperatura hembra 1

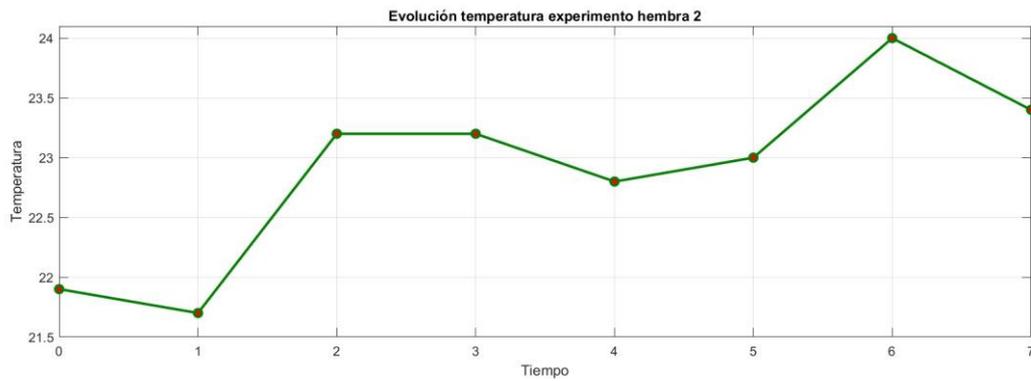


Figura 130. Evolución temperatura hembra 2

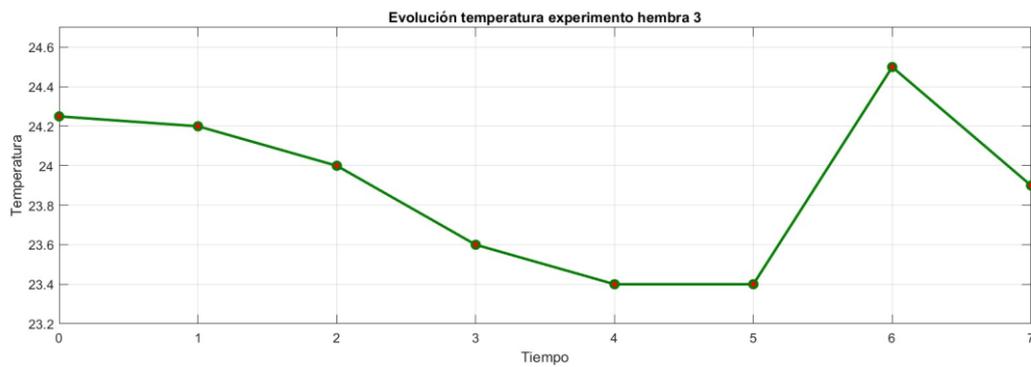


Figura 131. Evolución temperatura hembra 3

Siendo los puntos del eje x los siguientes:

- Punto 0: 2 segundos antes del primer estímulo.
- Punto 1: Segundo 0 del primer estímulo.
- Punto 2: Punto medio del primer estímulo.
- Punto 3: 2 segundos después del primer estímulo.
- Punto 4: 2 segundos antes del segundo estímulo.
- Punto 5: Segundo 0 del segundo estímulo.
- Punto 6: Punto medio del segundo estímulo.
- Punto 7: 2 segundos después del segundo estímulo.

5.2.3 Conclusiones

- Los seis sujetos siguen una línea de tendencia parecida.
- En todos los sujetos menos en el macho 1 (83.3% de los sujetos) se produce un aumento de temperatura desde que comienza el período de estímulo 8 kHz hasta el final de éste.
- En todos ellos (100% de los sujetos) se produce una posterior bajada de temperatura tras el estímulo de 8 kHz, es decir, en la fase de relajación 2.
- En el macho 1 se produce el cambio brusco de temperaturas al final de la fase del estímulo de 55 kHz. Por otro lado, el resto de los machos sufren este cambio al comenzar el período de estímulo de 8 kHz.
- El grupo de hembras durante el resto de experimentación siguieron pautas no muy parecidas. Mientras que la hembra 3 tuvo una tendencia a bajar su temperatura hasta la fase del estímulo 2, la hembra 2 fue justo al contrario. La hembra 1 tuvo más cambios bruscos de temperatura en relación a las otras féminas, pero siguió la tendencia a subir la temperatura de la hembra 3.
- La bajada más leve dentro de las hembras tras el estímulo de 8 kHz es la de la hembra número 1.
- La bajada más leve dentro de los machos tras el estímulo de 8 kHz es el del macho número 3.
- Tanto en la hembra 2 como en la 3 la subida de temperatura en la fase del segundo estímulo es brusca mientras que en la hembra 1 es una subida más continua.
- La bajada de temperatura de los machos en la 2ª fase de relajación es más leve en general que la bajada de las hembras.

