

Tesis Doctoral

Estudio de la toma de decisiones en un invertebrado: elección del lado de escape ante un estímulo de peligro de aproximación dorsal

Molinas, Julieta

2015-06-18

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Molinas, Julieta. (2015-06-18). Estudio de la toma de decisiones en un invertebrado: elección del lado de escape ante un estímulo de peligro de aproximación dorsal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Molinas, Julieta. "Estudio de la toma de decisiones en un invertebrado: elección del lado de escape ante un estímulo de peligro de aproximación dorsal". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-06-18.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular.

**Estudio de la toma de decisiones en un invertebrado:
elección del lado de escape ante un estímulo de peligro
de aproximación dorsal**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de
Buenos Aires en el área: Ciencias Biológicas

Lic. Julieta Molinas

Director y Consejero de estudios: Dr. Daniel Tomsic.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neurobiología de la Memoria, IFIByNE-
CONICET. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos
Aires.

Buenos Aires, 18 de junio de 2015.

Título: “Estudio de la toma de decisiones en un invertebrado: elección del lado de escape ante un estímulo de peligro de aproximación dorsal”

Resumen

La comprensión de las bases neurales de la toma de decisiones es un reto importante en la neurobiología actual. Por la menor complejidad en sus comportamientos y sus cerebros, algunos invertebrados ofrecen buenas oportunidades para identificar e investigar principios neuronales subyacentes al proceso de toma de decisiones. En el cangrejo *Neohelice granulata*, por ejemplo, la actividad de neuronas cerebrales individuales frente a estímulos visuales que evocan claras respuestas comportamentales puede ser registrada intracelularmente en el animal vivo.

La presentación de un estímulo looming (imagen de expansión bidimensional correspondiente a un objeto que se acerca) desde un costado del animal evoca escapes que de forma muy predecible se realizan con dirección opuesta al estímulo. Sin embargo, ante un objeto que se aproxima exactamente desde arriba o looming dorsal (LD), el animal responde más tardíamente y su dirección de escape hacia uno u otro lado parece ser impredecible. Tanto la impredecibilidad del comportamiento como el retardo del inicio de la respuesta sugieren un proceso de decisión en la elección por el lado hacia el cual escapar. Esto, conjuntamente con las posibilidades de indagar en los mecanismos neuronales en que se sostiene al menos parte de ese comportamiento, estimularon el desarrollo de un paradigma para el estudio de toma de decisiones. En el transcurso de esta tesis, hemos desarrollado y luego utilizado tal paradigma para investigar diversos aspectos del proceso de la elección por el lado de escape que efectúa el animal. Los principales resultados muestran: a) una caracterización metódica del comportamiento de elección del lado de escape ante el LD; b) la persistencia en la elección de lado en decisiones sucesivas a nivel grupal o individual; c) los efectos de asimetrías visuales contextuales de variables tales como el grado de iluminación, polarización de la luz y formas de objetos, sobre la elección del lado de escape; d) la modificación de la elección por el lado de escape como resultado del aprendizaje (condicionamiento de evitación activa); e) la posible participación de un grupo particular de neuronas del cerebro del animal en el proceso de la elección por el lado de escape. Finalmente, formulamos un modelo sencillo de competencia interocular para la decisión del lado de escape que conforma y permite interpretar el conjunto de los principales resultados comportamentales y electrofisiológicos que hemos obtenido a lo largo de esta tesis.

Palabras claves: toma de decisiones, looming, visión, cangrejo, *Neohelice granulata*, neuronas de la lóbula, respuesta de escape.

Title: "Study of decision making in an invertebrate model: choosing the escape side to a dangerous stimulus with dorsal approach"

Abstract

Understanding the neural basis of decision-making is an important challenge in today's neurobiology. For the less complexity of their behavior and brains, some invertebrates offer good opportunities to identify and investigate underlying neural principles of the decision-making process. In the crab *Neohelice granulata*, for example, the activity of individual brain neurons evoked from visual stimuli that provokes clear behavioral responses, can be registered intracellularly in the live animal.

The presentation of a looming stimulus (two-dimensional image expansion corresponding to an object approach) from one side of the animal, evokes highly predictable escape runs directly away from the stimulus. However, when an object approaches straight from above or dorsal looming (LD), the animal takes longer to respond and the escape direction seems to be unpredictable. Both the unpredictability of the behavior and the delay to respond suggests that the escape direction involves a decision making process. This, together with the possibility to investigate the neural mechanisms that holds at least part of this behavior, stimulated the development of a paradigm for the study of decision making. In the course of this thesis, we developed and then used this paradigm to investigate various aspects of the election process for the side choice made by the animal. The main results show: a) a thorough characterization of side escape behavior to the LD; b) persistence in choosing side in successive decisions at group or individual level; c) the effects of visual contextual asymmetries of different variables (such as the degree of illumination, polarization of light and the shape of objects) on the choice of side escape; d) modification of the election by the side escape as a result of learning (active avoidance conditioning); e) the possible involvement of a particular group of neurons of the brain, during the process of side escape choice. Finally, we formulate a simple model of interocular competence for the decision of side escape choice that conforms and allows us to interpret all the major behavioral and electrophysiological results we have obtained throughout this thesis.

Keywords: decision making, looming, vision, crab, *Neohelice granulata*, lobula neurons, escape response.

Agradecimientos

Esta tesis va dedicada a mis amigas de exactas, a las 4G: Yai, Geo, Euge, Sol, ya que vivimos juntas este viaje académico. Estos últimos catorce años compartimos todo: infinitas horas de estudio, charlas y mate. En el medio nos atravesaron amores, desamores, éxitos y fracasos laborales, cambios de rumbo, dudas existenciales. Nos acompañamos siempre, nos abrazamos en los momentos más importantes... Sin ellas este hermoso viaje y uno de sus productos; esta tesis, no hubieran sido posibles.

No puedo dejar de agradecer profundamente:

A la UBA, por ser un espacio amplificador, estimulante, generoso y un segundo hogar. Por ofrecerme no una, sino dos profesiones.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por las becas otorgadas que me permitieron desarrollar esta tesis de doctorado.

A Héctor Maldonado por abrirme las puertas de su familia laboral: el LNM, y motivarme más de una vez en los veranos sofocantes dentro del setup, proponiéndome confiar en el “duende interno”, el de la curiosidad y la indagación científica.

A Daniel Tomsic, por la brújula científica, la confianza para dejarme probar experimentos, y por la comprensión que tuvo conmigo en momentos personales muy duros. Por la visión, dirección y paciencia.

A mis colegas del Laboratorio de Neurobiología de la Memoria, los “cangrejólogos”, por los almuerzos con charla, las tardes dulces y las meriendas con queso y vino. A Damián Oliva por enseñarme a usar el setup y por la colaboración permanente, en la programación y adquisición de los datos, por tener siempre un minuto; a Juli Sztarker y a Martín Beron de Astrada por aconsejarme y darme una mano electrofisiológica cuando fue necesario; a Violeta Medan por aplaudirme las primeras neuronas pinchadas, a Florencia Scarano y Fiorella Magani, por las charlas y los temas inéditos de Cacho Castaña estimuladores de cangrejos; a Ángel Vidal, además de las cuestiones técnicas, por recibirme todos los días con un mate y una sonrisa, y evitar que me electrocute más de una vez. A Vero Cocoz, Noel Federman y Yanil Hepp, por la amistad, los chistes y los vuelos compartidos dentro y fuera del lab. A todo el LNM por contagiarme la pasión que sienten por lo que hacen todos los días.

A mis compañeros del PPCI, por hacer mucho más ameno el día a día en microcentro. Un gracias aparte para Berni, por correcciones varias y por retarme para que concluya esta etapa y sea *doctora*.

A mi familia:

A mis padres, por darme la posibilidad inmensa de estudiar y poner el tiempo en lo que quise elegir, por darme alas, con tanto esfuerzo. Por hacerme sentir siempre que estaban orgullosos de mí, más allá de todo. Por decirme que podía.

A mis hermanos, Malu y Diego, que son los más hermosos compinches que me dio la vida.

A Mauro, por entrar como un tornado en mi vida, y enseñarme a ser más espontánea. Por apoyarme en mi profesión y en mis eternas búsquedas, por ser un hermoso compañero.

A mi familia política, los Spadaro-Ginoi, por hacerme sentir una de los suyos, y por tanta compañía entre comilonas.

A mis amigos, los de fierro (Diego, Gi, Coni, Vero, Laurita), por cuidarme tanto, por tolerar mis ausencias y por hacer lo posible para que pudiera concluir con este proyecto.

A mis sobrinxs, por recordarme lo importante.

De nuevo y finalmente, a mi madre, por ser todo: luz y fuerza y caos y amor. Por el abrazo eterno e infinito. Por ser mi principio.

INDICE

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Agradecimientos.....	4

SECCIÓN 1. INTRODUCCION GENERAL, HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

1. El estudio de la Toma de decisiones.....	10
1.1. Toma de decisiones basadas en lo perceptual y en la valoración de las alternativas	11
2. Modelos en minicerebros.....	14
2.1. Elección comportamental durante la evitación a predadores.....	16
2.2. Respuestas de cangrejos a estímulos visuales de peligro en la naturaleza.....	17
2.3. Caso particular de <i>Neohelice</i>	19
3. Rol de las neuronas gigantes de la lobula de <i>Neohelice granulata</i> en la respuesta de escape ante el estímulo looming.....	22
4. Hipótesis general y objetivos.....	26

SECCIÓN 2. MATERIALES Y METODOS GENERALES

1. Animales.....	28
2. Dispositivo Comportamental para estimular y medir la respuesta locomotora de <i>Neohelice</i>	30
2.1. Medición de la actividad locomotora.....	31
2.2. Estimulación visual y sincronización con la medición de la actividad locomotora.....	33
2.3. Estímulos utilizados.....	34
2.4. Protocolo experimental.....	37
3. Registro de la actividad fisiológica de las Neuronas Gigantes de la Lóbula.....	40
4. Análisis estadístico.....	47

SECCIÓN 3. RESULTADOS

CAPITULO 1. Decisión del lado hacia donde escapar

1. Desarrollo de un paradigma dicotómico para el estudio de la toma de decisiones	49
1.1. Determinación de parámetros óptimos y calibración de las condiciones.....	49
2. Elección del lado de escape en <i>Neohelice granulata</i>	51
2.1. Efecto de la dirección de aproximación del estímulo.....	51

3.	Sensibilidad a la posición del estímulo dorsal para la decisión del lado hacia el cual escapar.....	56
4.	Toma de decisiones en ensayos consecutivos.....	59
5.	¿Por qué los animales repiten la primera respuesta? Naturaleza de las elecciones consecutivas.....	62
5.1.	Efecto de las asimetrías morfológicas.....	62
5.2.	Lateralización en la Toma de decisiones.....	63
6.	Discusión.....	67

CAPITULO 2. Influencia de las claves contextuales y la percepción binocular sobre la elección del lado de escape

1.	Claves visuales que afectan la toma de decisiones.....	71
1.1.	Respuestas de escape ante distintos contextos visuales.....	71
1.2.	Actividad exploratoria en diferentes entornos visuales.....	80
2.	Experimentos de privación monocular.....	83
3.	Discusión.....	87

CAPITULO 3. Decisiones basadas en la experiencia previa. Plasticidad de la elección de lado de escape.

1.	Paradigma de condicionamiento aversivo.....	91
1.1.	Puesta a punto de las condiciones más adecuadas de entrenamiento.....	92
1.1.1.	Estímulos y respuestas involucradas en el condicionamiento de lado de escape.....	92
1.1.2.	Dispositivo de estimulación eléctrica dorsal.....	93
1.1.3.	Búsqueda de los parámetros más adecuados de condicionamiento.....	94
1.1.4.	Efecto del shock eléctrico sobre la actividad locomotora de los animales entrenados y modificación del dispositivo de estimulación eléctrica.....	97
2.	Condicionamiento de evitación activa.....	99
2.1.	Aprendizaje del cambio de lado de escape.....	99
2.2.	Actividad anticipatoria.....	102
2.3.	Efecto del lado de castigo.....	104
4.	Discusión.....	106

CAPITULO 4. Procesamiento de la elección de lado de escape: el papel de las neuronas gigantes de la lóbula.

1.	Introducción.....	110
----	-------------------	-----

2.	Métodos específicos.....	113
3.	Respuesta neuronal en función de la dirección de aproximación del estímulo.....	117
4.	Respuesta neuronal ante el looming dorsal en distintos contextos.....	118
5.	Discusión.....	125
SECCION 4. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN GENERAL.....		129
Bibliografía.....		139

Sección 1.

Introducción general,
Hipótesis y Objetivos.

1. El estudio de la Toma de decisiones

El cerebro es el órgano tomador de decisiones por excelencia, capaz de formar juicios sobre cuestiones tan simples como si un estímulo sensorial está presente, hasta cuestiones tan complejas como qué carrera académica elegir. ¿Cómo se forman estos juicios? El análisis de decisiones en campos tan diversos como la biología, la informática, la economía, la psicología y la política ha proporcionado información valiosa sobre qué se tiene en cuenta y cómo los factores se combinan para formar una decisión. Sin embargo, debido a que estas ideas se derivan del estudio del comportamiento, están inherentemente limitadas en términos de su capacidad para revelar el funcionamiento interno del cerebro durante la formación de decisión (Gold and Shadlen, 2001).

Los animales reciben una gran cantidad de información sensorial en sus vidas día a día, que utilizan para tomar decisiones. Sin entrar en el debate epistemológico sobre la definición de la capacidad para tomar decisiones, de forma operativa podemos definir a la toma de decisiones por parte de los animales como: procesos *que ocurren en el cerebro que permiten a los animales optar por una, entre dos o más alternativas posibles de comportamiento*. Estas decisiones incluyen la posibilidad de responder a un estímulo o ignorarlo. Si la elección es responder a un estímulo, el animal debe entonces elegir un comportamiento óptimo a partir de un repertorio de posibles alternativas.

Un ejemplo de un modelo animal invertebrado en el que se investigan procesos de toma de decisiones es el comportamiento de elección del lugar de oviposición de *Drosophila* (e.g. Yang y col., 2008). Como para todos los organismos, la producción de huevos es energéticamente costosa, por lo tanto la capacidad de sopesar las opciones para la puesta de huevos podría haber sido seleccionado para garantizar una mejor supervivencia de la descendencia en entornos de incertidumbre. Este tipo de comportamientos y de toma de decisiones, sin embargo, no requieren de una decisión rápida por parte de los organismos. De hecho, se ha observado que las hembras de esta especie, retienen los huevos si no encuentran un lugar apropiado para oviponer.

Para otros tipos de toma de decisiones, los animales deben reconocer mucho más rápidamente los objetos de su entorno y actuar en consecuencia. Cuando se trata, por ejemplo, de una decisión ante un estímulo de peligro, esta debe ser realizada en forma rápida y efectiva. Tal es el caso de los comportamientos de evitación de muchas especies ante estímulos peligrosos. Este tipo de comportamientos opera en un rango estrecho y podrían no detectar un estímulo amenazador a una distancia segura, si la decisión de iniciar el escape se realiza demasiado tarde.

Sin embargo, que estas decisiones deban ser tomadas en un rango acotado de tiempo, no implica que no sean decisiones complejas y dependientes de una diversidad de factores tanto externos como internos. En esta tesis se desarrolla el caso de una toma de decisión rápida.

1.1. Toma de decisiones basadas en lo perceptual y en la valoración de las alternativas.

Podemos generalizar dos formas de toma de decisiones: la toma de decisiones basada en lo perceptual y la basada en la valoración de las alternativas. La toma de decisiones basada en información perceptual es el acto de elección de una opción o línea de acción a partir de un conjunto de alternativas sobre la base de la evidencia sensorial disponible (Merten y Nieder, 2012). Por lo tanto, cuando los animales se enfrentan a este tipo de decisiones, la información sensorial debe ser interpretada en una representación del contexto, y traducida en una elección comportamental. Estas son formas relativamente simples de toma de decisiones, como pueden ser juicios acerca de la presencia o ausencia de un estímulo sensorial o la elección entre dos comportamientos incompatibles basada en la exposición simultánea a dos estímulos.

Por otro lado, la toma de decisiones basada en la valoración de las alternativas, resulta ser generalmente más compleja que la anterior. Las variables que contempla este tipo elección, además de la percepción de los estímulos a los que se encuentra expuesto el animal, incluye la experiencia previa de los animales con los estímulos sensoriales, las expectativas sobre el estímulo o el estado de comportamiento de los animales cuando se encuentran con dicho estímulo (Gold y Shadlen, 2007).

En situaciones reales, obviamente, la preferencia en la decisión tomada y las estrategias utilizadas deberían ser adaptativamente flexibles cuando el ambiente varía, o cuando los resultados de dichas acciones son diferentes. En este sentido, la toma de decisiones basada en la valoración de las alternativas, depende de resultados asociados a decisiones tomadas en el pasado. Sin embargo, la influencia que cada resultado pasado tiene en la próxima decisión aún no es clara (Behrens y col. 2007).

Así, dada la información sensorial y la valoración asignada a la misma, un organismo se ve enfrentado a la tarea de elegir una acción entre las opciones disponibles, basándose en los resultados esperados y los riesgos asociados a dichas acciones. En situaciones donde el riesgo es inherente a la toma de decisiones, se debe realizar la elección correcta frente a la incerteza de las consecuencias a largo término. Realizar la decisión “correcta”, tiene como objetivo obtener una meta comportamental, la máxima recompensa asociada a una acción. Este tipo de toma de decisiones se da gracias a la habilidad del cerebro de evaluar los posibles resultados de cada acción, como un prerrequisito para elegir y para cambiar adaptativamente las estrategias cuando los resultados no son los esperados (Sugrue y col., 2005; Behrens y col. 2007).

Una meta relativamente reciente de la neurociencia ha sido identificar los mecanismos neurales que están implicados en la toma de decisiones. Hay principalmente dos estrategias experimentales que se usaron para abordarla. La primera utiliza monos muy entrenados que realizan tareas complejas, por lo general de elección entre dos estímulos visuales. Se logran registrar elementos individuales de ciertas regiones del cerebro, mientras el mono realiza una tarea de toma de decisiones (e.g. Gold y Shadlen, 2001). Por un lado este abordaje tiene el beneficio de que los mecanismos son probablemente más comparables a los que realizan los seres humanos, pero la contracara es la complejidad del sistema estudiado, que hace muy difícil una caracterización completa del mismo.

El segundo enfoque hace uso de animales invertebrados que, aunque no realizan comportamientos tan complejos como los vertebrados, llevan a cabo decisiones fácilmente observables, que resultan convenientes para estudiar de manera detallada los mecanismos subyacentes. Los estudios sobre la toma de decisiones en los invertebrados se han centrado en elecciones conductuales entre comportamientos excluyentes (Kristan 2008; Palmer y Kristan,

2011). Por otro lado, en estos estudios se utilizan a menudo electrodos intracelulares y tinciones con colorantes sensibles al voltaje, que permiten caracterizar los roles de neuronas individuales identificadas en la toma de decisiones. La ventaja de este segundo enfoque es que los comportamientos son simples y las redes neurales que subyacen a menudo pueden ser bastante bien caracterizadas.