6 CONCLUSIONES, LIMITACIONES Y LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS

6.1 Conclusiones

El objetivo de este proyecto consistía en desarrollar un diseño no invasivo que midiese variables fisiológicas en las ratas que permitiese correlacionar, dichos cambios, con modificaciones de patrones conductuales en animales sin restricciones de movimiento llevando a cabo etogramas, para cuantificar la correlación entre ambos.

Se han estudiado todo tipo de metodologías invasivas, medio invasivas y no invasivas que se llevan a cabo o están en proceso de investigación en la ciencia hoy en día. La conclusión ha sido que, sobre todo en animales de pequeño tamaño como las ratas, los métodos que se utilizan en los laboratorios para medir variables fisiológicas suelen ser metodologías muy invasivas que necesitan, como mínimo, anestesia local del animal.

El uso de sensores, tanto termográficos como de movimiento, suelen ser una buena opción para medir variables y no interrumpir la libre actividad del animal. En este proyecto se plantean y se estudian, llegando a utilizar un tipo de sensor termográfico de bajo coste que, aunque no haya tenido la precisión que se esperaba para la correlación de la temperatura con el comportamiento animal, ha servido de guía para cuantificar gradientes con los que se ha podido llegar a diferentes conclusiones.

Tras el análisis de los resultados de las variables comportamentales extraídas de los etogramas como de la temperatura como variable fisiológica, se llega al objetivo final de este proyecto: correlacionar ambas variables.

- Como se ha indicado en los resultados fisiológicos, 5 de 6 animales sufrieron un aumento de temperatura al comienzo del período de estimulación de frecuencia 8 kHz. De igual forma, 4 de 6 sujetos sufrieron el fenómeno de 'Freezing' durante este mismo intervalo de tiempo. Podría correlacionarse estos dos aspectos: la subida de temperatura con la manifestación de una conducta característica de la respuesta a estrés como es la "aparente" congelación momentánea del cuerpo ante el estímulo, pues su finalidad no era la de sacar conclusiones ni validar el funcionamiento del modelo, sino que era más bien un paso previo a la investigación de ciertos estímulos.
- El sistema permitió identificar conductas "anómalas"; por ejemplo, la bajada más leve dentro de las hembras tras el estímulo de 8 kHz fue manifestada por la hembra número 3, la cual, en la fase de relajación post-estímulo, sufrió congelación. A diferencia de las demás hembras, ésta sufrió este fenómeno en el período de relajación y no en el del propio estímulo.
- El diseño es eficaz a la hora de permitir la identificación de patrones de conducta preponderantes, por ejemplo, tanto los machos 2 y 3 como las hembras 2 y 3 tuvieron el mayor incremento de temperatura con respecto a los dos restantes en la fase de estimulación de 8 kHz. Fueron incrementos de 0.9 y 1°C durante ese período y los cuatro coinciden en dos conductas repetidas durante el transcurso del intervalo: La exploración y la congelación.
- De todo ello se deduce la utilidad que este modelo podría tener en las aulas de etología dado su bajo coste y fácil manejo.

6.2 Dificultades y mejoras

Este proyecto se planteó en un principio con unos objetivos muy ambiciosos que no han podido cumplirse por diversas dificultades. Todas estas limitaciones se describen a continuación y se intenta plantear un proyecto futuro que sea la continuación de éste y que minimice todos estos inconvenientes.

6.2.1 Factores externos

Hubo una serie de factores externos que pudieron interrumpir la correcta continuación de las pruebas asociados a la rutina de trabajo en las instalaciones como:

- La transición del sujeto desde una habitación a otra. Para el correcto seguimiento de la prueba y del acondicionamiento de la rata, cada animal deberá permanecer en la jaula de experimentación uno o dos días previos a la prueba.
- El uso de la misma jaula para todas las ratas. En un estudio futuro se procurará que la influencia que puede generar el rastro de un animal en otro sea lo más mínima posible. Para ello, se utilizarán distintos cubículos para cada sujeto.

Estos factores fueron tenidos en cuenta en el estudio de cada animal, pues pudieron influir en su conducta.

6.2.2 Limitaciones

Las limitaciones que se fueron dando a lo largo de la investigación fueron las siguientes:

- El número de sujetos para la experimentación. El número de sujetos de $N=6$ se ajusta a un proyecto-piloto como este. Como este primer estudio ha sido de introducción a las metodologías utilizadas y una propuesta de análisis comportamental junto a medición de variables fisiológicas, el uso de más de seis animales habría sido inapropiado desde el punto de vista ético. El objetivo principal era demostrar que el método funciona, sus limitaciones y posibles mejoras en todos sus aspectos, y para ello seis sujetos de experimentación han sido más que suficientes.
- Falta de información sobre metodologías no invasivas para la medición de variables fisiológicas. Todas ellas de medio-alto coste o que limitaban de una u otra manera la libertad de movimiento del animal.
- Falta de tiempo a la hora de realizar la experimentación. Como la transición de los animales de una habitación a otra o el cambio de un sujeto a otro.
- Uso de dispositivos sensores de bajo coste que no han tenido la precisión esperada. No se ha podido comparar la temperatura corporal de los sujetos entre ellos pues las temperaturas medidas no corresponden a valores reales de temperatura corporal. Solo se ha trabajado con gradientes.
- Al no tener valores reales de temperaturas corporales de las ratas, no se ha podido correlacionar la temperatura con otras variables fisiológicas como la frecuencia cardíaca o la respiratoria. Esta correlación habría sido idónea para conectar esta metodología con el modelo animal de análisis de la conducta y se buscará conseguirlo en líneas de investigación futuras.

6.2.3 Mejoras

- Tal y como se ha explicado en el último apartado de las limitaciones: El uso de un sensor termográfico de buena calidad en futuras investigaciones, que distinga la temperatura ambiental y la corporal del animal, será de gran ayuda y podrá relacionar tanto variables fisiológicas como la temperatura y el ritmo cardíaco, los cuales están correlacionados, como variables fisiológicas con variables comportamentales.
- Para el perfecto funcionamiento del experimento en un futuro sería necesario que el sujeto en cuestión tuviera un tiempo de adaptación a la jaula de uno o dos días previos a la prueba.
- La jaula donde se encuentren los animales debe ser diferente para cada uno de ellos. Así, no podrá influir ningún rastro de otros animales en la experimentación con el sujeto.
- El número de sujetos, para una buena investigación fisiológica sobre animales debe ser superior a 20 ($N>20$) y se deben distinguir machos de hembras para cada experimento (aspecto ya tenido en cuenta en este proyecto).

6.3 Líneas de investigación

6.3.1 Línea de investigación del proyecto

Este proyecto se ha dividido en cuatro fases:

1. Documentación

Dos meses realizando una búsqueda avanzada sobre los aspectos más importantes del estudio en artículos, libros, tesis doctorales, etc.

2. Selección bibliográfica

Durante un mes una selección de los artículos y documentos de interés de cara al desarrollo del proyecto

3. Pruebas experimentales

Durante un mes se realizaron todas las pruebas de laboratorio junto a los animales y al equipo y modelos planteados en el proyecto.

4. Resultados del método

Durante dos meses un análisis de todos los resultados obtenidos en la experimentación y los aspectos a mejorar para futuras líneas de investigación.



Figura 132. Línea de investigación del proyecto

6.3.2 Líneas de investigación futuras

Este tipo de sistemas tienen una gran importancia en la investigación animal pues priorizan la salud y el bienestar del animal sin perturbar su comportamiento con metodologías invasivas. El estudio de métodos no invasivos está avanzando y creciendo cada día más. Poder correlacionar sistemas bioelectrónicos que ayuden a analizar y medir parámetros fisiológicos con conductas animales puede llegar a convertirse en un logro científico que una la electrónica con la biología animal.

Al comienzo de esta investigación se estudiaron cuáles podrían ser las variables de interés. Se analizaron muchas de ellas y se investigó sobre los parámetros claves para los sujetos utilizados, en este caso, las ratas. Como se ha comentado antes, el objetivo era muy ambicioso y no era posible conseguir medir todas las variables en un solo proyecto, por lo que se eligieron varias y se trabajó con ellas a partir de ese momento. Para seguir con esta línea de investigación sería importante medir un número más alto de variables fisiológicas de forma no invasiva.

La frecuencia cardíaca y la respiratoria están directamente relacionadas con los cambios de temperatura por lo que sería importante obtener un sensor termográfico de alta calidad. De este modo se conseguirían tres variables fisiológicas diferentes con un mismo instrumento.

Por otro lado, resultaría interesante analizar la posible piloerección sufrida por los animales en función de los diferentes estímulos como la dilatación ocular en los diferentes momentos de la experimentación.

De igual forma que en este proyecto se utilizó un altavoz para generar las frecuencias elegidas, podría resultar de gran interés la utilización de una grabadora para captar la vocalización de las ratas durante las pruebas.

Todas estas variables podrían ser medidas y analizadas para correlacionarlas con las ya estudiadas en este proyecto.

Por último, de igual forma que se podrían añadir más variables de estudio se podrían ampliar el número de estímulos utilizados. Otras frecuencias que generen comportamientos diferentes de estrés, ansiedad o relax, o incluso el ruido del maullido de un gato para analizar la reacción de las ratas también resultaría sugerente.