Otro enfoque utilizado mayoritariamente por la neurociencia cognitiva y que vale la pena destacar por utilizar una técnica no invasiva que permite el mapeo global de actividad cerebral de forma simultánea, son los estudios en humanos con resonancia magnética funcional (fMRI, por sus siglas en inglés). La fMRI es una técnica de imagen cerebral que permite a los científicos observar y medir el flujo sanguíneo en el cerebro, lo que indica de manera indirecta actividad en estas regiones, al mismo tiempo que la persona se encuentra realizando una tarea física y/o cognitiva. Sin embargo, existen importantes limitaciones espaciales y temporales que presentan estos instrumentos, que dificultan las interpretaciones a nivel del funcionamiento de circuitos neuronales.

Dado que la toma de decisiones es una habilidad que se encuentra necesariamente presente en todos los animales, y resulta más desarrollada en los animales de vida activa, resulta interesante abordar el estudio de la misma en modelos como los artrópodos. Durante la última década, la visión comúnmente aceptada de los artrópodos comportándose como autómatas ha sido profundamente revisada. Actualmente resulta evidente que estos animales tienen la necesidad y la capacidad de modificar su comportamiento con la experiencia. El aprendizaje es una capacidad de altísimo valor adaptativo que permite extraer la estructura lógica del mundo y que consiste en establecer relaciones con valor predictivo entre eventos contingentes en el ambiente, moldeando comportamientos adaptativos (Giurfa, 2007).

Debido a que en última instancia las decisiones se toman en circuitos neuronales, es importante contar con modelos en donde esos procesos se puedan estudiar a nivel de microcircuitos y células individuales. Hasta hoy, las investigaciones sobre toma de decisiones han utilizado diferentes diseños experimentales y se centraron en distintos tipos de decisión en función del sistema utilizado. A continuación, mencionaremos varios sistemas-modelo utilizados para estudiar la toma de decisiones en invertebrados.

2. Toma de decisiones en invertebrados. Modelos en minicerebros.

*"La complejidad de la retina de insecto es estupenda,
de hecho desconcertante, y sin precedente
en otros animales"*

*Santiago Ramón y Cajal,
"Recuerdos de mi vida". 1917.*

A Santiago Ramón y Cajal se lo describe como el padre de la neurobiología moderna. Gracias al perfeccionamiento del sistema de tinción de las células creado por Golgi, Ramón y Cajal pudo explicar con precisión la doctrina de la neurona, en la que se explicaba la estructura de esta célula y la sinapsis. En la frase citada más arriba, pone de manifiesto la complejidad de los sistemas sensoriales de los artrópodos, y su potencia para investigar las vías de procesamiento de la información visual.

Es difícil correlacionar directamente la actividad neuronal y la expresión del comportamiento y obtener información detallada sobre la organización neuronal del circuito, los mecanismos celulares, y la interacción entre los sistemas sensoriales y motores. Los invertebrados ofrecen la ventaja de ser sistemas más sencillos para estudiar las bases neuronales de distintos comportamientos, debido a que sus cerebros se componen de menos elementos que los de vertebrados. El aporte del uso de sistemas de invertebrados para la búsqueda de los mecanismos que subyacen a la toma de decisiones reside en la posibilidad de acceder fácilmente a dichas redes neuronales. En ciertos casos, estos circuitos se componen de neuronas grandes, altamente accesibles e identificadas, que pueden ser precisamente reconocidas de un animal a otro. Esto permite identificar las posibles neuronas candidatas, y probar directamente su papel en la toma de decisiones mediante la ablación de estas neuronas o mediante su retiro transitorio de la red (a través de su hiperpolarización). También resulta posible caracterizar su conectividad y organización anatómica con respecto a otras neuronas. Por supuesto, un sistema tan simple también tiene desventajas; una de las principales preocupaciones es que los mecanismos de toma de decisiones de esos comportamientos pueden no ser de aplicación general a los mecanismos que operan en comportamientos más complejos en los vertebrados (Kristan, 2008).

Por otro lado, la toma de decisiones a nivel comportamental se ha estudiado en diversos invertebrados, y los experimentos han demostrado que los invertebrados toman

decisiones que no siempre son simples y rígidas, sino que a menudo son el producto de cálculos cuidadosos de costo-beneficio (Lima y Dill, 1990; Chittka y col., 2009). En algunos modelos invertebrados los microcircuitos de neuronas donde ocurren tales decisiones resultan ser más fácilmente abordables, lo que ofrece la posibilidad de investigar principios neurocomputacionales de los procesos de toma de decisiones a nivel neurofisiológico (Herberholz y Marquart, 2012). Sin embargo, las descripciones de los mecanismos neurales que subyacen a esas decisiones comportamentales basadas en la valoración de las alternativas son poco frecuentes (Kristan y Gillette, 2007; Kristan, 2008).

En invertebrados hay diversos modelos clásicos en los que se ha estudiado la toma de decisiones a nivel neurofisiológico. Mencionaremos solo algunos estudios a modo de ejemplo. En el molusco marino *Pleurobranchaea*, se describieron diversas jerarquías comportamentales (Davis, 1979). Al animal se le presentaban dos estímulos: en presencia de cada estímulo de manera independiente, cada uno provocaba un comportamiento diferente. Sin embargo, los dos comportamientos a la vez eran incompatibles entre sí. Cuando se presentaban juntos los dos estímulos, un solo comportamiento podía ser evocado, por lo que el animal tenía que hacer una elección entre ambos. Davis (1979) interpreta que ciertas conductas son dominantes sobre otras. En la parte superior de la jerarquía está el escape a través del nado, que es dominante sobre los demás comportamientos. Más tarde, Gillette y col. (2000) demostraron que *Pleurobranchaea* puede realizar un análisis de costo/beneficio en la toma de decisiones. Un estímulo apetitivo presente cuando el animal está saciado induce comportamientos de abstinencia, y un estímulo aversivo puede provocar comportamientos de alimentación si el animal tiene hambre. Curiosamente, se encontró que el mismo estímulo provoca diferentes comportamientos en el animal si se altera el estado conductual del animal. Se propuso que el animal estaría realizando un juicio sobre el costo de atacar a una presa y de los beneficios, es decir, su necesidad de alimentarse.

En la sanguijuela medicinal, se estudió la elección entre el nado y el acortamiento del cuerpo (Shaw y Kristan, 1999). Ambos comportamientos utilizan el mismo conjunto de neuronas motoras y el acortamiento es dominante sobre la natación. Recientemente se ha propuesto que la toma de decisiones entre estos comportamientos se hacen en base a un código

combinatorio, en el cual el comportamiento elegido es el resultado de la combinación de diferentes neuronas activas o inactivas (Kristan y Gillette, 2007).

Otro modelo muy estudiado es el saltamontes americano (*Schistocerca americana*). Tiene como hábitat natural los matorrales del sur de América del Norte, y el ambiente arbolado que habita constituye un entorno muy desordenado que requiere estrategias efectivas para evitar colisiones. Estos animales poseen un sistema de detección de colisiones lo suficientemente eficiente para evitar predadores aéreos con gran éxito (Chan y Gabbiani 2013). Este comportamiento ha sido ampliamente estudiado, combinando aspectos comportamentales como neurofisiológicos. Los circuitos neuronales que median comportamientos anticolidión están bien definidos en *S. americana*, así como en especies estrechamente relacionadas *Schistocerca gregaria* (langosta del desierto) y *Locusta migratoria* (langosta migratoria) en la cual se han realizado extensas investigaciones (para una revisión, ver Fotowat y Gabbiani, 2011). Los mecanismos que subyacen a los comportamientos de escape mediante saltos ante estímulos que se avecinan (imágenes en dos dimensiones que se expanden simulando un objeto que se aproxima en curso de colisión con el animal), han sido los más estudiados (Fotowat y Gabbiani, 2007; Fotowat y col., 2011). Ante un estímulo looming (estimulo de expansión), cuando el mismo supera los 60°, este animal responde de manera balística con un salto y luego emprende vuelo (Fotowat y Gabbiani 2011). Se cree que la vía de la neurona detectora de movimiento gigante de la lobula (LGMD) y de su neurona postsináptica, detectora de movimiento descendente contralateral (DCMD), subyace a estos comportamientos (revisado en Chan y Gabbiani 2013).

2.1. Elección comportamental durante la evitación a predadores.

El procesamiento de información en los sistemas sensoriales y los comportamientos que guían, deben ser necesariamente comprendidos en el contexto de los estímulos comportamentalmente relevantes que un animal puede llegar a encontrar en su hábitat natural, por lo cual el estudio de la etología se hace imprescindible.

La habilidad de reconocer potenciales predadores y ejecutar comportamientos de evitación adaptativos es algo crucial para la supervivencia de la mayoría de los animales. En ese

sentido, los animales poseen una ventaja adaptativa si realizan respuestas antipredatorias con una intensidad y/o una precisión que está a la altura del riesgo de predación al que se enfrentan. Los animales que forrajean, por ejemplo, pueden reducir su mortalidad evaluando el riesgo de predación y reduciendo de esta manera su exposición a los predadores. Para esto, ajustan la intensidad de su comportamiento antipredatorio para compensar el nivel de riesgo. Estas respuestas de “sensibilidad al riesgo” son basadas a menudo en el tamaño del predador, pero también se ven influidas por el estado interno del animal o el contexto en el que se encuentra (Chivers y col. 2001).

2.2. Respuestas de cangrejos a estímulos visuales de peligro en la naturaleza.

Aunque es extremadamente difícil reconstruir el flujo de información que reciben los animales en su hábitat natural, hay condiciones en el campo y en el laboratorio que permiten obtener información muy valiosa. Esto puede lograrse únicamente con una comprensión de las tareas que deben resolver en la naturaleza y un dispositivo experimental que permita registrar y sincronizar las señales relevantes para el animal.

Los cangrejos, y en particular su comportamiento de evitación predatoria, resultan un modelo sumamente adecuado para el estudio simultáneo de las claves visuales y los comportamientos evocados por éstas. Estudios previos han mostrado que imágenes bidimensionales que se expanden simulando objetos que se acercan (en adelante, estímulos "looming") disparan respuestas de evitación en muchas especies (Hemmi y Tomsic, 2012; Chan y Gabbiani, 2013).

Los cangrejos violinistas usan claves visuales en comportamientos complejos de cortejo y para detectar a otros cangrejos que irrumpen en su territorio. Estos animales son la fuente de alimento de un número grande de aves predatorias que cazan con una amplia variedad de técnicas (Iribarne y Martinez, 1999; Land, 1999), y responden a estos predadores usando claves exclusivamente visuales (Hemmi, 2005a, b). En condiciones naturales se ven forzados a refugiarse de aves que pasan sobrevolando permanentemente. Esto representa una presión de predación intensa que determina la implementación de estrategias antipredatorias eficientes.

Uno de los comportamientos más estudiados en la especie de cangrejos *Uca* ha sido el de “*homing*”. Estos cangrejos deben a menudo defender su cueva contra coespecíficos que intentan usurparla retornando a la cueva cuando observan un posible intruso a menos de 20cm de la entrada (Hemmi y Zeil, 2003b; Hemmi y Zeil, 2003d). Los predadores naturales de los cangrejos *Uca vomeris* son los gaviotines de la especie *Gelochelidon nilotica*, los cuales realizan vuelos de "escaneo" regularmente sobre los lodazales, desplazándose a pocos metros sobre el nivel del suelo y a una velocidad de unos 3m/s. Cada vez que una de estas aves detecta un cangrejo lejos de su refugio extiende sus alas y realiza unas maniobras características, que culminan en un vuelo a alta velocidad dirigido hacia su presa (Land, 1999).

En particular su sistema de evitación a predadores se basa exclusivamente en claves visuales (Land y Layne, 1995; Hemmi, 2005a,b). Los cangrejos llevan sus ojos compuestos en largos pedúnculos por encima de su cuerpo. Cada uno de sus ojos cubre una vista panorámica de 360°, lo cual elimina cualquier necesidad de realizar movimientos dirigidos o de escaneo con los ojos. Los pedúnculos se mantienen en forma perpendicular a la línea del horizonte todo el tiempo. Una manera simple y efectiva que tiene *Uca* para distinguir depredadores peligrosos de perturbaciones de la misma especie es alinear el ecuador de los ojos de manera precisa con la línea del horizonte: todo lo que aparece sobre el horizonte en la retina debe entonces ser mayor que la altura del cangrejo, y por lo tanto una amenaza grave (Land y Layne, 1995). Resultados que complejizan esta estrategia sugieren que, aun habiendo considerando peligrosas a las señales que se encuentran por encima del horizonte visual, hay muchas señales que son ambiguas, pudiendo ser inofensivas o peligrosas (Tomsic y col., 1993, Smolka y col., 2011).

2.3. Caso particular de *Neohelice*.

El cangrejo *Neohelice granulata*, el modelo experimental de esta tesis, ha sido utilizado durante casi tres décadas para estudios de neurobiología del comportamiento utilizando diversos paradigmas (ver Figura 1). La mayoría de las investigaciones abordan el estudio de memorias visuales generadas por la presentación repetida de un estímulo visual de peligro que demuestra ser inocuo. Los abordajes han sido comportamentales, farmacológicos, electrofisiológicos, neuroanatómicos, optofisiológicos y moleculares y han descrito distintos aspectos de esa memoria, denominada Memoria Contexto-Señal (ver revisiones recientes en: Tomsic y Romano, 2013; Tomsic y Maldonado 2014).



Figura 1. Ejemplar macho de *Neohelice granulata*, cerca de su refugio.

En el hábitat natural de esta especie, los cangrejos son predados por gaviotas *Larus atlanticus* (Berón, 2003), y se ha observado que ante la presencia cercana de estas y otras aves, *Neohelice* suele responder escapando lateralmente, respuesta que ocasionalmente incluye el levantamiento de las quelas hacia el agresor. Esta respuesta de escape, más precisamente su modificación por entrenamiento, ha sido utilizada en el laboratorio para el estudio de neurobiología de la memoria (Tomsic y col., 1993, Tomsic y col., 1998; Pedreira y col., 2002; Pedreira y Maldonado, 2003). No obstante, la caracterización de la respuesta de escape propiamente dicha ha comenzado a ser abordada hace menos tiempo y aún continúa (e.g. Oliva y col., 2007; Oliva y Tomsic 2014; Scarano y Tomsic 2014; esta tesis).

En el uso de la respuesta de escape para el estudio de la memoria en *Neohelice*, el paradigma más ampliamente caracterizado es el de una *memoria visual*, que consiste en la reducción de la respuesta de escape ante un estímulo visual de peligro (EVP) que demuestra

ser inocuo como consecuencia de su presentación repetida sin consecuencias (e.g. Tomsic y col. 1993). Esta memoria se adquiere con un entrenamiento breve, perdura por un periodo prolongado, y depende del contexto (e.g. Tomsic y col. 1998).

Una característica destacable de este modelo, es la posibilidad de registrar intracelularmente la actividad de las neuronas mientras el animal se encuentra aprendiendo. Esto ha permitido identificar y caracterizar, fisiológica y morfológicamente, diversos tipos celulares involucrados en el procesamiento de la información visual en el cangrejo (Berón de Astrada y col. 2001; Berón de Astrada y Tomsic 2002). Experimentos iniciales en este modelo, mostraron que un grupo de neuronas visuales detectoras de movimiento (NDM, posteriormente rebautizadas LG, por *lobula giants*), frente a la presentación repetida del EVP, muestran un perfil de modificación de su respuesta notablemente similar al que se observa en la respuesta de escape a nivel comportamental (Tomsic y col. 2003).

Posteriormente, se indagó aún más en los distintos tipos de neuronas involucradas en esta respuesta de escape mediante experimentos anatómicos y electrofisiológicos (Sztarker y col. 2005, Medan y col. 2007). Recientemente se comenzó a investigar la evocación de la respuesta de escape ante objetos en trayectoria de colisión, de manera paralela al registro electrofisiológico que permiten combinar ambas aproximaciones para el estudio de este comportamiento (ver Figura 2, modificada a partir de Oliva y col. 2007).

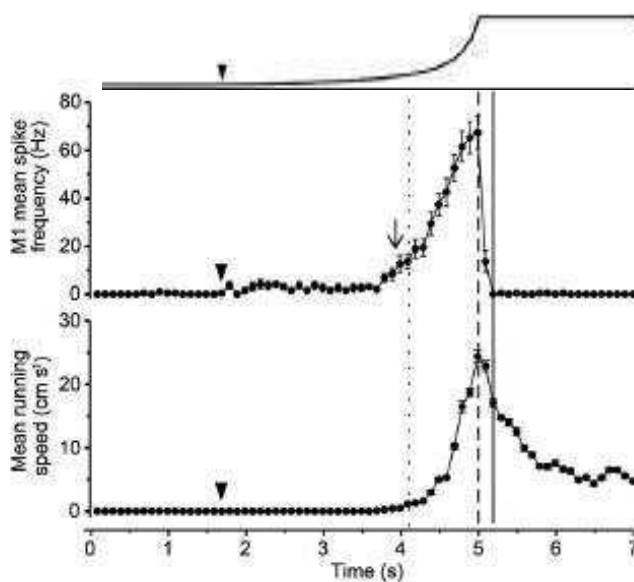


Figura 2. Respuesta de una neurona LG de un cangrejo enfrentado a un estímulo looming y correlación con la respuesta de escape. Arriba se muestra la dinámica del looming (con punta de flecha se indica el comienzo de la expansión). En el medio, el promedio de la respuesta de una LG ante varias presentaciones del estímulo, que se correlaciona temporalmente con la velocidad promedio de escape (adaptado de Oliva y col. 2007).

La combinación de estas aproximaciones: la evocación de la respuesta de escape ante objetos en trayectoria de colisión y la capacidad de realizar registros electrofisiológicos en el animal intacto, hacen de *Neohelice granulata* un modelo experimental muy adecuado y potente.

Se han investigado los parámetros del estímulo de colisión que gatillan la respuesta de escape ante estímulos que se aproximan desde los lados del animal (Oliva y col. 2007, Oliva y col. 2012). Ante dichos estímulos los animales escapan siempre en forma contralateral, alejándose del mismo. Sin embargo, en su primer estudio con estímulos looming, Oliva y col. (2007) muestran en un experimento que ante estímulos que se les aproximan directamente desde arriba, la mitad de los animales escapan hacia la izquierda y la otra mitad hacia la derecha (ver figura 3). Además, encuentran que esas respuestas de dirección impredecible, demoran más en iniciarse que las respuestas de dirección altamente predecible que se obtienen con los looming laterales. En base a esto, los autores especulan que la condición de incerteza que conlleva la aproximación directamente desde arriba, implica un proceso de decisión sobre la elección del lado hacia el cual escapar que demora el inicio de la respuesta. .