Como se ha comentado anteriormente, se ha procurado analizar cada metodología usada hoy en día y descartar todas aquellas que afectaran de una forma u otra al animal y al seguimiento de la investigación. Se ha propuesto un modelo animal comportamental y no invasivo y se han planteado sus resultados, análisis, mejoras y limitaciones.

Es un camino largo que está ya recorriéndose pero que le queda mucho camino por delante y es el principio de esta conexión ardua, pero no imposible, entre estas dos ciencias.

7 REFERENCIAS

- [1] Nat Neurosci. 2021 Apr;24(4):457-464. Considering sex as a biological variable will require a global shift in science culture Rebecca M Shansky 1, Anne Z Murphy 2
- [2] Increasing the complexity: new genes and new types of albinism. Montoliu L, Grønskov K, Wei AH, Martínez-García M, Fernández A, Arveiler B, Morice-Picard F, Riazuddin S, Suzuki T, Ahmed ZM, Rosenberg T, Li W. Pigment Cell Melanoma Res. 2014 Jan;27(1):11-8.
- [3] Correction of retinal abnormalities found in albinism by introduction of a functional tyrosinase gene in transgenic mice and rabbits. Jeffery G, Brem G, Montoliu L. Brain Res Dev Brain Res. 1997 Mar 17;99(1):95-102.
- [4] The albino retina: an abnormality that provides insight into normal retinal development. Jeffery G. Trends Neurosci. 1997 Apr;20(4):165-9.
- [5] Organization for physiological **homeostasis**. Physiol Rev 1929; 9: 399-431]. **Walter B. Cannon** (1871-1945)
- [6] R. B. Masterton, "Role of the central auditory system in hearing: the new direction," Trends in Neurosciences, vol. 15, no. 8, pp. 280-285, 1992/08/01/ 1992, doi: [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(92\)90077-L](https://doi.org/10.1016/0166-2236(92)90077-L)
- [7] Kikusui T, Nishizawa Y, Mori Y. Se emiten vocalizaciones ultrasónicas condicionadas relacionadas con el miedo como respuesta emocional. J Vet Med Sci 2003; 65(12): 1299-305.
- [8] «Parámetros fisiológicos.» [En línea]. Available: <https://www.humane-endpoints.info/es/rata/parametros-fisiologicos> [Último acceso: 7 Julio 2022].
- [9] Verduzco-Mendoza A, Alfaro-Rodríguez A, Arch-Tirado E. Etología y bioacústica en ratas y cobayos. Rev Mex AMCAOF. 2012;1 (1):7-12.
- [10] CAN, L. Telemetric data collection should be standard in modern experimental cardiovascular research. **Physiology & Behavior**, 242, p. 113620, 2021/12/01/ 2021
- [11] Niemeyer, J. Telemetría para la fisiología de pequeños animales. *Lab Anim* **45**, 255–257 (2016). <https://doi.org/10.1038/labanim.1048>
- [12] HARKIN, A.; O'DONNELL, J. M.; KELLY, J. P. A study of VitalView™ for behavioural and physiological monitoring in laboratory rats. **Physiology & Behavior**, 77, n. 1, p. 65-77, 2002/09/01/ 2002.
- [13] «Transonic. The measurement of better results» [En línea]. Available: <https://www.transonic.com/endogea> [Último acceso: 15 Junio 2022].
- [14] YOUSEF YENGEJ, D. A.-O. X.; FERANDO, I. A.-O.; KECHYAN, G. A.-O.; NWAABI, S. A.-O. *et al.* Continuous long-term recording and triggering of brain neurovascular activity and behaviour in freely moving rodents. n. 1469-7793 (Electronic).