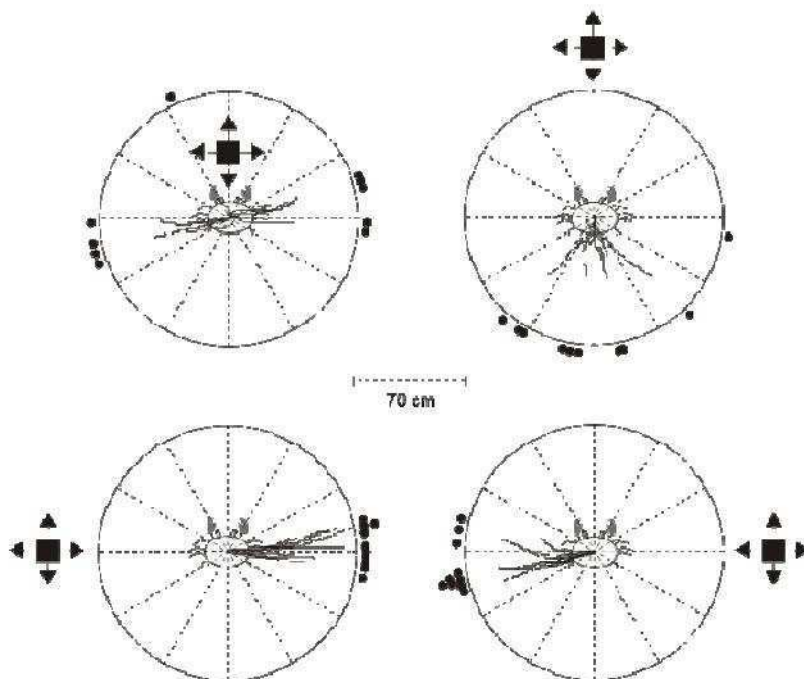


Figura 3. Respuesta de escape de *Neohelice granulata* ante distintas aproximaciones del estímulo looming. Se le presento a cada cangrejo (N=10), el estímulo desde uno de los monitores laterales (esquemas inferiores), dorsal (arriba a la izquierda) o frontal (arriba a la derecha). Los animales escapan de manera opuesta a la aproximación del estímulo, y en el caso del estímulo dorsal se observan escapes a ambos lados (extraído de Oliva y col. 2007).

Esto, junto con la identificación y posibilidad de estudiar neuronas involucradas en la respuesta de escape a estímulos visuales de peligro (ver más adelante), constituyen algunos de los motivos que dieron origen a este trabajo de tesis. Sin embargo, la respuesta de escape a un predador implica no sólo la percepción visual de movimiento del objeto sino una evaluación continua del contexto en el que se encuentra el animal. Por contexto entendemos factores tales como las variaciones estacionales, circatidales o circadianas, las densidades poblacionales, las características del ambiente, es decir, todos factores que pueden determinar mayor o menor presencia de predadores, de refugios, de alimentos, etc (Luppi y col. 2013; Palmer y Kristan, 2011; Sztarker y Tomsic, 2008; Hemmi y Tomsic, 2012). Estos factores son, en conjunto con las características propias del estímulo de peligro, determinantes de las decisiones que toman los animales al momento de elegir su estrategia de escape. Por ejemplo, en ausencia de un refugio cercano los animales tienden a huir en dirección contraria a la de aproximación del predador, pero si su refugio se encuentra cerca suelen escapar en tal dirección aun cuando ello implique dirigirse hacia el lugar desde donde se aproxima el predador (en cangrejos violinistas, Hemmi y Zeil 2003ab; en *N. granulata*, Hemmi y Tomsic, 2012).

3. Rol de las neuronas gigantes de la lobula de *Neohelice granulata* en la respuesta de escape ante el estímulo looming.

En el sistema nervioso de los cangrejos pueden reconocerse tres grandes centros: los lóbulos ópticos (cada uno dentro de un pedúnculo ocular), el ganglio supraesofágico y el ganglio torácico. Los aspectos del entorno visual relevantes para el animal se procesan en parte en los neuropilos ópticos que forman el lóbulo óptico, y se hallan conservados evolutivamente en los insectos y crustáceos (Nilsson y Osorio, 1998; Strausfeld y Andrew, 2011).

Cada ojo de *Neohelice granulata* se compone de alrededor de 7000 ommatidias, distribuidas alrededor de cada pedúnculo ocular, excepto por una zona estrecha de la cutícula en el lado medial del animal. El campo visual de cada ojo “abarca” casi todo el panorama que rodea el animal. Debajo de la retina se encuentran los 4 neuropilos ópticos: la lámina, la

médula, la lobula y la lobula plate (ver figura 4, panel izquierda). La organización retinotópica de los tres primeros neuropilos de *Neohelice* muestra fibras columnares intersectadas por capas de procesos tangenciales, mientras que el protocerebro lateral no muestra una organización estructural tan claramente definida (Sztarker y col., 2005). Tanto en crustáceos malacostracos como en insectos, los axones que conectan la lámina con la medula y la medula con la lobula forman un primer y segundo quiasma.

Estudios electrofisiológicos permitieron caracterizar y diferenciar anatómica y fisiológicamente cuatro grupos de neuronas gigantes de la lobula (LGs: del inglés lobula giants) que son sensibles al movimiento de objetos (Medan y col., 2007). Estas neuronas,

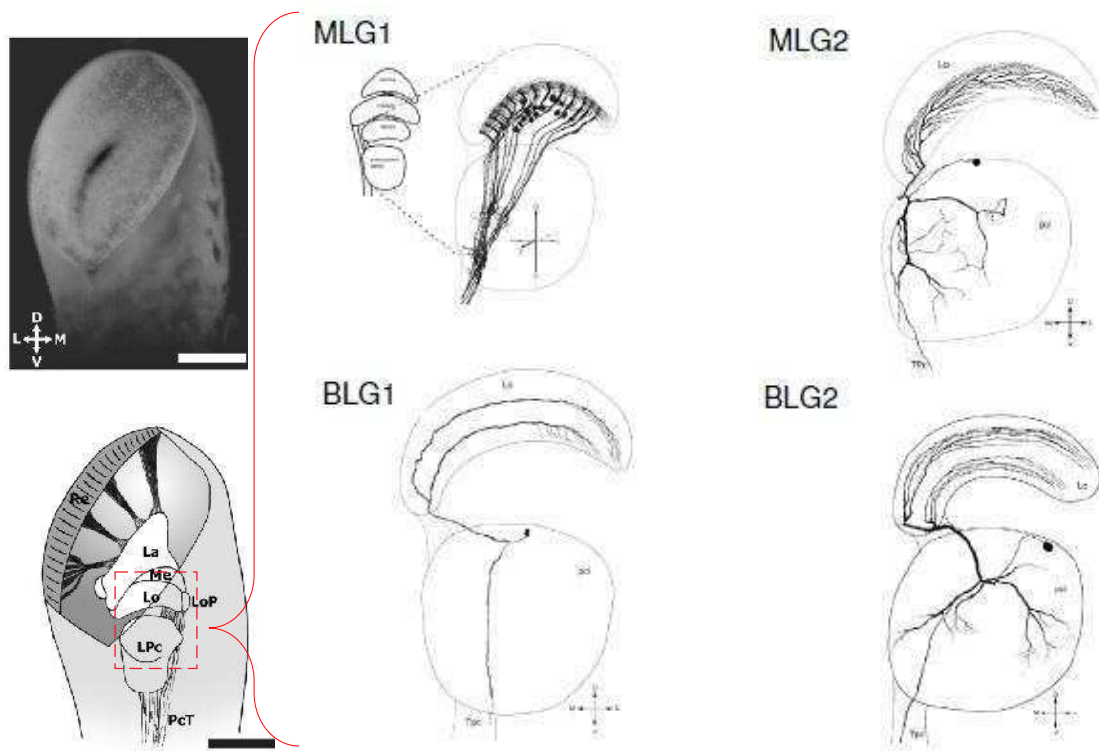


FIGURA 4. Ojo compuesto, neuropilos y Neuronas gigantes de la lóbula de *Neohelice granulata*. A la izquierda se muestra una vista frontal del pedúnculo derecho del cangrejo, y un esquema que muestra los lobulos opticos que contiene el mismo (Re, retina; La, lamina; Me, medula; Lo, lobula; LoP, lobula plate; LPc, Protocerebro lateral; PcT, tracto protocerebral; D, dorsal; V ventral; L, lateral; M, medial; A, anterior; P, posterior. escala de la barra = 500 μ m). A la derecha se muestran reconstrucciones de neuronas gigantes de la lobula (4 subtipos: MLG1, MLG2, BLG1 y BLG2), realizadas a partir de tinciones intracelulares (figura modificada a partir de Berón de Astrada y Tomsic, 2002; Medan y col., 2007).

además de responder a estímulos visuales en movimiento, muestran cambios plásticos ante repetidas presentaciones del estímulo.

Una gran cantidad de trabajos en el laboratorio han mostrado que las LG no son simples detectores de movimiento, sino elementos centrales que integran información binocular, procesan información multimodal y manifiestan cambios plásticos en su respuesta que duran más de 24hs (revisado en Tomsic y Romano, 2013; Tomsic y Maldonado, 2014). La participación de algunos de los tipos de neuronas LG en la respuesta de escape frente a estímulos que se aproximan desde los costados del animal ha sido explorada con cierto detalle (Oliva y col., 2007; Oliva y Tomsic 2012; 2014). Estos experimentos de laboratorio muestran que la respuesta de escape sucede de manera univoca hacia el lado opuesto al de aproximación del estímulo. Resultados más recientes muestran que ante un estímulo que se mueve tangencialmente a nivel de horizonte, el cangrejo ajusta continuamente su dirección de escape con relación a la posición del estímulo visual de movimiento, con un error de menos de 1 grado (Medan y col., 2015). En tales condiciones, conociendo la posición del estímulo, se puede predecir con un 100% de certeza cuál será la dirección de escape que adopte el animal. Por el contrario, ante estímulos looming que se aproximan directamente desde arriba del animal, se observó que los animales escapan hacia uno u otro lado. En tal condición, la elección por el lado de escape se torna a priori impredecible, lo que ofrece una situación experimental ideal para explorar los mecanismos que en última instancia llevan al animal a decidirse por escapar hacia uno de los dos lados.

Paradigmas de Toma de Decisiones entre dos alternativas (Two-Alternative Forced-Choice Task).

La elección rápida entre dos alternativas es representativa de muchos de los problemas que los animales enfrentan en sus ambientes naturales, como por ejemplo, si acercarse o evitar un estímulo novedoso (Bogacz y col., 2006; Uchida y Mainen 2003). En situaciones de riesgo, donde no hay demasiado lugar para una valoración exhaustiva de las posibilidades, los animales deben responder rápido y con precisión. Una elección categórica restringida a dos opciones, como puede ser la elección del cangrejo por el lado hacia el cual escapar en respuesta a un estímulo que se avecina directamente desde arriba (looming dorsal), sería una situación aparentemente sencilla donde poder indagar los factores que intervienen en una toma de decisiones. No obstante, en la naturaleza el cangrejo está expuesto a información visual sumamente variada y permanentemente cambiante. Recientemente, Hemmi y Tomsic (2012), han discutido cómo las condiciones del ambiente, como la luz, la temperatura y el contexto, afectan las decisiones comportamentales. Esta multiplicidad de variables que en el contexto natural suelen influir simultáneamente sobre las decisiones adoptadas por el animal pueden (aun introduciendo un cierto grado de artefactualidad) ser disecadas en el laboratorio, y así su influencia sobre las decisiones comportamentales pueden ser analizada por separado.

Como planteamos al comienzo, el aporte de la neuroetología es proveer un campo interdisciplinario para comprender las bases neuronales que controlan el comportamiento de los animales en su ambiente natural. Esto implica conocer no solo el comportamiento de los animales en situaciones complejas, sino también las bases neurales que dan cuenta de esos comportamientos. Dado que aún no es factible investigar la respuesta de las neuronas frente a estímulos naturales, como puede ser el ataque de una gaviota, el abordaje neurofisiológico hace necesario recrear aspectos de esos estímulos en condiciones de laboratorio, teniendo como requisito mínimo de validación el que los estímulos recreados evoquen respuestas similares a las observadas en la naturaleza (Hemmi y Tomsic 2012). A partir de allí, la posibilidad de realizar registros electrofisiológicos en *Neohelice*, frente a los mismos estímulos en condiciones análogas a las que es sometido para los estudios comportamentales en el laboratorio, brinda la posibilidad de investigar parte de los circuitos neuronales involucrados en el procesamiento de toma de decisiones.

Objetivo general

De acuerdo los antecedentes descriptos en la introducción, la impredecibilidad de la elección por el lado de escape del cangrejo ante un estímulo visual de peligro de aproximación dorsal constituye un modelo interesante para explorar aspectos y mecanismos de la toma de decisiones. El objetivo general de trabajo de esta tesis es investigar si una elección aparentemente gobernada por la incerteza está determinada por el efecto de variables poco aparentes, que pueden incluir desde sutilezas del entorno donde se realiza la elección, a las experiencias inmediatamente precedentes o a la misma historia de vida del actor de la decisión.

Objetivos específicos:

- Desarrollar un paradigma que permita estimular visualmente y medir en forma precisa la toma de decisiones ante un estímulo de peligro de aproximación dorsal. (Capítulo 1).
- Caracterizar la respuesta de elección de lado de escape del animal ante estos estímulos visuales (Capítulo 1).
- Analizar las variables que podrían estar afectando la elección de lado de escape (Capítulo 2).
- Estudiar la plasticidad de la toma de decisiones sobre el lado de escape, intentando modificar la primera elección (Capítulo 3).
- Caracterizar la respuesta de las LG ante el looming dorsal en distintos contextos visuales, y determinar su participación en dicho paradigma de toma de decisiones (Capítulo 4).

Sección 2.

Materiales y Métodos Generales

Aquí se detallan los dispositivos experimentales utilizados para la medición de comportamientos visuomotores y registros electrofisiológicos en *Neohelice granulata*, así como la metodología experimental implementada a lo largo de esta tesis. Los protocolos específicos de cada experimento son descritos en las secciones correspondientes.

1. Animales

*El barro negro que rodeaba el agua parecía como picado de viruelas.
Miles de agujeritos se apretaban en manadas unos contra otros.
Unos pocos cangrejos paseaban de perfil, como huyendo de un peligro.
Me pareció que el suelo debía sufrir como animal embichado.
Ricardo Güiraldes. "Don Segundo Sombra". 1926*

Para todos los experimentos realizados en esta tesis se utilizaron cangrejos machos de la especie *Neohelice granulata* (hasta hace poco *Chasmagnathus granulatus*, Dana 1851). La especie pertenece a la superclase Crustacea, clase Malacostraca, orden Decapoda, (Infraorden: Brachyura, Superfamilia: Grapsoidea; Familia: Varunidae). Los animales utilizados tenían entre 2,7 y 3,1 cm de ancho de caparazón y un peso medio de $17 \pm 0,2$ g.

Neohelice es un cangrejo terrestre eurihalino que habita las zonas costeras de Argentina, Uruguay y Brasil y se distribuye en los bancos de limo mesolitoral y supralitoral de la zona de transición entre agua dulce y marina (figura 5).

Los animales fueron colectados en las rías de San Clemente del Tuyú, Buenos Aires, Argentina, transportados al laboratorio y alojados de a 20 como máximo, en cubas plásticas de 35x48x27 cm. Estas se llenaron con 2 cm de agua de salinidad=10-14 ‰, preparada con *hw-Marinemix* (*Marinemix, Cristal Sea, USA*) a un pH de 7,4 a 7,6.

En el laboratorio, las cubas plásticas se conservaron en cuartos con un ciclo de luz-oscuridad de 12h:12h (las luces se prendían 8 AM) a una temperatura entre 22-24°C. Los experimentos fueron realizados entre las 9.00 y las 20.00 hs, entre los 2 y los 10 días de la llegada de los animales al laboratorio.

Previo a cada experimento, se realizaron chequeos sobre el estado general del grupo de animales a utilizar (dando vuelta al animal y observando el tiempo que le llevaba volver a su posición normal), descartando los animales que no se encontraban en condiciones saludables. Además se descartaron aquellos animales que tuvieron extremidades faltantes o un exceso de cirripedios en su caparazón. Con estos criterios nunca se descartó más allá de un 5% de los animales traídos al laboratorio.



Figura 5. Hábitat de *Neohelice granulata*, en la playa de San Clemente del Tuyú, Buenos Aires. Los cangrejos se pescan cada 15 días. En la playa se los puede observar deambulando, o cerca de sus cuevas.

Ventajas y desventajas de utilizar animales de poblaciones naturales.

Los especímenes de *Neohelice granulata* con los que trabajamos en el laboratorio provienen de poblaciones naturales, y se mantienen en laboratorio. Trabajar con este tipo de modelo representa una ventaja, en el sentido en que resultan modelos ideales para investigar temas de neurofisiología con una aproximación de fisiología ecológica. Este abordaje examina los atributos fisiológicos de una especie y los interpreta en el contexto de su entorno natural o su nicho ecológico (Feder, 1987). Por otra parte, trabajar con animales traídos de poblaciones naturales, implica obtener una mayor variabilidad interindividual. Con el objetivo de obtener resultados representativos de las poblaciones reales (naturales) repetimos los experimentos con distintas traídas de animales.

A su vez, en cada traída diferente de animales, se hacían controles para descartar que el comportamiento de los animales se alejara mucho de los valores promedio. Esto podía deberse a factores de stress ambiental en la época en que hubieran sido capturados los animales (clima, alimento, época reproductiva o de predación, etc), o que hubiera habido algo fuera de lo común durante la traída de los animales al laboratorio (malas condiciones en el traslado de los animales, algún animal enfermo o en mal estado en las cubas donde se guardaban, etc). Para minimizar todas estas fuentes de variabilidad, los animales eran elegidos de cubas diferentes para cada experimento, y en todos los casos se les hacían las pruebas habituales para verificar que estuvieran en buen estado. Luego, los datos individuales eran analizados y se descartaban los animales que no superaban un mínimo de destreza motora, sin superar con estos criterios más que un 5% de animales descartados.

2. Dispositivo comportamental para estimular y medir la respuesta visuomotora de *Neohelice granulata*.

El dispositivo experimental utilizado para registrar la actividad locomotora de los animales en todos los experimentos comportamentales de esta tesis, fue diseñado y construido en nuestro laboratorio y es llamado coloquialmente la *crabola*. Esta consiste esencialmente en una esfera de telgopor de 16 cm de diámetro, que flota sobre un recipiente con agua. En cada experimento, el animal se ubica sobre la esfera a la que puede hacer girar y rotar libremente (Ver Figura 6).

En este dispositivo, el animal se encuentra en una posición fija, sostenido a través de una vara de poco peso en la parte dorsal de su caparazón, la cual se introduce dentro de una guía metálica posicionada verticalmente sobre la esfera. Dado que tanto la vara como la guía tienen sección cuadrada, el animal no puede rotar sobre su propio eje. Sin embargo, la vara permite el deslizamiento hacia arriba y abajo dentro de la guía, con muy poca fricción, permitiéndole al animal sentir su propio peso y así tomar su postura natural. Cuando el cangrejo se desplaza, lo hace rotando la esfera. Para evitar desplazamientos horizontales, se le colocaron a la esfera de poliestireno dos láminas flexibles de plástico, colocadas a 90° entre sí, y dos sensores ópticos colocados ortogonalmente. Los sensores cuentan con su sistema de

lectura óptica que permite registrar correctamente los movimientos de la esfera. Los datos de los mismos son adquiridos cada 16,7 ms.

Finalmente, todo el dispositivo se encuentra rodeado por 5 monitores, cuatro ubicados lateralmente y uno dorsalmente. (Philips 107T, de 32cmx24cm). Por último, una cámara web acoplada a un sistema cerrado permitió observar desde un monitor externo, todos los movimientos del animal desde el inicio del experimento.