- [15] GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, C.; FRAILE, J.-C.; PÉREZ-TURIEL, J.; DAMM, E. *et al.* Capacitive Sensing for Non-Invasive Breathing and Heart Monitoring in Non-Restrained, Non-Sedated Laboratory Mice. **Sensors**, 16, n. 7, 2016.
- [16] GUAN, Y.; LE, X.; HU, M.; LIU, W. *et al.* A noninvasive method for monitoring respiratory rate of rats based on a microcantilever resonant humidity sensor. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, 29, n. 12, p. 125001, 2019/10/03 2019.
- [17] PEREIRA-JUNIOR, P. P.; MAROCOLO M FAU - RODRIGUES, F. P.; RODRIGUES FP FAU - MEDEI, E.; MEDEI E FAU - NASCIMENTO, J. H. M. *et al.* Noninvasive method for electrocardiogram [3] recording in conscious rats: feasibility for heart rate variability analysis. n. 1678-2690 (Electronic).
- [18] KONOPELSKI, P.; UFNAL, M. Electrocardiography in Rats: a Comparison to Human. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, 65, p. 717-725, 10/01 2016.
- [19] DAUGHERTY, A.; RATERI D FAU - HONG, L.; HONG L FAU - BALAKRISHNAN, A.; BALAKRISHNAN, A. Measuring blood pressure in mice using volume pressure recording, a tail-cuff method. LID - 1291 [pii] LID - 10.3791/1291 [doi]. n. 1940-087X (Electronic).
- [20] S. Sastoque y J. M. López López, «MONITOREO REMOTO DE FRECUENCIA CARDÍACA A TRAVÉS DE FOTOPLETISMOGRAFÍA DE IMAGEN (IPPG)», *EIEI ACOFI*, ago. 2020
- [21] Cobos-Torres, J-C., Abderrahim, M. Monitoreo en línea de la frecuencia cardíaca por imagen fotopletismografía mediante filtrado Kalman. 7, 8 y 9 de septiembre de 2016, Madrid (pp. 529-535) DOI capítulo: <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497498081.0529> DOI libro: <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497498081>
- [22] «Eulerian Video Magnification for Revealing Subtle Changes in the World» [En línea]. Available: <http://people.csail.mit.edu/mrub/evm/> [Último acceso: 15 Junio 2022].
- [23] «Tracker. Video Analysis and modeling tool» [En línea]. Available: <https://physlets.org/tracker/> [Último acceso: 10 Junio 2022].
- [24] Elena Pérez, M. Monitorización mediante biosensores para el estudio de la piloerección y otras reacciones fisiológicas asociadas a estímulos musicales en animales. (Trabajo Fin de Máster). Universidad de Sevilla, 2021.
- [25] «Ahuyentador de ratas» [En línea]. Available: http://www.icontrol3.com.br/anexos/produto_290805.pdf [Último acceso: 20 Mayo 2022].
- [26] VectorMine. *Homeostasis*. Shutterstock. [En línea]. Available: www.xyz.com [Último acceso: 2 Junio 2022]
- [27] Biotelemetría EndoGear. Transonic [En línea]. Available: <https://www.transonic.com/endogear>

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1: Software Tracker™

1.1 Definición

Es un software de código abierto que permite el análisis de movimientos en una y dos dimensiones. Gracias al programa se pueden extraer tablas con los valores de diferentes magnitudes:

- Posición-tiempo de una o varias masas puntuales.
- Velocidad-tiempo.
- Aceleración-tiempo.
- Otras magnitudes dinámicas e incluso energéticas que describen el movimiento.

Tracker™ se puede utilizar tanto para el seguimiento manual o automático de objetos como para la creación de modelos dinámicos y cinemáticos que podrán sincronizarse automáticamente. En este trabajo se utilizará solo la parte de seguimiento del programa.

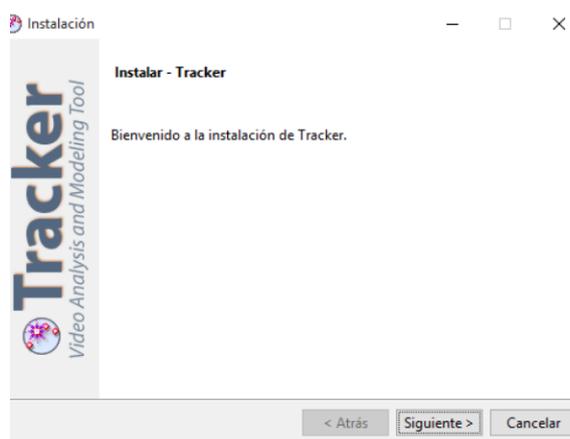
1.2 Requerimientos técnicos

Si se dispone de un ordenador Windows o Mac, se podrá instalar Tracker™ soportando QuickTime 7 (disponible en tales sistemas operativos). Si no es así, Tracker™ requerirá la instalación de Java™ 1.6 o una versión más nueva.

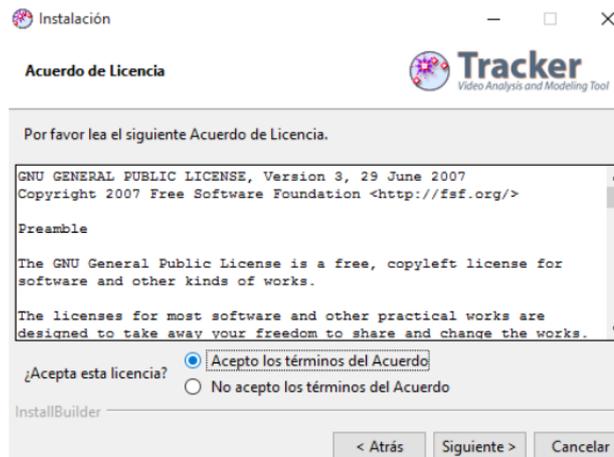
1.3 Instalación del programa

1.3.1 Se entrará en el enlace que proporciona su propia página web y se descargará el programa.

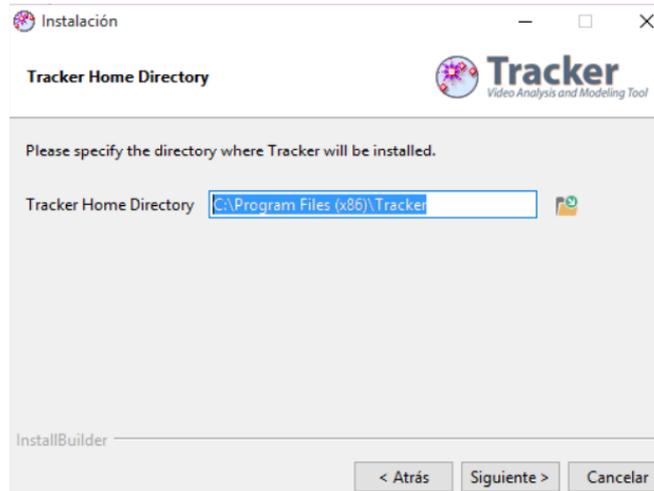
1.3.2 Una vez descargado, aparecerá la pantalla de bienvenida al proceso de instalación. Se pulsa **Siguiente**



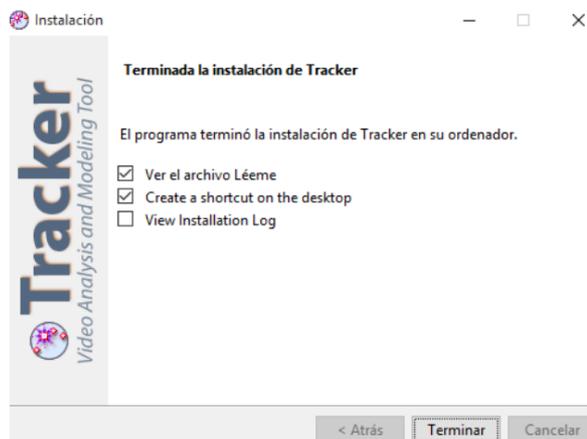
1.3.3 Se aceptarán los términos y condiciones y se pulsará **Siguiente**



1.3.4 Se creará por defecto la carpeta Tracker™ donde se destinará el programa y se pulsará **Siguiente**

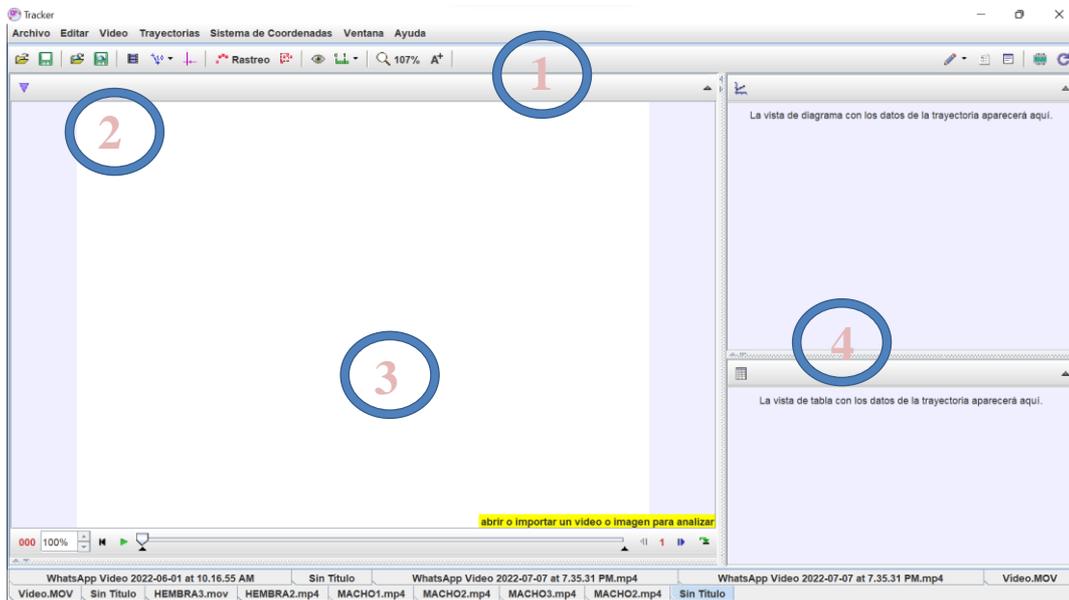


1.3.5 Aparecerá el final de la instalación en el que simplemente se debe pulsar **Terminar**



1.3.6 Ya está la instalación finalizada

1.4 Área de trabajo



Siendo:

1. Barra de menú
2. Solapas de exploración y atajos
3. Área de previsualización
4. Área de datos y resultados

1.5 Barra de menú

1.5.1 Archivo

Contiene las herramientas para abrir un archivo de video, archivos recientes, cerrar pestañas, grabar, importar, exportar, imprimir y salir.