2.1. Registro de la actividad locomotora. Adquisición y procesamiento de los datos.

En cada experimento, a medida que el animal camina sobre la esfera durante la actividad exploratoria o cuando corre en respuesta a algún estímulo, los movimientos de la esfera son registrados con dos sensores ópticos ubicados en el plano ecuatorial de la misma, y leídos por dos computadoras que denominaremos PC1 y PC2 (ver figura 6, panel II). La PC1 adquiere los datos de desplazamiento en el eje Y (antero-posterior al animal) y la PC2 posee el software necesario para adquirir los datos del desplazamiento en el eje X (transversal al animal). Con los desplazamientos medidos por los dos sensores ópticos, pudimos reconstruir la trayectoria locomotora del animal en dos dimensiones.

Cada vez que el cangrejo quiere desplazarse, produce fuerzas horizontales que pueden desplazar la esfera impidiendo el contacto de la misma con el sensor óptico. Esto produce la pérdida de lecturas. Para evitar este problema, se utilizaron dos láminas flexibles ubicadas en el lado contrario a cada sensor (ver figura 6, panel II). Gracias a la presión que ejercen las láminas flexibles, la esfera se mantiene siempre en contacto con los sensores ópticos, y los registros de los desplazamientos resultan continuos. Para disminuir aún más el rozamiento entre los sensores ópticos y la rotación de la esfera de telgopor, la superficie de los sensores ópticos fue recubierta por una lámina de acetato transparente. Esto impide el contacto del sensor con la superficie mojada de la esfera y además reduce el rozamiento entre la esfera y el sensor.

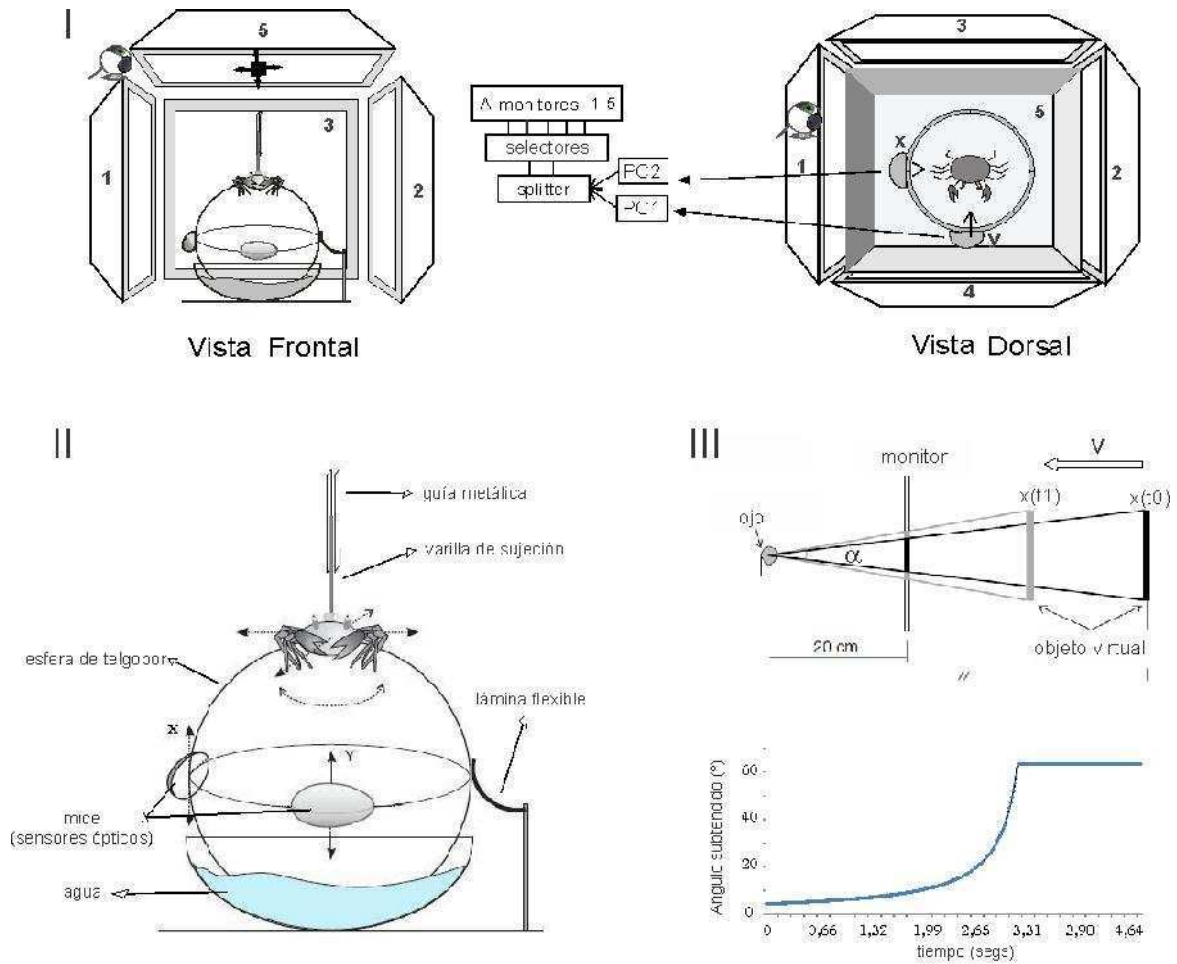


Figura 6. Dispositivo experimental de registro de la actividad locomotora de *Neohelice*. Panel I. Dispositivo comportamental, visto de frente (no se muestra el monitor frontal) o visto de arriba (no se muestra el monitor dorsal). Panel II. Detalle del dispositivo donde se mide el comportamiento locomotor del animal, con los sensores que registran los movimientos de la esfera generados por el cangrejo. Panel III. Arriba se muestra el estímulo *looming*, consistente en un cuadrado negro que se expande simulando un objeto que se aproxima directamente hacia el animal. En la figura se muestra el objeto virtual correspondiente al *looming* a dos tiempos distintos. En negro se muestra la condición inicial y en gris un tiempo intermedio luego de comenzar la aproximación. También se muestra la proyección de los tamaños del objeto en esos tiempos que se representa a nivel de la pantalla. Abajo se observa la representación gráfica del tamaño aparente del objeto como lo observa el cangrejo a medida que se acerca. La dinámica de expansión es la correspondiente al *looming* utilizado en este trabajo, y que corresponde a la simulación de un objeto de 70 cm que se acerca de una distancia de 10 m a una velocidad constante de 285cm/s. es el ángulo total subtendido por el objeto en el ojo del cangrejo y varía en el tiempo para un estímulo que se acerca. Para más detalles ver Oliva y Tomsic (2012).

A medida que el animal inicia su actividad locomotora, provoca la rotación de la esfera. Esas rotaciones son leídas por los sensores en X e Y. Si bien los datos son adquiridos en unidades de pixeles/ms, convertimos mediante una calibración simple estos valores a unidades de cm/s midiendo la cantidad de pixeles acumulados al desplazar la esfera un número conocido de cm en todas direcciones.

La trayectoria, velocidad, distancia recorrida y otras características de la respuesta de escape fueron luego analizadas a partir de la sincronización e integración de los datos adquiridos por ambos sensores ópticos.

2.2. Estimulación visual y sincronización con la medición de la actividad locomotora.

El animal, posicionado en la esfera que se encuentra dentro de dispositivo que detallamos más arriba, está rodeado por 5 monitores (Philips 107T, 17", de tasa de refresco de 60Hz a una resolución de 800x600 píxeles), que poseen además laminas antirreflex puestas por delante de los monitores previniendo la aparición de reflejos que podrían estimular de forma no controlada al animal. Se programaron los estímulos con un software (Presentation 5.3, Neurobehavioral Systems, Albany, USA) que permite sincronizar la presentación de los estímulos visuales con la adquisición de los datos a través de los sensores ópticos. Se optó por este programa ya que, además de su versatilidad para la programación de distintos estímulos, evita que el sistema operativo de la máquina interrumpa la proyección de las imágenes, asegurando la precisión temporal de la estimulación y los registros. El programa estaba instalado en ambas PC y aplica cada 16.7ms (tasa de refresco de los monitores) una imagen distinta. Esta tasa de refresco está por encima de la frecuencia de fusión (*flicker fusion frequency*) del sistema visual de los cangrejos, que es de menos de 50Hz. (Layne y col., 1997). La plataforma de este software nos permite programar con gran versatilidad los estímulos visuales necesarios, así como disparar pulsos TTL, utilizados por ejemplo para comandar estímulos nociceptivos (shock eléctrico) en algunos experimentos.

El comportamiento de los animales, además de ser cuantificado en la manera ya descrita, fue en todos los casos monitoreado a través de una pequeña cámara ubicada dentro

del dispositivo, que se encuentra conectada a un pequeño monitor ubicado fuera del mismo. Estas observaciones permitieron, además de aumentar la confianza en las mediciones automatizadas, obtener datos sobre aspectos de la conducta que no podían ser registrados por los sensores, tales como la existencia de respuestas defensivas agresivas como el levantamiento de las quelas ante ciertos estímulos.

Respecto a la actividad locomotora, nos interesaba medir la trayectoria, la distancia y la velocidad, entre otros parámetros de la respuesta de escape del animal. Para esto, una vez finalizado el experimento, las matrices de datos de trayectoria recorrida en cada eje (asociadas a cada PC) eran guardadas en archivos individuales. Luego, un programa desarrollado en Matlab, que toma los datos registrados por ambos sensores junto con las señales de tiempo, sincronizaba las lecturas de los mismos, permitiendo así una reconstrucción de los intentos de desplazamientos del animal sobre la esfera.

Para más detalles acerca del funcionamiento del dispositivo ver Oliva y col. 2007.

2.3. Estímulos utilizados.

Los estímulos visuales que programamos y utilizamos para generar un contexto visual virtual alrededor del animal, variaban según el tipo de experimento. En algunos casos, nos interesaba evaluar la actividad exploratoria de los animales, con lo cual un fondo virtual estático era presentado mientras los animales se desplazaban sobre la esfera. En la mayoría de los experimentos, sin embargo, los animales eran desafiados con el estímulo *looming* proviniendo de alguno de los monitores, mientras los otros presentaban algún fondo estático.

La batería de estímulos que se utilizaron durante esta tesis incluye:

- *Estímulos virtuales de aproximación o estímulos looming*

Los estímulos de expansión conocidos en la literatura en inglés como estímulos *looming* desencadenan una robusta respuesta de escape en todos los cangrejos (Oliva y col., 2007). El que utilizamos en los experimentos de esta tesis consistió en un cuadrado negro que se expande sobre un fondo blanco, simulando un acercamiento directo hacia el animal de un

objeto de 70 cm, desde una distancia de 10 m a una velocidad constante de 285 cm/seg (Figura 5). Cabe notar que esta definición del estímulo es arbitraria, ya que otras combinaciones de tamaño, velocidad y distancia podrían generar expansiones idénticas para el animal (Oliva y Tomsic, 2007). Por ejemplo, un objeto de 5 cm acercándose desde 70 cm de distancia a 20cm/seg no puede ser distinguido de otro objeto de 10 cm aproximándose desde 140 cm a 40 cm/seg únicamente en base a la dinámica de expansión. A pesar de esa incerteza, el animal todavía podría estimar el tiempo hasta la colisión: esa información puede ser extraída de la dinámica de expansión y es independiente de los parámetros que la determinan. De hecho, si el objeto se desplaza a velocidad constante, la dinámica de expansión es función del cociente entre el tamaño del objeto y su velocidad de aproximación (Gabbiani y col., 1999).

La programación del estímulo se realizó tal como se explica detalladamente en Oliva & Tomsic (2012). El mismo inducía una fuerte respuesta de escape en el animal en el sentido contrario al de aproximación, ya que se presentaba como un estímulo visual peligroso que se acercaba directamente hacia él. En la posición estacionaria inicial, la imagen subtendía un ángulo de 4° y se expandía durante 3.23 s hasta cubrir casi la totalidad de la pantalla (subtendiendo 62° de ancho y 62° de alto).

Independientemente de su tipo, todos los estímulos permanecían estacionarios al menos 2 minutos antes de comenzar a moverse.

- *Fondos lisos, Polarización de la luz y Objetos estáticos.*

En el caso de las figuras estáticas, los estímulos se presentaban en los monitores laterales en algunos experimentos, y eran objetos virtuales fijos de color negro sobre fondo blanco. En otros casos la luz blanca proveniente de los monitores se polarizó con filtros en distintas orientaciones (a 90° y/o a 0°, respecto del plano horizontal).

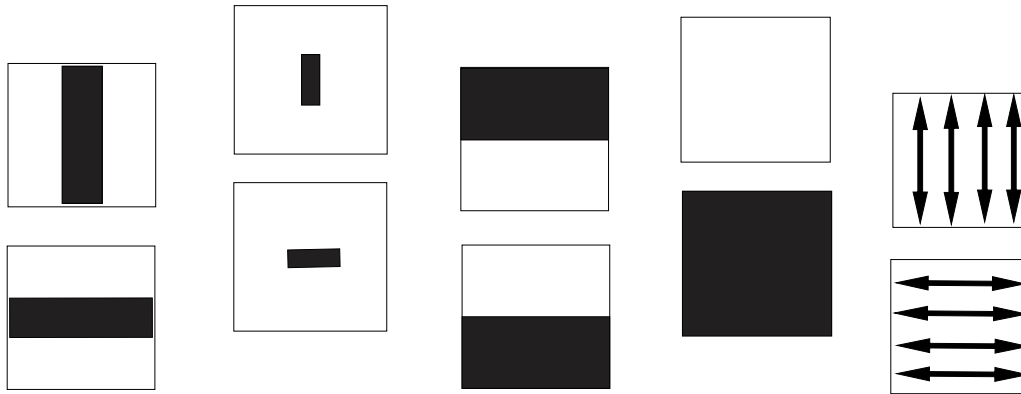


Figura 7. Pares de estímulos utilizados en los experimentos como contextos visuales. De izquierda a derecha se muestran los pares de estímulos presentados desde los monitores laterales. Se utilizaron barras verticales u horizontales de distintos tamaños, franjas negras que ocupaban la mitad superior o inferior del monitor, fondos lisos blancos o negros, y filtros para polarizar la luz proveniente de los monitores con orientación a 0° y a 90° .

- *Estímulos nociceptivos.*

En algunos experimentos de condicionamiento, descritos en el capítulo 3, se utilizaron pulsos de shocks eléctricos de intensidad leve a moderada (desde 9 a 24 volts), con distintas duraciones. Los mismos eran pulsos cuadrados de corriente, que se aplicaban sobre el caparazón del animal o directamente en la hemolinfa con el objeto de ser utilizados como estímulo aversivo. La corriente eléctrica era proporcionada por un generador con control de tensión y duración, el que era activado a través de un pulso TTL cuyo tiempo se programaba con el software previamente mencionado. Cabe aclarar que las tensiones utilizadas no afectaban de forma observable el estado de salud del animal puesto que, luego de los experimentos, los mismos reanudaban su actividad en forma normal.

En términos generales, las diferentes variantes de estimulación que se usaron en el dispositivo comportamental incluyeron:

- 1) Variar la dirección de donde proviene el objeto en trayectoria de colisión. El estímulo looming era presentado en distintos monitores, lo cual se seleccionaba desde afuera del dispositivo mediante los “selectores” (ver figura 6).

- 2) Variar la posición del estímulo en un mismo monitor. En algunos experimentos se descentro la posición del estímulo de expansión. Esto se lograba mediante programación con el software utilizado.
- 3) Presentación de objetos puntuales o fondos oscuros en los monitores laterales (fig. 7). Estos podían ser programados en la computadora, o elaborados a partir de cartulina opaca pegada en los monitores laterales.
- 4) Polarización de la luz emitida por los monitores. Se colocaron filtros que polarizaban la luz emitida por los monitores en un único plano. Los filtros se colocaron de forma tal de polarizar la luz a 90 o a 0 grados respecto del plano horizontal (fig. 7).
- 5) Aplicación de estímulos nociceptivos (leve shock eléctrico). Se aplicaron pulsos de duración e intensidad controlada a uno u otro lado del cefalotórax del animal, utilizando un dispositivo en forma de arco conteniendo electrodos de estimulación.

El dispositivo ofrece la posibilidad de estimular visualmente al animal con gran versatilidad. Cada monitor tiene asociado por fuera del dispositivo, un selector (ver figura 6) con el que podemos decidir enviar la imagen Estímulo (por ejemplo el estímulo *looming*) o la imagen Contexto (fondos estáticos mostrados en fig. 7) a cada uno de los monitores. Otra facilidad que ofrece el dispositivo es otro selector que permite apagar o prender cada uno de los monitores en forma individual. Estos selectores se ubican fuera del dispositivo, permitiendo realizar cambios de los estímulos visuales sin perturbar al animal. Así, por ejemplo, el animal puede ser estimulado con un *looming* proveniente del monitor derecho, (estando el resto de los monitores con fondo blanco) y en un ensayo siguiente estimularlo con un *looming* proveniente del monitor dorsal.

2.4. Protocolo experimental

Antes de comenzar cada experimento, se comprobaba el estado general de los animales a utilizar (explicado más arriba). Para minimizar el efecto estresante del manipuleo sobre el animal, luego de pegarle la varilla de madera en la parte dorsal, los animales eran individualizados en frascos y dejados en penumbras en la habitación del dispositivo

comportamental durante 10 minutos. A continuación, el animal era colocado sobre la esfera otros 10 minutos, para que pudiera explorar el sustrato novedoso y desplazarse sobre la misma, con los monitores izquierdo, derecho y dorsal apagados, al igual que el resto que se mantuvo siempre apagado (“Pre-ensayo” en Figura 8). Una vez transcurrido este tiempo de adaptación se daba inicio a la estimulación y el registro de la actividad locomotora.

Los ensayos en una situación control típica tenían una duración de 2.47 minutos del entorno estático donde algunos animales exploraban con una caminata lenta y luego generalmente se quedaban en reposo sobre la esfera (“Fase exploratoria” hasta el inicio del escape en Figura 8), hasta que el looming iniciaba la expansión y se producía el escape.

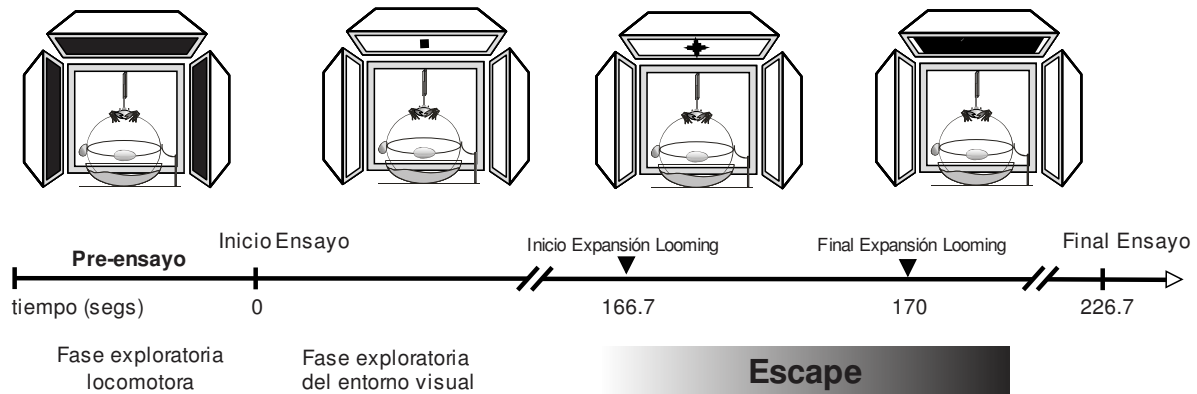


Figura 8. Protocolo experimental utilizado durante todos los experimentos. En cada ensayo en el que se exponía a un cangrejo al estímulo looming, existía una fase en oscuridad total en la cual el animal exploraba con una caminata sobre la esfera. Luego, se encendía el contexto visual con la configuración deseada, y unos minutos después el estímulo comenzaba a expandirse, hasta quedar en su máximo tamaño. Si el experimento constaba de más de un ensayo, la dinámica comenzaba nuevamente desde el cero.