1.5.2 Editar

Permite copiar imágenes, datos, objetos, deshacer y rehacer el trabajo realizado.



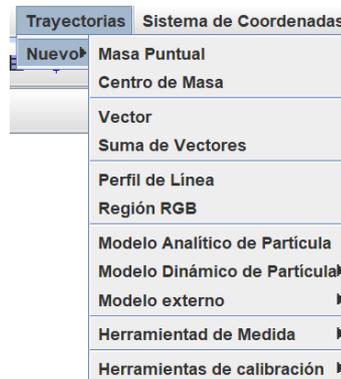
1.5.3 Vídeo

Permite importar un vídeo y pegar imágenes en él.



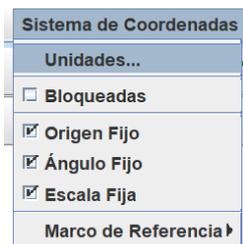
1.5.4 Trayectorias

Permite trazar trayectorias, desde una masa puntual, centro de masa, vectores, suma de vectores, y modelar analíticamente partículas.



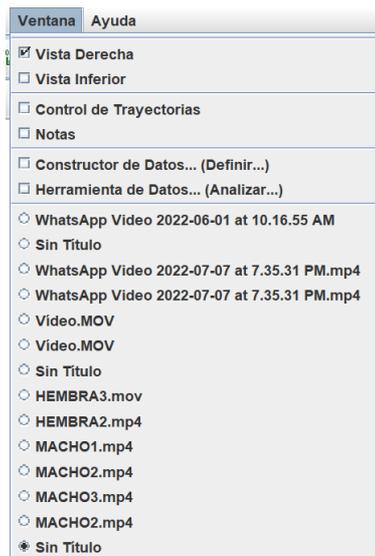
1.5.5 Sistema de Coordenadas

Permite dar unidades a un ángulo o zona determinada, mantener el origen, ángulo y escala fija, y determinar un marco de referencia



1.5.6 Ventana

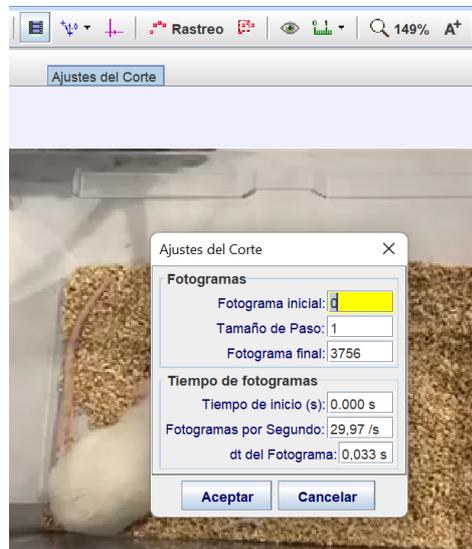
Permite elegir el formato de visualización de la hoja de trabajo.



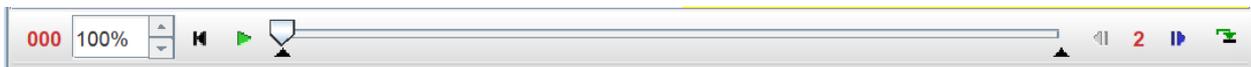
1.6 Procedimiento para el etograma

1.6.1 En primer lugar, se cargará el vídeo de la prueba en el programa.

- 1.6.2 En la opción Ajustes de Corte se fija el inicio y el fin del video ya que el programa permite que consideres los fotogramas que interesan estudiar. También se puede modificar el tamaño de paso, para señalar la cantidad de frames que se quieren saltar según lo que se requiera. En este caso se ha establecido 10 como intervalo de paso, que significa que se va a centrar atención en un fotograma de cada 10. Se ha decidido 10 porque si no son muchos fotogramas para analizar y la rata no se va a mover tan rápido como para perder su seguimiento continuo.



Todo lo anterior referido a los ajustes de corte pueden modificarse en la barra de debajo del área de previsualización. Esta es:



- 1.6.3 Como el programa permite escalar el sistema de coordenadas y el punto de origen, se pondrá este último en el centro de la jaula, tal y como se observa en la imagen.



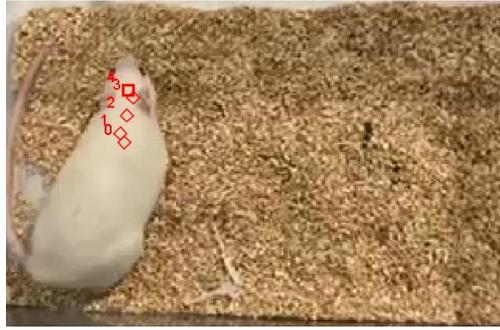
- 1.6.4 Para involucrar las medidas reales que tienen los objetos dentro del video, se creará una o dos varas de calibración que se colocarán en la posición que interesa establecer y se cambiará la medida por la real.



- 1.6.5 Una vez establecido el eje de coordenadas y las medidas reales, se procederá a definir el objeto que se va a capturar. En este caso interesará elegir “Masa Puntual”.



- 1.6.6 Se selecciona lo más parecido al centro de masa del objeto de estudio: se mantiene presionado “Shift” del teclado y dando clic en el objeto. De esta manera, una vez tomado el primer punto, el video se mueve cuadro a cuadro mientras se le asigna el punto.



Una vez obtenida la tabla con todos los datos adquiridos en el software, se exportará a Matlab™ a través de Excel™, para la lectura de todos los valores y la posterior adaptación en forma de gráfica de la cual se sacarán las correspondientes conclusiones.

8.2 Anexo 2: Código de Matlab™ para la adquisición de gráficas

Como se repetirá el mismo código para cada sujeto de experimentación, solo se pondrá el código ejemplo para el macho 3.

```
%Tiempo de acondicionamiento
xlsread('MACH03.xlsx');
v=ans(1:63,2);
t=ans(1:63,1);
figure(1)
plot(t,v,'-.-')
title('Posicion de la rata durante el tiempo de acondicionamiento');
xlabel('t(s)');
ylabel('Posición(cm)');

hold on
y=ans(1:63,3);
plot(t,y,'-.-')
hold off
legend('x','y')

xlsread('MACH03.xlsx');
v=ans(1:63,4);
t=ans(1:63,1);
figure(2)
plot(t,v,'-.-')
title('Velocidad de la rata durante el tiempo de acondicionamiento');
xlabel('t(s)');
ylabel('Velocidad(cm/s)');

%Estímulo de 55 kHz
xlsread('MACH03.xlsx');
v=ans(64:109,2);
t=ans(64:109,1);
figure(1)
plot(t,v,'-.-')
title('Posicion de la rata durante el estímulo de 55 kHz');
xlabel('t(s)');
ylabel('Posición(cm)');

hold on
y=ans(64:109,3);
plot(t,y,'-.-')
hold off
legend('x','y')

xlsread('MACH03.xlsx');
v=ans(64:109,4);
t=ans(64:109,1);
figure(2)
plot(t,v,'-.-')
title('Velocidad de la rata durante el estímulo de 55 kHz');
xlabel('t(s)');
ylabel('Velocidad(cm/s)');
```

```
%Tiempo de relajación 1
xlsread('MACHO3.xlsx');
v=ans(110:133,2);
t=ans(110:133,1);
figure(1)
plot(t,v,'--')
title('Posición de la rata durante el tiempo de relajación');
xlabel('t(s)');
ylabel('Posición(cm)');

hold on
y=ans(110:133,3);
plot(t,y,'--')
hold off
legend('x','y')

xlsread('MACHO3.xlsx');
v=ans(110:133,4);
t=ans(110:133,1);
figure(2)
plot(t,v,'--')
title('Velocidad de la rata durante el tiempo de relajación');
xlabel('t(s)');
ylabel('Velocidad(cm/s)');

%Estímulo de 8 kHz
xlsread('MACHO3.xlsx');
v=ans(110:133,2);
t=ans(110:133,1);
figure(1)
plot(t,v,'--')
title('Posición de la rata durante el estímulo de 8 kHz');
xlabel('t(s)');
ylabel('Posición(cm)');

hold on
y=ans(110:133,3);
plot(t,y,'--')
hold off
legend('x','y')

xlsread('MACHO3.xlsx');
v=ans(110:133,4);
t=ans(110:133,1);
figure(2)
plot(t,v,'--')
title('Velocidad de la rata durante el estímulo de 8 kHz');
xlabel('t(s)');
ylabel('Velocidad(cm/s)');

%Tiempo de relajación 2
xlsread('MACHO3.xlsx');
v=ans(204:242,2);
t=ans(204:242,1);
figure(1)
plot(t,v,'--')
```

```
title('Posicion de la rata durante el tiempo de relajación');
xlabel('t(s)');
ylabel('Posición(cm)');

hold on
y=ans(204:242,3);
plot(t,y,'.-')
hold off
legend('x','y')

xlsread('MACH03.xlsx');
v=ans(204:242,4);
t=ans(204:242,1);
figure(2)
plot(t,v,'.-')
title('Velocidad de la rata durante el tiempo de relajación');
xlabel('t(s)');
ylabel('Velocidad(cm/s)');
```