Luego del final de cada ensayo, podía volver a iniciarse otro ensayo en forma inmediata (lo que implica un IEE (intervalo entre ensayos) de 3,77 min. entre las estimulaciones con el looming), o finalizar allí el registro si se trataba de un único ensayo, según la programación realizada para cada experimento. El tipo de estímulo utilizado en cada ensayo también podía variar según la programación.

Criterios para la evaluación de la Respuesta de Escape

En primer lugar, a partir del monitoreo en tiempo real de la respuesta comportamental desde la cámara externa al dispositivo, se registró para cada animal, en una planilla, la respuesta evocada por el looming. En estos registros se consignaba la dirección e intensidad cualitativa del escape, como así también eventuales respuestas de inmovilidad (freezing) o despliegues defensivos de las quelas.

La intensidad de la respuesta de escape fue cuantificada como la distancia recorrida en el eje transversal al animal durante un intervalo de tiempo que comienza con el inicio del movimiento del estímulo y finaliza 2 segundos después de que éste ha terminado su expansión. Esto es porque cuando analizamos la dinámica de los escapes individuales encontramos que la intensidad máxima de la respuesta de escape ante el looming dorsal sucede casi al final de la expansión. De esta manera, tomando dos segundos más luego de finalizada la misma, incluimos el pico máximo de escape del animal durante la respuesta al looming.

Solo se consideraron los escapes de los animales que superaran en 3 cm la distancia acumulada sobre su eje transversal durante el intervalo de tiempo antes mencionado. Una respuesta locomotora menor a esta distancia se consideró una respuesta de tipo “freezing”.

Las velocidades instantáneas se calcularon a partir de ventanas de distancia recorrida cada 160 ms. Por último, para el cálculo de latencias de escape, teniendo en cuenta los umbrales utilizados en trabajos anteriores del laboratorio (Oliva y col., 2007), consideramos que la respuesta comienza cuando el cangrejo aumenta su velocidad por encima de 1.5 cm/seg.

3. Registro de la actividad fisiológica de las Neuronas Gigantes de la Lóbula.

Preparación electrofisiológica

Una de las ventajas de utilizar a *Neohelice* para el estudio de las bases neurofisiológicas que subyacen a algunos comportamientos visuales es la de poder registrar de manera intracelular la actividad de neuronas centrales identificadas, en un animal vivo, entero y no anestesiado, mientras percibe los estímulos visuales que guían parte importante de su comportamiento. Para el registro intracelular de neuronas de los lóbulos ópticos de *Neohelice* se aprovechó el duro exoesqueleto del cangrejo, sujetándolo firmemente con una pinza que lo toma por los lados del caparazón (figura 9). De esta forma el animal queda completamente fijo aunque conserva la posibilidad de mover las patas ambulatorias. Las quelas se sujetaron con una banda de goma para impedir que con ellas tome el electrodo y minimizar movimientos que podían desestabilizar el registro. Los pedúnculos oculares se fijaron al caparazón con pegamento acrílico rápido (La Gotita) con un ángulo de aproximadamente 60° respecto a la horizontal para facilitar los registros (el ángulo natural es de 50°). Luego se pegaron ménsulas metálicas a los pedúnculos para asegurar su fijado y aumentar la estabilidad del registro. Los registros se realizaron en uno u otro ojo en forma aleatoria. Finalmente se practicó un pequeño orificio en el caparazón donde se insertó el electrodo de referencia.

El animal fue montado en el equipo de registro, en una ubicación precisamente centrada respecto de todos los monitores, al igual que en el dispositivo comportamental, dado que esta simetría en la estimulación era clave para todos los experimentos y la decisión de la dirección de escape. Bajo lupa, se removió una pequeña porción de cutícula del extremo de uno de los pedúnculos en una zona libre de omatidias, que dejó un orificio de alrededor de 500 μ m de diámetro. Por allí se descendió el electrodo de registro. La penetración de las neuronas se hizo sin visualización de los elementos a registrar. Todos los registros se efectuaron en el potencial de reposo de la membrana.

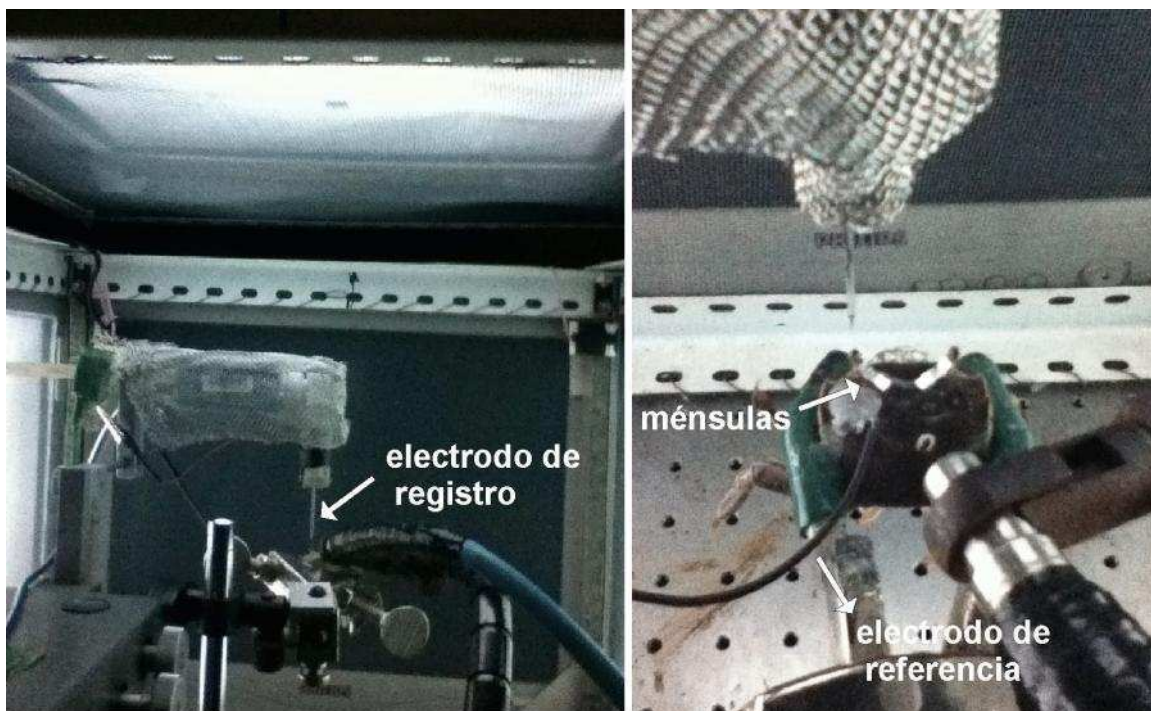


Figura 9. Dispositivo de registro electrofisiológico. El animal se encuentra perfectamente centrado, y recibe el looming desde el monitor dorsal, o desde alguno de los laterales. El electrodo de registro en este caso desciende en el ojo izquierdo. El electrodo de referencia, penetra unos pocos milímetros por un orificio en el cefalotórax hasta contactar la hemolinfa. Los ojos se encuentran fijos con ménsulas metálicas para evitar movimientos que impidan registrar las neuronas con estabilidad.

Para realizar los electrodos se utilizaron capilares de vidrio de borosilacato (World Precision Instruments, Inc. Florida, USA) de 1,2mm de diámetro externo y 0,68mm de diámetro interno. Los capilares se estiraron con un puller Sutter P97 obteniendo resistencias de 30-100 M cuando éstos eran llenados con KCl 3M.

Durante todo el procedimiento el animal se encontraba en estado alerta, no anestesiado, observando y manteniendo su capacidad de procesar información como lo hace durante experimentos comportamentales, con la única diferencia de que no puede desplazarse sobre la esfera, aunque si puede mover libremente sus patas. En la casi totalidad de los casos los animales permanecieron varias horas siendo registrados en el dispositivo en perfectas condiciones y luego de finalizados los experimentos y liberados de la pinza, se realizaron chequeos para evaluar si reasumían su actividad normal.

Dispositivo experimental

El dispositivo utilizado para realizar los registros intracelulares de neuronas individuales consistía en una caja de Faraday cubierta por arriba y en tres de sus costados con tela negra. Esto permitía prevenir cualquier tipo de estimulación visual no controlada desde el exterior. Dentro de la caja se ubicaban cuatro monitores de pantalla plana (Philips 107T, 17", de tasa de refresco de 60Hz a una resolución de 800x600 pixeles), localizados a 20 cm por encima, al frente y a los lados del animal (figura 10), de manera similar a la disposición del dispositivo comportamental. El monitor superior colgaba de la caja de Faraday y los otros tres estaban apoyados sobre una mesa antivibratoria. Se utilizaron pantallas antirreflex, colocadas por delante de los monitores, previniendo la aparición de reflejos que podrían estimular de forma no controlada al animal. Por delante de los monitores se agregó una malla metálica para atenuar el ruido eléctrico provocado por ellos.

Una vez penetrada una célula de interés, se descendía una cortina negra tapando la cara frontal de la caja de Faraday. De esta forma las respuestas registradas se debieron exclusivamente a los estímulos que llegaron a la retina del cangrejo desde los monitores y no a estimulación involuntaria provocada por movimientos del experimentador.

Como se ilustra en la figura 10, los estímulos visuales (descritos más arriba) fueron generados por la PC2, usando un software comercial (Presentation 5.3, Neurobehavioral Systems, Albany, USA). La imagen generada por la PC2 era dirigida a los cuatro monitores localizados dentro de la caja de Faraday. Mediante interruptores localizados fuera de la caja, se envió o no la señal de video desde la PC2 a cada monitor, de la misma forma que en el dispositivo comportamental.

Las señales obtenidas durante los registros intracelulares se amplificaron (Axoclamp 2B, Axon Instruments), digitalizaron a 10 kHz (Digidata 1322A, Axon Instruments) y adquirieron con Clampex (pClamp9) para su análisis off-line con la PC1. Durante los experimentos se monitoreó la señal electrofisiológica con un osciloscopio analógico.

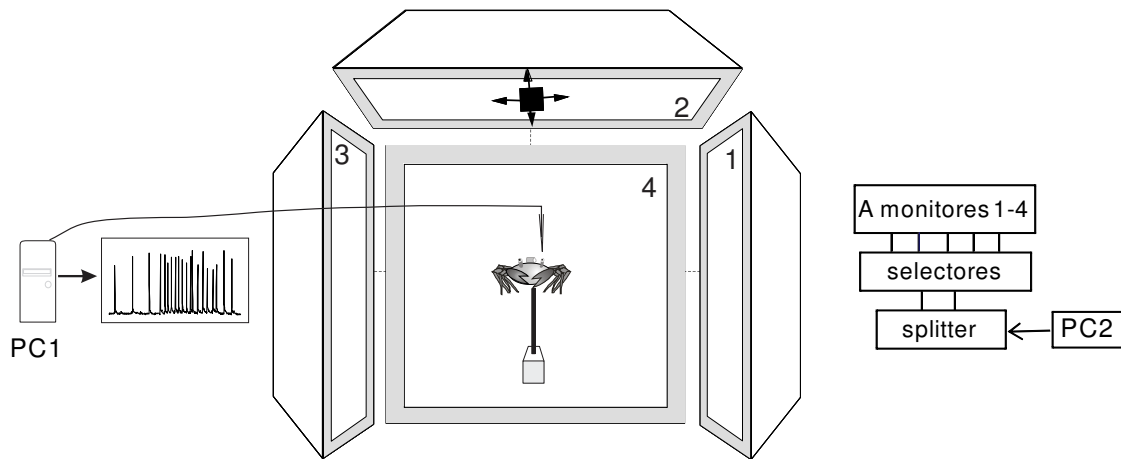


Figura 10. Dispositivo de electrofisiología. El animal se encuentra rodeado de monitores, que lo estimulan de manera programada por la PC2, mientras la señal evocada por la neurona impalada es registrado de manera paralela por la PC1.

Identificación de neuronas LG

Como mencionamos en la introducción, son muchas las evidencias que señalan a las LG como elementos centrales del circuito de detección del movimiento involucrado en las respuestas evasivas del cangrejo. Por esta razón nos enfocamos en este grupo particular de neuronas de la lóbula previamente caracterizadas, para evaluar si al menos parte del proceso de elección por el lado de escape podía tener lugar en estos elementos.

Protocolo de estimulación

Una vez montado al animal en el dispositivo, se procedía a descender el electrodo penetrando el lóbulo óptico del cangrejo en búsqueda de neuronas de la lóbula, en particular las neuronas gigantes. Por su tamaño, las LG son las neuronas más probables de impalar en la lóbula. Para confirmar la identidad de que la neurona impalada era una LG, se siguieron los criterios de identificación fisiológica descritos por Medan y col. (2007). Brevemente, se las reconoce por su escasa respuesta a cambios estacionarios de la intensidad de luz y alta sensibilidad al movimiento, con generación de potenciales de acción (dado que se trata de neuronas de proyección). Otra de las pistas que se tienen en cuenta cuando se está en

búsqueda de estas neuronas es considerar el recorrido de la penetración del microelectrodo. En particular, las LG están debajo de otras interneuronas de fácil reconocimiento fisiológico como las sustaining y las dimming, que se encuentran en el neuropilo exactamente anterior a la lóbula (la médula).

Si durante el descenso del microelectrodo se producía un aumento en la diferencia de voltaje, que podía indicar el haber penetrado una célula, se corroboraba que se tratara de una neurona sensible a estimulación visual. Para esto, se procedía en primer lugar a la observación de la respuesta fisiológica a un pulso de luz, de 1 seg de duración y una intensidad de aproximadamente 100W/m² medida en la superficie del ojo del cangrejo. Este estímulo es generado por una lámpara de Xenón ubicada fuera de la jaula de Faraday cuya luz es conducida hasta unos 10 cm del ojo de registro por una fibra óptica. Un obturador electromagnético gatillado por la PC1 es el encargado de controlar el inicio y final del pulso de luz. Aunque claramente se trata de un estímulo poco fisiológico, este tipo de respuestas se utilizan normalmente para caracterizar a las neuronas visuales y para constatar que el animal conserva los canales de entrada sensorial lumínica en buen estado. Por otro lado, un estímulo como este, que genera una iluminación masiva sobre el ojo, nos permitía identificar neuronas visuales independientemente de su campo receptivo.

De obtener actividad con el pulso de luz, se procedía a pasar la mano alrededor del campo visual del cangrejo, para ver si esta neurona detectaba movimiento. Una vez impalada una LG, se bajaba una cortina que permitía mantener al animal aislado de la estimulación visual provocada por los movimientos del investigador y se esperaba unos 5 minutos hasta que se estabilizaba el registro.

Una vez que una neurona gigante de la lóbula era penetrada e identificada como tal, se procedía con el protocolo de estimulación que, en todos los casos, se iteró en forma randomizada de neurona en neurona.

En la mayoría de los datos utilizados en esta tesis, los registros de cada neurona tuvieron una duración de entre 30 minutos y más de una hora y recibieron aproximadamente entre 15 y 30 estímulos.

El protocolo de estimulación general una vez detectada una neurona LG era el siguiente, a menos que se aclare algún detalle particular en los experimentos:

- a) **Registro de los parámetros de Reposo.** Durante los primeros 5 minutos se dejaba a la neurona sin ningún tipo de estimulación. Luego de transcurrido este tiempo, se procedía al registro de la actividad espontánea de la neurona (actividad eléctrica en ausencia de estimulación).
- b) **Respuesta a pulso de luz.** Como se aclaró previamente, la respuesta al pulso de luz es un dato de utilidad para saber el tipo de célula que se está registrando. Además, este estímulo se utilizó para chequear, durante el protocolo de estimulación, que la neurona registrada continuara en buen estado y no se hubiera atenuado su respuesta.
- c) **Búsqueda de preferencia por los estímulos looming en algún monitor.** Para evaluar si la neurona registrada presentaba una preferencia en la detección del movimiento proveniente de distintos campos visuales, se registraba la respuesta al looming presentado en el monitor derecho, izquierdo y en el monitor dorsal. El estímulo looming utilizado tenía las mismas características de luminosidad, tamaño y dinámica que el utilizado en todos los experimentos comportamentales. Luego de esto, el protocolo de estimulación continuaba y se repetía varias veces si el registro era estable y no variaba el potencial de reposo.
- d) **Respuesta mecanosensorial.** Algunas neuronas LG presentan respuestas de integración multimodal, respondiendo tanto a estímulos visuales como a estímulos táctiles (Medan y col 2007). Esto nos permitía, además, afinar la clasificación de las LG. Se chequeó la respuesta a estímulos mecanosensoriales tocando suavemente las patas del animal con un pincel.
- e) **Configuración del contexto en el que se presenta el estímulo looming.** Registramos las respuestas de las neuronas al estímulo de expansión presentado en cuatro configuraciones contextuales diferentes: monitores laterales encendidos, laterales apagados, un lateral encendido y el otro apagado, mientras se presenta el looming en el monitor dorsal o en los monitores laterales.
- f) **Intervalo entre estímulos:** Es sabido de trabajos anteriores que las neuronas gigantes de la lóbula tienen una tendencia a reducir su respuesta ante la presentación reiterada de estímulos (Beron de Astrada y Tomsic, 2002). Como nos interesaba tomar la mayor cantidad de datos posibles de cada neurona que pudimos registrar (lo cual representaba una batería

numerosa de estímulos presentados a la misma neurona), decidimos espaciar los estímulos al menos 1 minuto entre sí, y además aleatorizar su orden de presentación, de manera de no presentar en forma repetida ninguno de ellos, y así evitar la habituación de la respuesta.

- g) **Repetición del protocolo:** siempre que se registró una neurona de manera estable, y no se observó adaptación por la estimulación, se intentó repetir el protocolo para promediar los datos en cada neurona. Cada neurona incluida en los análisis, fue sometida a al menos dos presentaciones del estímulo en cada condición, y se utilizó el promedio de esas respuestas. A veces los registros eran tan estables, que las mismas condiciones de estimulación pudieron ser repetidas hasta 6 veces en la misma neurona.
- h) **Chequeo de la respuesta de la célula:** luego de haber expuesto a las células a todo el protocolo de estimulación, se volvieron a tomar los datos de actividad espontánea y respuesta al pulso de luz de la neurona, para chequear que no se hubiera modificado el potencial de reposo o la sensibilidad de respuesta visual.

Análisis de los registros

El análisis y procesamiento de los registros se realizó usando los programas Clampfit del paquete pClamp (Axon Instruments), Statistica (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos), Origin (Microcal Software, Northampton, Massachusetts, Estados Unidos), y Excell (Microsoft® Office 2010, Redmond, Washington, Estados Unidos).

Los registros electrofisiológicos realizados en el cangrejo se realizaban sin control del sitio de impalación de la neurona. Esto significó que para neuronas morfológica y fisiológicamente idénticas, obteníamos distinta amplitud de PA y distintos niveles de actividad sináptica subumbral. Registros cerca de la entrada sináptica tendrán potenciales excitatorios postsinápticos (PEP) mayores y PA de menor amplitud, mientras lo contrario se observará en zonas cercanas al sitio de inicio de PA. Para deshacernos de esta variabilidad, en los análisis se utilizó como parámetro de respuesta el número de PA evocados por la estimulación, ya que esta magnitud no es afectada por el sitio de registro.

4. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valores de media \pm error estándar (s.e.m.) y el número de neuronas (n) se expresó entre paréntesis. El grado de significancia estadística de los resultados obtenidos en los distintos experimentos se determinó usando distintas pruebas estadísticas que se indican luego en la sección correspondiente (elegidas según el diseño experimental y el tamaño de la muestra).

Siempre que fue posible, utilizamos tests paramétricos (test de Student en el caso de dos grupos o ANOVA seguida de comparaciones múltiples por el método de Holm-Sidak); cuando no lo fue, usamos tests no paramétricos (Análisis de Mann-Whitney en el caso de dos grupos, Análisis de Friedman en el caso de medidas repetidas seguidos por contrastes de Tukey o Análisis de Kruskal-Wallis seguidos por comparaciones múltiples por el método de Dunn).

Para el caso de comparación de proporciones, se utilizó el estadístico de Chi cuadrado de Pearson, para medir la discrepancia entre una distribución observada y otra teórica (bondad de ajuste).

Los resultados de los tests fueron considerados significativos cuando p-valor < 0.05 (un asterisco, * p < 0.05 ; doble asterisco, **p < 0.01 , triple asterisco ***, p $<0,001$).

Sección 3.

Resultados.

Capítulo 1

Decisión del lado hacia donde escapar

1. Desarrollo de un paradigma dicotómico para el estudio de la Toma de Decisiones en *Neohelice granulata*.

La primera parte de esta tesis consistió en ajustar los parámetros de estimulación y registro y acondicionar el dispositivo utilizado previamente en el laboratorio, en función del nuevo paradigma que buscábamos desarrollar (Oliva y col., 2007). Debido a las características que requería el paradigma de toma de decisiones, fuimos ajustando cada uno de los parámetros mediante experimentos preliminares cuyos procedimientos y resultados se comentan brevemente.

1.1. Determinación de parámetros óptimos y calibración de las condiciones.

El paradigma que nos propusimos desarrollar en esta tesis, el estudio de la elección de lado de escape ante el estímulo looming dorsal, exigía controlar las siguientes condiciones:

1. *Restringir la elección a únicamente dos opciones.* El dispositivo comportamental descrito en la sección de Materiales y Métodos, ha sido validado y utilizado desde hace varios años en el laboratorio de Neurobiología de la Memoria (Oliva y col., 2007). El mismo permite estudiar el escape del cangrejo evocado por estímulos visuales con precisión. Los cangrejos escapan corriendo preferentemente de costado, lo que favorece la posibilidad de investigar un proceso de decisión que consiste en una elección binaria, la de correr hacia su lado izquierdo o hacia su lado derecho. Experimentos piloto mostraron que la direccionalidad lateral de los escapes aumentaba si los monitores del frente y de atrás estaban apagados. Por consiguiente, todos los experimentos de esta tesis fueron realizados con las pantallas frontal y posterior apagadas.
2. *Lograr condiciones de simetría que no sesguen la preferencia del animal hacia ninguno de los dos lados de escape.* El dispositivo debía poseer similares condiciones de

rozamiento mecánico, luminosidad y claves visuales del entorno en ambos lados del dispositivo. La intención era lograr que el dispositivo no tuviera (en una situación de control donde no se alterara el contexto visual) ninguna diferencia importante de rozamiento mecánico o asimetría visual que predispusiera al animal a elegir correr hacia uno de los lados del dispositivo. Para lograr esto llevamos a cabo los siguientes ajustes y calibraciones:

- a) *Centrado del animal en la esfera*: previo a cada experimento se procedió al correcto centrado del animal respecto del monitor dorsal (donde se ubicará la posición inicial del estímulo visual de peligro) y los monitores laterales.
- b) *Rozamiento mecánico*: Se ajustaron los topes laterales de la esfera (ver figura 5, panel II) mediante experimentos en los que se presentaron loomings a izquierda y derecha para un grupo de animales, de modo de chequear que las distancias de escape fueran las mismas para cada uno de los lados. Esta calibración se efectuó de forma rutinaria antes de comenzar los experimentos (como ejemplo se puede observar la Figura 12, panel II).
- c) *Efecto de claves visuales en el entorno*: para evaluar que no hubiera alguna clave en el entorno visual, como por ejemplo algún reflejo difícil de detectar por el experimentador pero que pudiera estar siendo percibido por el animal, se realizaron experimentos de control. Para esto se desafió a los animales dos veces con un looming con aproximación dorsal y con los monitores laterales apagados.

En un primer ensayo cada individuo tenía la parte anterior enfrentando el monitor de adelante, en un segundo ensayo el animal era girado 180 grados, de modo que ahora su parte anterior enfrentaba el monitor de atrás. Comparando las respuestas de los ensayos 1 y 2 determinamos que no había una tendencia a elegir el mismo lado en ambos ensayos ($N=33$, 2 Pearson, $p=0,7$).

d) *Luminosidad de los monitores laterales:* Para no sesgar la elección de los animales durante el escape evocado por el looming, calibramos el contraste y el brillo de los monitores de forma tal de lograr que no se midieran asimetrías desde el centro del dispositivo. Una vez logrado un registro idéntico de intensidad de luz medido con un luxómetro, procedimos a realizar un experimento piloto donde se midió la actividad exploratoria de los animales con los monitores laterales encendidos, así como la intensidad de los escapes cuando los animales eran desafiados con loomings laterales. Las pruebas piloto mostraron que se logró una condición control repetible y simétrica.

Finalmente, aun luego de las calibraciones mencionadas, para descartar leves asimetrías en cuanto a la rotación de la esfera o cualquier otro factor que pudiera estar afectando la respuesta de escape del cangrejo, todos los experimentos involucraron estímulos laterales que se realizaron alternando de manera balanceada el lado de estimulación (izquierda y derecha) entre los distintos animales en cada experimento. Siempre se compararon las intensidades de respuesta para corroborar que no existieran diferencias entre ambos lados.

2. Elección del lado de escape en *Neohelice granulata*.

Como desarrollamos en la Introducción general, los cangrejos escapan corriendo de costado. Cuando un objeto se les aproxima, en ausencia de un refugio disponible, escapan en sentido opuesto al objeto, es decir, alejándose del mismo. Si el objeto cambia de posición o trayectoria, el cangrejo ajusta en cada momento su dirección de escape de forma de ubicar siempre al objeto amenazante en el polo visual opuesto a su dirección de huida (Medan y col. 2015).

2.1. Efecto de la dirección de aproximación del estímulo.

Nuestro primer objetivo fue entonces caracterizar la respuesta de escape individual al looming presentado en el monitor dorsal y compararla con la respuesta al looming lateral.

Una vez logradas las condiciones de simetría en el dispositivo comportamental, evaluamos y caracterizamos las respuestas de *Neohelice* ante una situación que lo enfrenta a una elección dicotómica.

Caracterización de la respuesta de escape ante el looming con aproximación dorsal.

Los animales fueron preparados como se detalló en los métodos generales (sección 2). En este caso, a cada uno de los individuos se le presentó un único ensayo con un looming de aproximación dorsal.

Analizamos todos los animales desafiados con el looming dorsal en diversos experimentos realizados en las mismas condiciones, y los resultados muestran que el 88% de los animales responde escapando hacia uno de los laterales, mientras que el 10% no responde o lo hace inmovilizándose (freezing) o sobresaltándose (startle behavior) y el 2% hace un comportamiento defensivo elevando sus quelas. (N animales=203, 6 experimentos).

Dinámica de la respuesta de escape ante el looming dorsal

Al inicio del ensayo, los animales exploran el entorno visual novedoso, con una caminata que no supera una velocidad instantánea de 1 cm/s. Luego de un breve tiempo la mayoría suele quedar en reposo hasta que, tras la detección del estímulo en expansión, inicia el escape. Una baja proporción de animales se encuentran caminando previo al escape (ya que hay casi 3 minutos previos a la expansión y los animales solo exploran unos segundos al principio), y en estos casos se puede observar que siempre existe una detención, previa al escape (figura 11, panel IV). Este “freezing”, también observado en experimentos en el campo con cangrejos violinistas podría constituir una manera de medir en forma más precisa la velocidad de aproximación del estímulo (Hemmi 2005a), o una primera estrategia de evitación (Hemmi y Tomsic 2012). En cualquier caso es la primera expresión comportamental del momento en que la expansión es detectada. Esto mismo fue observado y caracterizado por Oliva (2010) para el looming lateral.

Observaciones cualitativas indican que la decisión de *hacia adonde escapar* (izquierda o derecha en nuestro paradigma dicotómico), no parece depender del lado hacia el que estuvo caminando el cangrejo en la etapa exploratoria.

En la figura 11, describimos la dinámica de exploración y de escape de un cangrejo, durante un ensayo. En el caso mostrado, el animal se mantuvo quieto los primeros 40 segundos

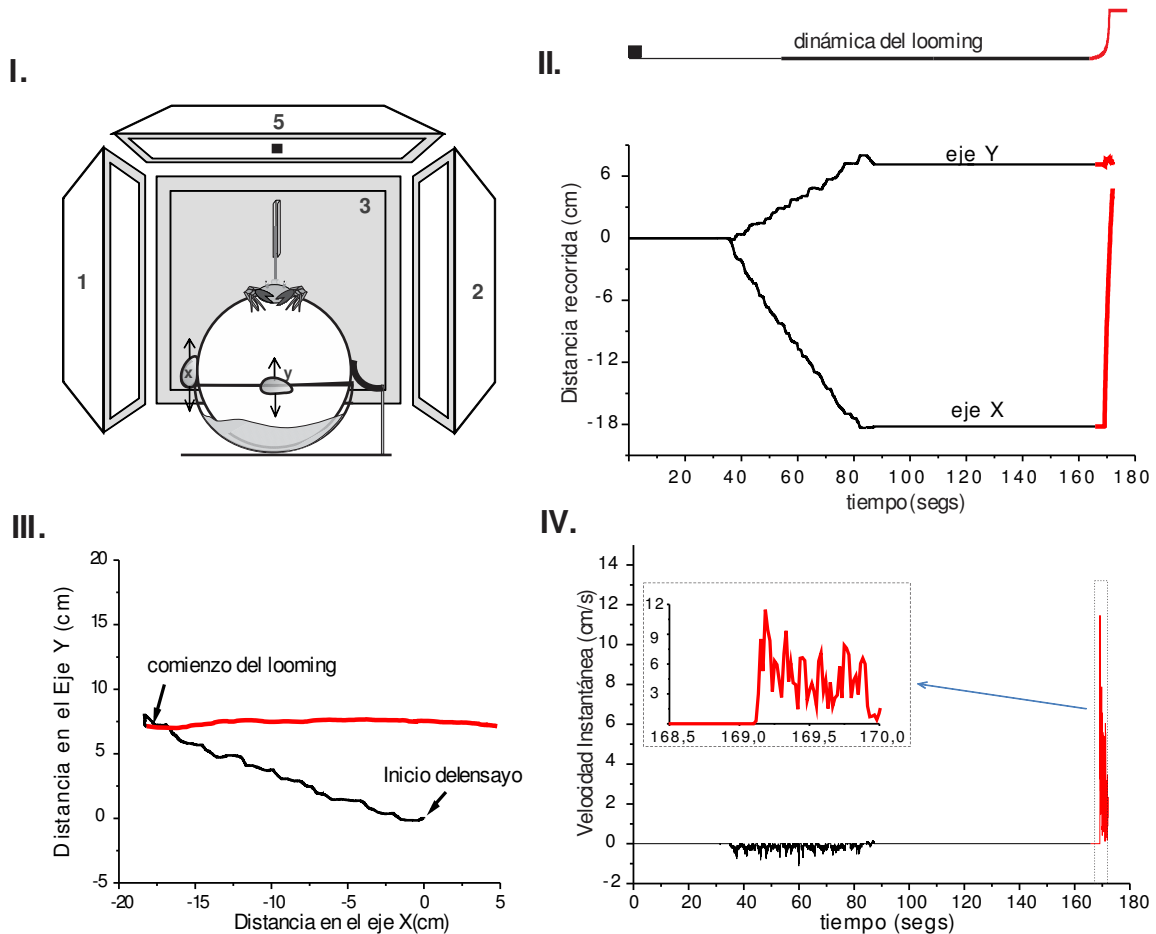


Figura 11. Actividad locomotora de un cangrejo durante los 165 segundos previos al comienzo de la expansión del estímulo looming y 6 segundos luego de su comienzo. I. El cangrejo se encuentra en un estado exploratorio hasta que el estímulo, ubicado en el centro del monitor dorsal, comienza su expansión. II. En este gráfico se muestran las distancias registradas en cada sensor óptico durante el ensayo. Los trazos negros corresponden a una caminata lenta y estados de reposo del animal, durante el período sin estimulación. Las partes rojas del trazo al final del ensayo, ilustran la respuesta disparada por el estímulo looming. Resulta claro el incremento abrupto en el eje X, correspondiente a un escape lateral rápido. El trazo superior representa la dinámica de la expansión del estímulo. III. Se muestra la trayectoria del animal reconstruida. IV. La velocidad instantánea del cangrejo durante todo el ensayo, muestra una caminata lenta durante la fase exploratoria, y un escape lateral rápido durante la expansión del estímulo, detallado en el inset.

del ensayo, aproximadamente. Luego realizo una exploración caminando hacia el lado izquierdo y hacia adelante durante otros 40 segundos, hasta detenerse. Luego de más de un minuto sin explorar, instantes después del inicio de la expansión el animal inicia un veloz escape hacia el lado derecho.

Comparación de las respuestas al looming con aproximación dorsal y lateral.

Para comenzar a caracterizar la respuesta al looming dorsal y compararlo con los estímulos más ampliamente estudiados en el laboratorio, realizamos un experimento donde cada animal era enfrentado al azar en ensayos sucesivos al looming lateral (proveniente de izquierda o derecha, aleatoriamente) o al looming dorsal.

El sentido de este experimento fue contrastar dos situaciones bien opuestas: la primera, en la cual la elección del lado de escape es altamente predecible, ya que está dominada por la certeza que impone la posición lateral del estímulo amenazante, y la segunda, en la cual la elección del lado de escape es altamente impredecible, dada la incerteza que impone una amenaza proveniente desde arriba. La Figura 12 muestra los resultados de las trayectorias de escape obtenidas con cada uno de los estímulos utilizados.

Se puede observar que para el looming lateral las respuestas fueron altamente direccionales y se efectuaron en sentido opuesto a la procedencia del estímulo. Frente al estímulo dorsal, los animales escaparon también corriendo hacia uno de los lados pero, contrariamente a lo que sucede con el estímulo lateral la probabilidad de escapar hacia la derecha o hacia la izquierda fue equivalente (ver Fig. 12, panel I, para estímulo dorsal: χ^2 Pearson, $p=0,71$). Por lo tanto, es dable concluir que bajo estas condiciones experimentales la elección del lado de escape a un estímulo de peligro aproximándose directamente desde arriba del animal es impredecible.

Además, la figura 12, panel II, muestra que las distancias recorridas por los que eligieron escapar hacia la derecha o hacia la izquierda no mostró diferencias significativas ($N=31$, test de t no pareado, $P=0,7544$). Este resultado revela que los animales pueden correr igualmente bien hacia uno u otro lado, indicando que el dispositivo se encuentra bien calibrado. Esto se corrobora con los datos de distancia recorrida en el caso del looming lateral derecho e izquierdo, que muestra que las intensidades de escape para ambos lados es similar, aunque

mayor que la desplegada frente al looming dorsal (N=31, ANOVA 1 factor, $P < 0,05$, post hoc test revela diferencias significativas entre dorsal y laterales: $P < 0,05$, pero no entre laterales: $P = 0,65$).

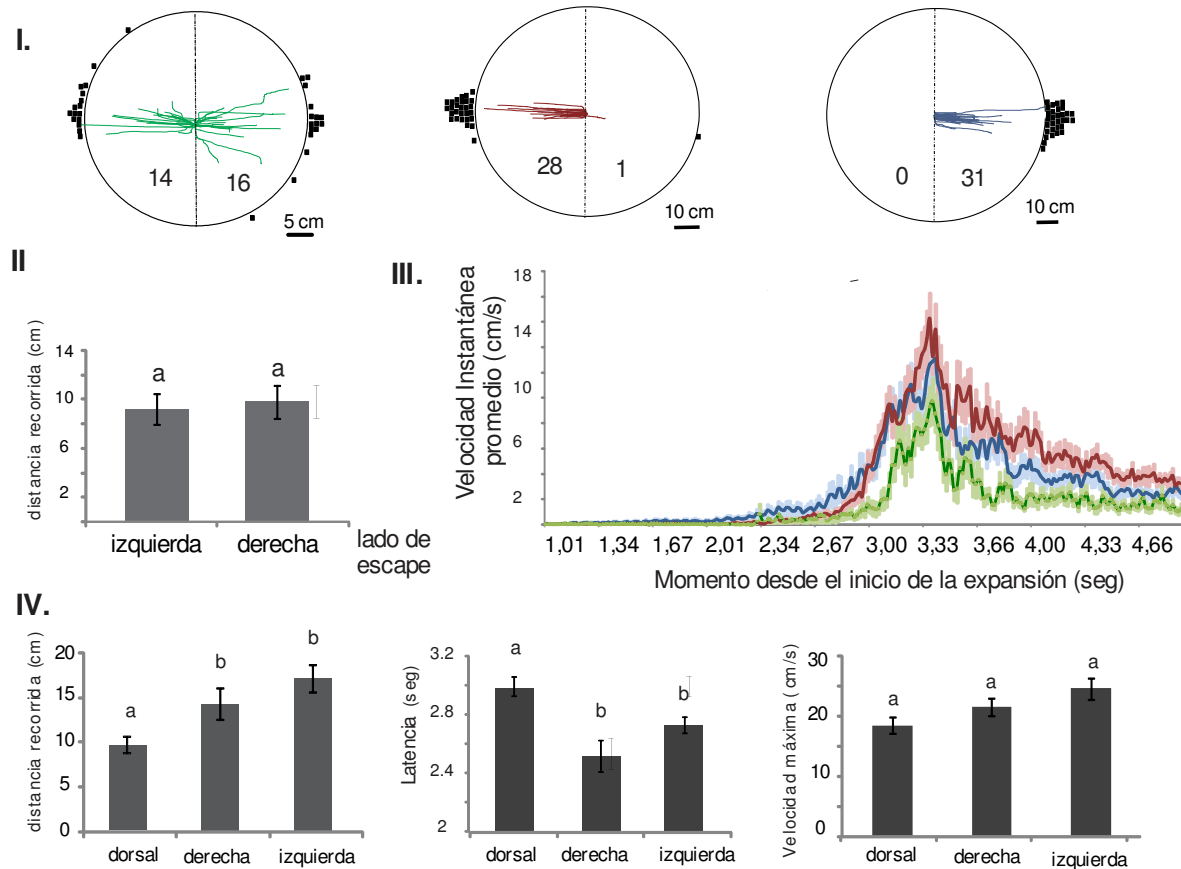


Figura 12. Direccionalidad de la respuesta de escape ante el estímulo de expansión. I. Se presentó un estímulo looming en el monitor dorsal, en el monitor derecho o en el izquierdo del dispositivo experimental. La trayectoria de cada animal se muestra en gráficos circulares, para cada situación experimental. Se pueden observar escapes altamente direccionales en el caso de los estímulos presentados lateralmente, pero para el caso de la estimulación con el looming dorsal, se observa una elección individual del lado de escape que resulta impredecible (N=31, 2 Pearson, $P = 0,71$). II. Cuando el estímulo de expansión es presentado en el monitor dorsal, las distancias de los escapes a izquierda o derecha son similares (N=31, Test de T no pareado, $P = 0,75$). III. Dinámica de las respuestas de escape para las tres condiciones de estimulación. IV. Análisis cuantitativo de la dinámica de la respuesta muestra que en el caso de la estimulación dorsal, las respuestas son menos intensas y el comienzo del escape es posterior, a comparación de los estímulos de aproximación lateral (N=31, Distancia: Anova de 1 factor con Medidas Repetidas, $P < 0,001$. Latencia: Anova de 1 factor con Medidas Repetidas, $P < 0,001$, Velocidad Máxima: Anova de 1 Factor con Medidas Repetidas, $P = 0,052$. Las diferencias significativas fueron encontradas entre las barras señaladas a y b, luego de realizar test a posteriori de Tukey).

Analizando los promedios de las velocidades de escape desarrolladas para los estímulos looming laterales y dorsal (Figura 12, panel III), se puede observar que la velocidad del escape aumenta a medida que el objeto simula aproximarse al cangrejo. Una vez que el estímulo termina de expandirse, es decir cuando simula detenerse muy próximo al animal (a los 3,2 segundos), la velocidad de escape ha alcanzado su único máximo y comienza a disminuir. La velocidad máxima alcanzada durante el escape, no mostró diferencias significativas en los picos máximos de velocidad instantánea entre las 3 condiciones (N=31, ANOVA de 1 Factor con Medidas Repetidas para Velocidad máxima, P=0,052). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas en las latencias de respuesta. Estas latencias fueron medidas de forma individual considerando el momento en que la velocidad superó los 1,5 cm/s. La figura de latencia de respuesta en el panel IV muestra los promedios de esos valores para cada condición de estimulación. El análisis estadístico revela una *latencia de la respuesta de escape significativamente mayor para el looming dorsal que para los laterales* (N=31, Anova 1 factor Medidas Repetidas, P=0,001, test a posteriori de Tukey: dorsal vs der: P<0,01, dorsal vs izq: P<0,05, izq vs der: P=0,32). *Este resultado es interpretado en términos del mayor tiempo requerido para procesar la decisión del lado hacia donde escapar en la condición de mayor incerteza que plantea el estímulo dorsal.*

3. Sensibilidad a la posición del estímulo dorsal para la decisión del lado hacia el cual escapar.

La elección del lado hacia el cual escapa el animal depende del área del campo visual desde la cual se aproxima el estímulo. En comparación con estímulos que se aproximan desde un costado, ante estímulos que se aproximan desde arriba los animales responden después, con menor intensidad (escapando menores distancias) y su elección por el lado es impredecible. En el siguiente experimento quisimos investigar una de las posibles causas que podrían estar determinando la decisión de cada animal por escapar hacia un determinado lado frente al looming dorsal.

Efecto de la posición del estímulo sobre la elección de lado de escape.

Antes de cada experimento evaluamos que el animal esté correctamente centrado con respecto al centro del monitor dorsal. Sin embargo, una vez que comienza el experimento los animales caminan sobre la esfera. Esto puede implicar un cierto movimiento de desplazamiento lateral (en el eje X) producto del juego entre la varilla de madera y la guía metálica. Así, el estímulo looming puede aparecer levemente descentrado respecto de la posición del cangrejo (no más de 0,5 cm).

Si bien el desplazamiento del centro del animal respecto al *looming* dorsal es muy pequeño, no sabíamos si ese factor podría ser el determinante de la elección del lado del escape. Es decir, si los cangrejos pudieran detectar estos mínimos desplazamientos, podría ser entonces que estuvieran eligiendo uno u otro lado, en función de la posición del *looming* sobre ellos al momento de tomar la decisión.

Para investigar esta posibilidad, diseñamos un experimento en el que utilizamos 4 grupos de animales, a cada uno de los cuales les presentamos looming dorsales desplazados del centro de la pantalla, tanto hacia la izquierda como a la derecha de la misma formando ángulos respecto a la posición del animal de 0° , $2,2^\circ$, $4,4^\circ$ y $8,8^\circ$ (figura 13).

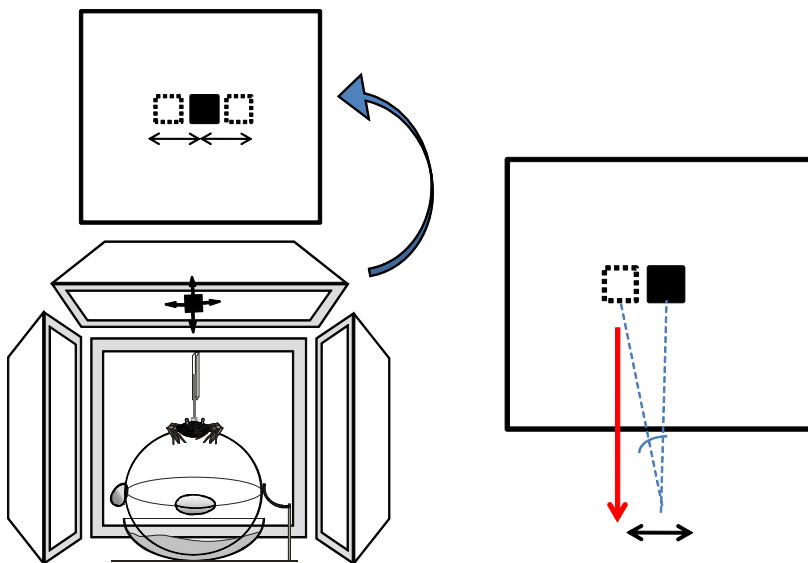


Figura 13. Desplazamiento del estímulo looming respecto de su posición centrada en el monitor dorsal. Los desplazamientos fueron realizados hacia derecha o izquierda en forma aleatoria. El desplazamiento lateral del estímulo, generaba un ángulo de desfase de $2,2^\circ$, $4,4^\circ$ y $8,8^\circ$ desde la posición central del cangrejo.

Los resultados muestran que pequeños desplazamientos ($< 2,2^\circ$) del estímulo con respecto al centro del animal no afectan la elección del lado de escape. Esto permite descartar la influencia del pequeño descentrado del estímulo sobre los animales que pudiese ocurrir durante los movimientos exploratorios. Los animales eligen escapar hacia el lado opuesto al del desplazamiento del estímulo para el caso de $8,8^\circ$, pero no para ángulos menores (figura 14, panel I). Los animales responden con elecciones de lado distintas del valor del azar solo cuando el desplazamiento del estímulo fue de $8,8^\circ$. Sin embargo, aunque las diferencias no alcanzan a ser estadísticamente significativas, se observa que con $4,4^\circ$ de desplazamiento ya hay una alta proporción de animales que escapan hacia el lado opuesto.

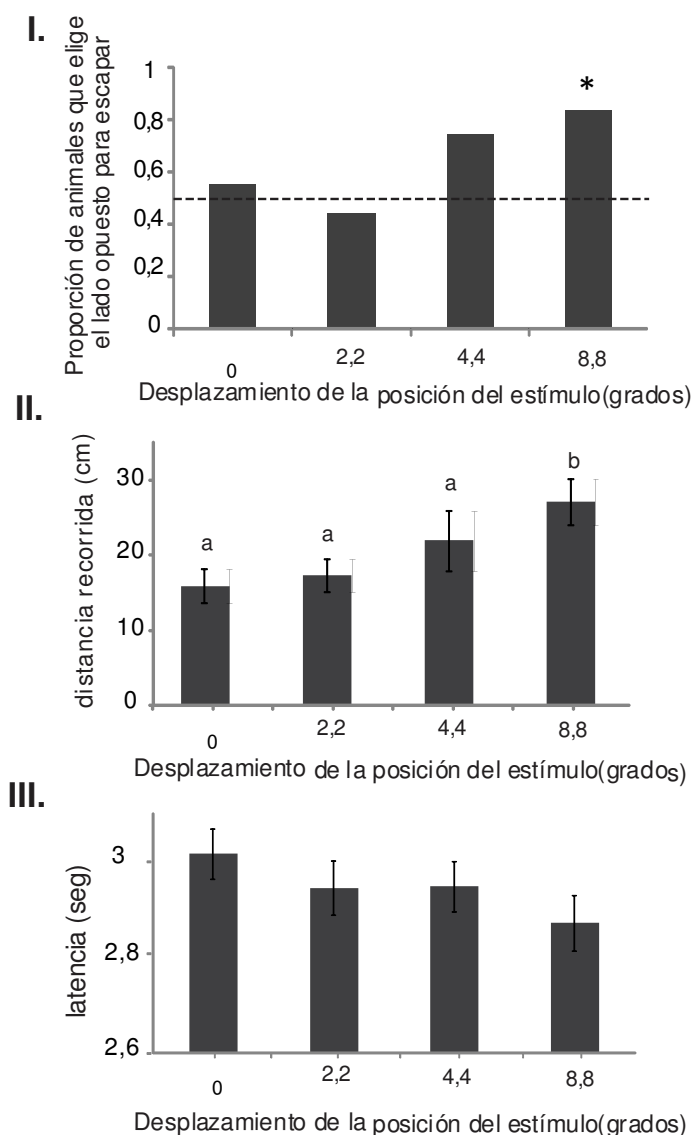


Figura 14. Efecto de la posición del estímulo en el campo dorsal, en la respuesta de escape de *Neohelice granulata*. I. La posición del estímulo fue desplazada $2,2^\circ$, $4,4^\circ$ o $8,8^\circ$ respecto de la posición perfectamente centrada (0°), y se registró el lado de escape. ($N(8,8^\circ)=15$, $N(4,4^\circ)=17$, $N(2,2^\circ)=17$, $N(0^\circ)=19$, 2 Pearson, corrección de Yates, * $P<0,05$). II. Distancia recorrida en las respuestas de escape ante los estímulos dorsales desplazados (ANOVA de 1 factor, con test a posteriori de Dunnet, $P<0,05$, Las diferencias significativas fueron encontradas entre a y b). III. Latencia en la respuesta de escape, en las distintas condiciones (Spearman Correlation Rank, $R=-0,3448$, $P<0,05$).

Un análisis cuantitativo de la intensidad de la respuesta de escape, muestra que se vuelven más intensas (más distancia recorrida) solo para el desplazamiento correspondiente a $8,8^\circ$ (fig. 14, panel II). Por otra parte, la latencia de escape no muestra diferencias significativas entre los grupos comparados, aunque se insinúa una tendencia de menores latencias con los desplazamientos mayores (panel III, ANOVA 1 vía $p > 0,05$, Spearman Correlation Rank, $P < 0,05$, $R: -0,3448$).

El porcentaje de animales que elige escapar hacia el lado opuesto del que se desplazó el estímulo se incrementa para ángulos de $4,4^\circ$, y en forma significativa para $8,8^\circ$ respecto del looming centrado (más del 80% elige el lado opuesto cuando el desplazamiento es de $8,8^\circ$). Estos resultados indican que desplazamientos del estímulo menores de $8,8^\circ$ con respecto al eje vertical centrado en el animal no afectan de forma significativa la elección del lado hacia el cual este se escapa. Esto asegura que los pequeños desplazamientos (de $\pm 0,5$ cm equivalentes a $1,5^\circ$) producidos por el posicionamiento del animal al caminar sobre la esfera, no serían el determinante de las elecciones de lado que se observan frente al estímulo dorsal centrado.

Habiendo probado que la toma de decisiones del lado de escape se realiza de manera impredecible hacia izquierda o derecha ante el looming dorsal centrado, y que dicha elección no depende de asimetrías del método de estimulación y medición (apartado anterior), ni de las pequeñas diferencias de posicionamiento del estímulo sobre el animal, pasamos a evaluar otros aspectos de las elecciones individuales de los cangrejos en este paradigma.

4. Toma de decisiones en ensayos consecutivos.

Para el caso del looming dorsal perfectamente centrado, el análisis reveló que la mitad de los animales elige correr hacia su derecha y la otra mitad hacia su izquierda. Es decir, que a nivel grupal la elección por el lado de escape resulta impredecible. ¿Pero, qué pasa con la decisión a nivel individual?

Las preguntas que surgen entonces son: ¿Existirá en cada cangrejo una preferencia definida por correr hacia un lado u otro? ¿Acaso cada animal elige al azar el lado de escape? ¿O, en cantidades balanceadas a nivel poblacional, existen animales con preferencias definidas por escapar hacia su derecha o hacia su izquierda?

Para evaluar esto, repetimos el experimento del looming dorsal, pero esta vez con 4 ensayos consecutivos, de modo de poder evaluar la consistencia o perseverancia en la preferencia por el lado de escape en cada individuo.

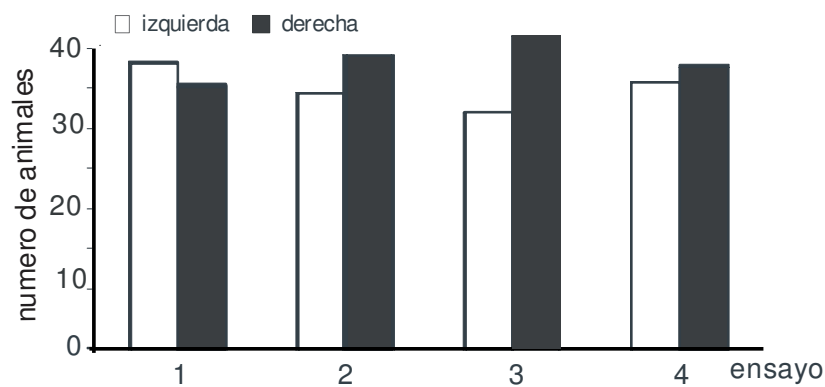


Figura 15. Elección del lado de escape ante el estímulo looming dorsal en ensayos consecutivos. Se observa que un número balanceado de animales elige escapar hacia la derecha o hacia la izquierda en cada una de las sucesivas presentaciones del estímulo (N=71, χ^2 Pearson, $P > 0,01$ para cada ensayo).

En la figura 15 se muestra que las respuestas se repiten, a nivel grupal, de la misma manera en los cuatro ensayos presentados: no se ven diferencias en las proporciones de animales que eligen uno u otro lado al escapar. También pudimos observar que luego de la cuarta presentación consecutiva (algunos experimentos se hicieron con más de 4 ensayos), aumenta mucho la proporción de animales que reducen su respuesta de escape y efectúan respuestas de “inmovilidad” o “sobresalto” ante el estímulo. Este tipo de cambio comportamental en las estrategias ha sido observado anteriormente en otras condiciones en nuestro laboratorio.

Con este patrón de escapes a nivel grupal, podrían estar sucediendo diferentes tipos de respuesta a nivel individual. En cada uno de los ensayos, los animales deben tomar una elección: escape hacia la derecha o hacia la izquierda. De existir preferencias individuales bien definidas por el lado de escape, los animales optarían en forma repetida por el mismo lado elegido en el ensayo anterior (100% elecciones hacia el mismo lado en un caso extremo), la mitad de los animales la izquierda y la otra mitad la derecha. De no haber preferencias a

nivel individual, las elecciones en cada ensayo serían independientes de la precedente, es decir, cada animal elegiría en forma aleatoria uno u otro lado ensayo tras ensayo.

Si analizamos en forma individual las elecciones de cada animal y evaluamos el porcentaje de animales que repite siempre la primera elección, encontramos que el 70% de los animales mantiene *el mismo lado* durante los 4 ensayos. Para analizar estadísticamente este comportamiento, comparamos la proporción de animales que repiten las respuestas de escape hacia el mismo lado ensayo tras ensayo, con una curva de probabilidad teórica que representa el caso en que los animales estuvieran eligiendo de manera repetida el mismo lado de manera azarosa.

La probabilidad matemática de elecciones al azar (50% probabilidad de escape a cada lado) en ensayos consecutivos es:

$$P(E1) = \text{Probabilidad Elección Lado de escape en Ensayo 1} = 1$$

$$P(E2=E1) = \text{Probabilidad (Elección Lado de escape en Ensayo 2 = E1)} = P(E1) * 0,5 = 0,5$$

$$P(E3=E2=E1) = P(E1) * P(E2) * 0,5 = 0,25$$

$$P(E4=E3=E2=E1) = P(E1) * P(E2) * P(E3) * 0,5 = 0,125$$

Contra esta secuencia teórica de probabilidades ante elecciones consecutivas al azar, comparamos los datos reales obtenidos en un grupo de animales. Se calculó la proporción de animales que persiste, en cada ensayo consecutivo, en la elección tomada en el primer ensayo.

Como se muestra en la figura 16 el análisis de los resultados del experimento revela que la mayoría de los animales mantienen su preferencia por el lado de escape a lo largo de los ensayos. Los porcentajes de individuos que prefirieron escapar siempre a la derecha o siempre a izquierda a lo largo de los ensayos (en la figura se muestran separados) fue muy similar. Una vez tomada la primera decisión de hacia dónde escapar, la mayoría de los animales repiten la misma elección en los ensayos consecutivos. Estos resultados muestran que para cada individuo la elección por el lado de escape no es aleatoria en ensayos consecutivos.

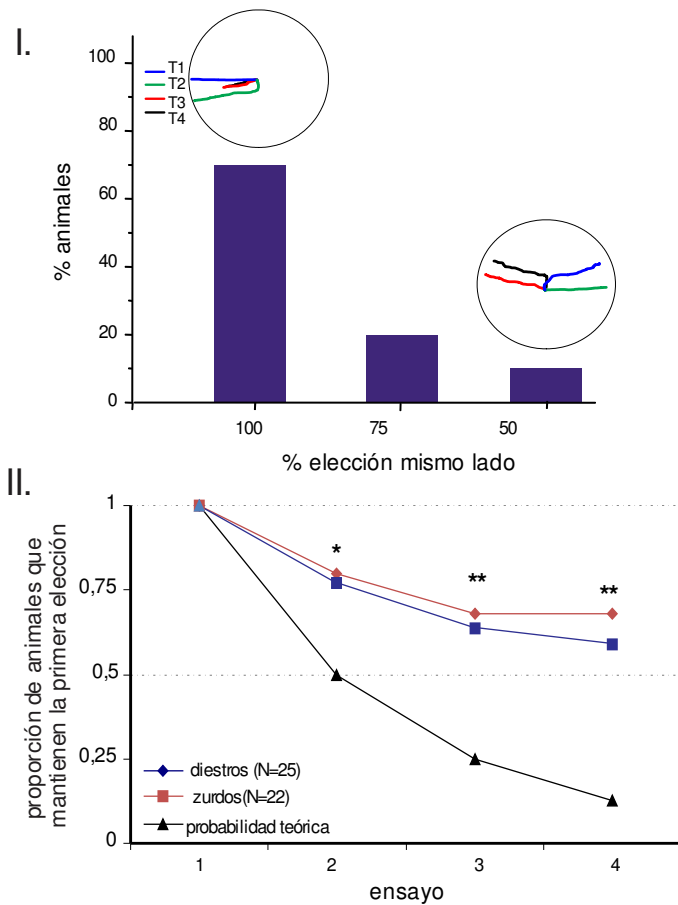


Figura 16. Repetición de la elección de lado de escape. Panel I. Proporción de animales que repite la primera elección, en un experimento de 4 ensayos consecutivos (N=54). El 70% de los individuos repite la primera elección en todos los ensayos, y una minoría (10%) eligen de manera balanceada ambas opciones de lado de escape. En la parte superior de las barras del 100% y del 50% de repetición de la respuesta, se muestran gráficos circulares de respuestas individuales, de animales que eligen de manera persistente (en los 4 ensayos el animal elige escapar hacia la izquierda) o balanceada (los dos primeros ensayos este animal escapa hacia la derecha y los dos últimos hacia la izquierda) el lado de escape. Panel II. Las proporciones de animales que persisten en la primera elección, a lo largo de los ensayos, es significativamente diferente a la que se obtendría en el caso de elecciones tomadas al azar en cada ensayo (2 Pearson, * P<0,05, ** P<0,01).

5. ¿Por qué los animales repiten la primera respuesta? Naturaleza de las elecciones consecutivas.

5.1. Efecto de las asimetrías morfológicas

Luego de observar que los animales repiten en cada ensayo consecutivo la primera elección, nos preguntamos si esto podía ser debido a algún tipo de asimetría morfológica individual. Por ejemplo, en el caso de los cangrejos violinistas que poseen una quela mucho más grande que la otra, la huida es efectuada siempre en dirección a su quela más pequeña, de modo tal que la de mayor tamaño queda orientada hacia el estímulo visual de peligro. En el caso de *Neohelice*, los individuos suelen enfrentarse en contiendas donde alguno de los oponentes frecuentemente pierde una de sus quelas. Si bien la quela perdida se regenera

gradualmente, es común encontrar animales que presentan una asimetría en el tamaño de las mismas. Por lo tanto, quisimos investigar si había alguna correlación del lado elegido para escapar, y el tamaño de las quelas.

El análisis de los resultados de un experimento donde medimos el tamaño de ambas quelas de cada individuo normal (individuos sin evidencia clara de encontrarse en estado de regeneración de una de sus quelas) y evaluamos su preferencia por el lado de escape reveló que el 48% escapó hacia el lado de la quela más pequeña (N=44, χ^2 Pearson, P=0,76). En conclusión, la preferencia individual por el lado de escape no se explica por la pequeña asimetría que en *Neohelice* puede existir en el tamaño de sus quelas.

Luego de descartar que las eventuales asimetrías en el tamaño de las quelas puedan afectar la elección de lado de escape, consideramos la posibilidad de que existiera otro tipo de asimetría, que pudiera estar determinando la consistencia de la elección.

5.2. Lateralización en la Toma de decisiones.

Estudios recientes muestran que existen claras asimetrías del tipo “derecha-izquierda” para el desempeño de tareas conductuales tanto en vertebrados como en invertebrados (Chirlanda y col, 2009, Frasnelli 2013). En muchas especies, coexisten los individuos lateralizados a izquierda y a derecha, pero en números desiguales. En los humanos, por ejemplo la proporción de diestros sobre zurdos es de 9/1 (“lateralización a nivel poblacional”). Se ha argumentado que la lateralización del cerebro aumenta la eficiencia a nivel individual (por ejemplo, evitaría la duplicación innecesaria de los circuitos neuronales y reduciría la interferencia entre las funciones), contrarrestando así las desventajas ecológicas de los sesgos laterales en la conducta (como por ejemplo, hacer más predecible el comportamiento individual a otros organismos).

Dado que la existencia de lateralización a nivel individual es una de las posibilidades para explicar la repetición de elecciones que implican derecha vs. izquierda en la mayoría de los individuos de la población, decidimos explorar si este era el caso para la elección de la dirección de escape en *Neohelice*. Para poner a prueba dicha hipótesis, diseñamos una serie de

experimentos que son los más utilizados en la bibliografía para evidenciar la existencia de asimetrías constitutivas individuales en la toma de decisiones.

La bibliografía sobre animales que exhiben algún tipo de lateralización de una respuesta comportamental, muestra que existe un amplio consenso en cuanto al tipo de pruebas a realizar para apoyar dicha hipótesis (Bisazza y col., 1989, Castellano y col., 1989; Kight y col., 2008). La primera evidencia de una posible lateralización, surge de la observación de una repetición en la elección de algún tipo de respuesta ante sucesivas presentaciones de un estímulo. A partir de ahí, se realizan básicamente 2 tipos de experimentos: de eficiencia de la elección y perdurabilidad temporal de la elección.

A) Experimento de Eficiencia. Este experimento se propone evidenciar una diferencia en la eficiencia en la respuesta comportamental del individuo hacia el lado elegido predominantemente, lo que haría a esa opción la alternativa más adaptativa. En el caso de *Neohelice*, esto podría mostrarse a partir de un mejor desempeño en la respuesta de escape hacia el lado elegido, como ser una mayor intensidad o una menor latencia en la respuesta hacia un lado u otro. Para esto evaluamos primero la preferencia de lado de escape ante el estímulo dorsal en cada individuo. Luego, evaluamos la eficiencia en la respuesta de escape a cada lado presentando loomings en ambos laterales dado que estos, a diferencia del estímulo dorsal, evocan una respuesta más intensa y rápida.

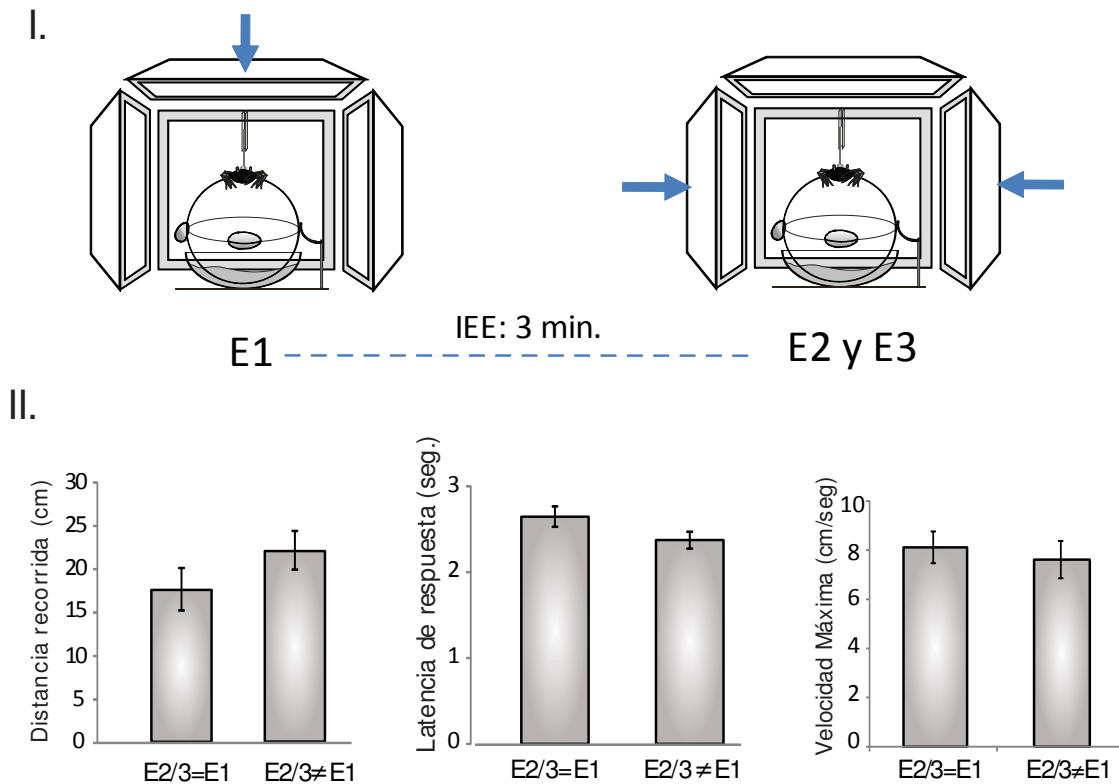


Figura 17. Eficiencia de la respuesta de lado de escape en *Neohelice*. Panel I. A cada individuo se le presentó en el ensayo 1 un estímulo looming dorsal, y de manera consecutiva en el ensayo 2, un estímulo looming en alguno de los laterales (asignado al azar) seguido de un ensayo 3 en el lateral opuesto. Panel II. Un análisis cuantitativo de las respuestas obtenidas, muestra que la intensidad de la respuesta para los casos donde en los ensayos 2 o 3 (E2/3) la respuesta que se indujo hacia el mismo lado que en el E1, o hacia el lado opuesto, son ligeramente diferentes ($N=37$, T test pareado, $P=0,04$). De manera similar, no se observan diferencias en la latencia de la respuesta cuando el escape del E2/3 se efectúa hacia el lado elegido en el ensayo 1 ($N=37$, Test de T pareado, $P= 0,09$), ni en la velocidad máxima alcanzada ($N=37$, Test de T pareado, $P=0,31$).

En el caso del experimento de eficiencia, los resultados muestran que cuando utilizando el looming lateral se induce al animal a escapar hacia el lado previamente elegido ante el looming dorsal, la respuesta casi no difiere de la que se obtiene cuando se lo induce a escapar hacia el lado no elegido previamente (fig. 17). Estos resultados indican que la preferencia de lado que tuvieron frente al looming dorsal no está asociada a una mayor eficiencia para ejecutar la respuesta hacia ese lado.

B) Experimento de Repetición de la respuesta a largo plazo: Un resultado que apoyaría la hipótesis de la existencia de una predeterminación por el lado de escape, es la repetición de la misma elección en dos ocasiones similares pero distanciadas en el tiempo. Ese resultado descarta que la respuesta tenga algún tipo de condicionamiento o dependencia temporal con la efectuada anteriormente, que podría concebirse como una estrategia comportamental de corta duración adoptada en base a la experiencia inmediatamente previa. Para evaluarlo, repetimos la presentación del estímulo dorsal a cada animal luego de 24 hs, período durante el cual los animales permanecieron aislados e individualizados en frascos.

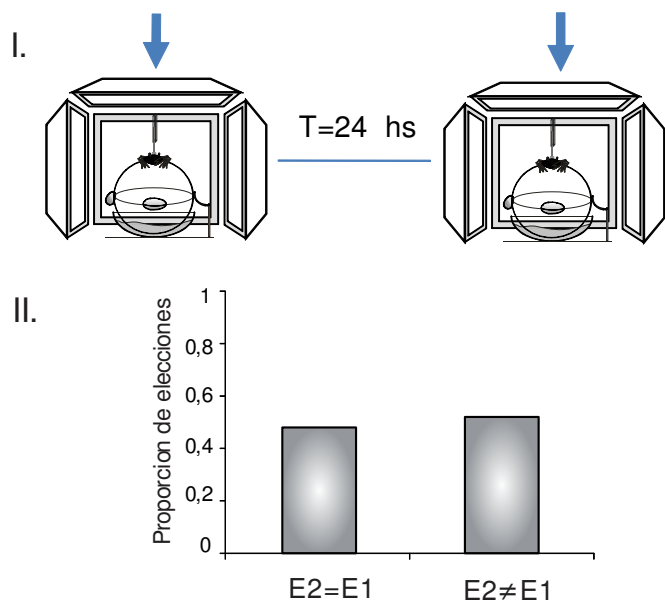


Figura 18. Repetición de la respuesta de lado de escape. I. Los animales fueron desafiados con un looming dorsal en dos ensayos distanciados 24 hs. II. Las respuestas de lado de escape del E1 (primer ensayo) y E2 (segundo ensayo, al día siguiente) fueron analizadas. Se observa que una proporción similar de animales repiten la elección del primer ensayo, o cambian la preferencia del lado de escape (N= 25, 2 de Pearson, P=0,77).

En el experimento para evaluar perdurabilidad de la respuesta, al repetir el estímulo dorsal a las 24 hs, los resultados fueron concluyentes: al día siguiente, los animales no mantuvieron la elección por lado de escape que habían hecho el día anterior (fig. 18).

En conjunto, los resultados de estos experimentos no apoyan la existencia de una lateralización funcional constitutiva en la decisión de lado de escape en *Neohelice*.

6. Discusión

Durante la primera fase de la presente tesis, logramos ajustar las condiciones necesarias para poner a punto un paradigma de Toma de Decisiones en *Neohelice granulata*. Logramos controlar los parámetros óptimos para lograr una condición del paradigma que fuera robusta y repetible. Esto nos permitió explorar algunos de los parámetros que afectan la elección de lado de escape ante una situación que ofrece dos alternativas.

Es importante recalcar que para el looming que tiene una aproximación dorsal, los animales de todos los grupos analizados a lo largo de esta tesis mostraron un patrón de trayectorias de escape similares al ilustrado en figura 12.

Las intensidades en los escapes fueron menores para el caso del estímulo que se aproxima desde el campo dorsal, y mostraron una latencia mayor para iniciar el escape, en comparación a las respuestas al looming lateral.

Una mayor latencia para responder escapando, como la que se observa ante el looming dorsal, puede interpretarse como indicativo de un proceso de toma de decisiones que requiere mayor tiempo de procesamiento. Mientras que en el caso de una amenaza que se aproxima de manera lateral, el lado ‘correcto’ hacia donde escapar resulta altamente predecible, lo que sugiere un procesamiento bastante directo, en nuestro caso, ante el looming dorsal los individuos se enfrentan a una situación donde cualquiera de los dos lados son opciones en principio igualmente válidas. Esto implicaría que el procesamiento de esa decisión tiene una complejidad mayor que, por consiguiente, requiere de más tiempo de procesamiento.

Comportamiento persistente en la elección de lado de escape: ¿Lateralización, preferencias innatas o evitación del riesgo?

Cuando hacemos un análisis grupal de la toma de decisiones ante el estímulo looming presentado en el campo dorsal, vemos que hay una proporción equilibrada de escapes hacia uno u otro lado del dispositivo. A nivel individual vemos que en ensayos repetidos cada 3 minutos, los animales repiten la primera elección.

Como vimos en los experimentos donde evaluamos una posible lateralización del lado de escape en estos cangrejos, no parece haber, a nivel individual, ninguna predisposición a

elegir uno u otro lado de escape, no al menos una que se sostenga de un día al siguiente. Además, a nivel grupal, la proporción de escapes a ambos lados es balanceada. ¿Qué significado a nivel ecológico-evolutivo puede tener la impredecibilidad de este comportamiento? Si lo pensamos desde el punto de vista de un posible “predador” que se aproxima desde el campo visual dorsal, acercándose hacia un grupo de cangrejos que se encuentra en la playa, este tipo de estrategia de escape grupal sería enormemente adaptativo. Una situación similar ante un evento predatorio en el hábitat natural de estos animales, enfrentaría al predador a una toma de decisiones compleja que retrasaría lo suficiente la última fase del ataque, ya que la elección del lado de escape de cada cangrejo resultaría impredecible.

Dado que la repetición de la respuesta a nivel individual se da para el caso donde el intervalo entre ensayos es de 3 minutos, pero no al día siguiente, resta aun explorar si se trata de algún tipo de repetición que se da únicamente a corto término, y por qué sucede.

La falta de consistencia en las elecciones a lo largo de los días podría ser explicada como una respuesta adaptativa a un contexto ambiental variable. Si bien los experimentos de esta tesis fueron realizados en un contexto controlado, cabe mencionar que luego de 24 hs, los animales podrían encontrarse en un estado interno diferente, y también podrían estar detectando leves diferencias no detectadas por el experimentador.

Otra alternativa posible, y quizás más interesante dentro del marco teórico en el que se encuentra esta tesis, es que en el caso de las presentaciones repetidas del estímulo a corto término, los animales estén llevando a cabo una estrategia del tipo “win & stay” (gano y conservo esa elección), dado que, ante la primera presentación de la amenaza visual, *efectivamente* no sufrieron un impacto al escapar hacia el lado elegido en el ensayo 1. Entonces, la decisión más conservadora podría ser seguir apostando a ese lado. Este tipo de estrategias de toma de decisiones se enmarca en lo que se conoce como “estrategias explotación-exploración”, donde los animales o bien se quedan con la primera elección que resulta con un *resultado* positivo, o bien exploran las demás alternativas, con el riesgo de que alguna presente un *resultado* negativo (Townsend y col., 2011, Louie, 2013). En el caso de nuestro paradigma con el cangrejo, el refuerzo positivo inherente a la elección de uno de los

lados es que escapando hacia ese lado el animal no sufrió ningún daño, es decir, logro evitar el ataque del estímulo de peligro.

*Entonces, ¿qué parámetros toma en cuenta *Neohelice* para tomar la primera decisión?*

Con respecto a la primera elección sobre la dirección de escape ante el looming dorsal, los resultados parecen sugerir que no se trata de una respuesta predeterminada sino que, en nuestras condiciones, podría estar modulada por claves actuales presentes en el entorno, o por algún tipo de experiencia previa ante estímulos peligrosos en su hábitat.

En los siguientes capítulos, exploraremos en mayor detalle el efecto que tiene el contexto visual en esta toma de decisiones, y la capacidad de *Neohelice* para aprender a elegir escapar hacia un lado en particular.

Sección 3.

Resultados.

Capítulo 2

*Influencia de las claves contextuales y la percepción
binocular sobre la elección del lado de escape*

1. Claves visuales que afectan la toma de decisiones.

En la naturaleza, cuando un cangrejo es amenazado por la presencia de un predador y debe decidir hacia donde huir, además de tener en cuenta la posición del predador toma en cuenta información contextual, como por ejemplo la disponibilidad de refugios cercanos (Hemmi y Zeil 2003ab; Hemmi y Tomsic 2014).

En los experimentos del laboratorio resulta imposible recrear las condiciones del ambiente natural. No podemos, por ejemplo, traer las cuevas que los cangrejos construyen y utilizan como refugio. Aun así, en el paradigma de decisión por el lado de escape que hemos desarrollado, parece posible investigar algunas de las características del contexto en que se efectúa esta toma de decisiones, de modo de poder indagar sobre qué otra información, además de la locación del estímulo, el animal puede tomar en consideración para optar por correr hacia uno u otro lado. En los siguientes experimentos exploramos el efecto de algunas claves contextuales visuales que, por ser conspicuas en el entorno natural, podrían ser ecológicamente relevantes en el comportamiento de escape de los cangrejos. En estos experimentos los monitores que rodean al animal presentan claves visuales con una configuración simétrica o asimétrica, y evaluamos las respuestas durante el período exploratorio (previo a la estimulación) y la elección de lado de escape (durante la expansión del looming).

1.1. Respuestas de escape en distintos contextos visuales.

a) Luminosidad.

En el capítulo anterior mostramos como responden los animales al looming dorsal en el caso donde los monitores laterales están en blanco. Antes de comenzar a analizar las respuestas ante contextos visuales asimétricos, decidimos investigar la elección por el lado de escape en condiciones donde los monitores laterales se presentaban apagados. Comparamos entonces dos situaciones simétricas de iluminación, donde los monitores laterales se presentan como un fondo homogéneamente luminoso blanco (300 mWatts/m^2), o como fondo homogéneamente oscuro (3 mWatts/m^2). Utilizamos dos grupos distintos, y cada individuo

fue sometido al looming dorsal en una de las dos condiciones. En la figura 19 se muestra los resultados de las elecciones de lado de escape en cada una de las condiciones.

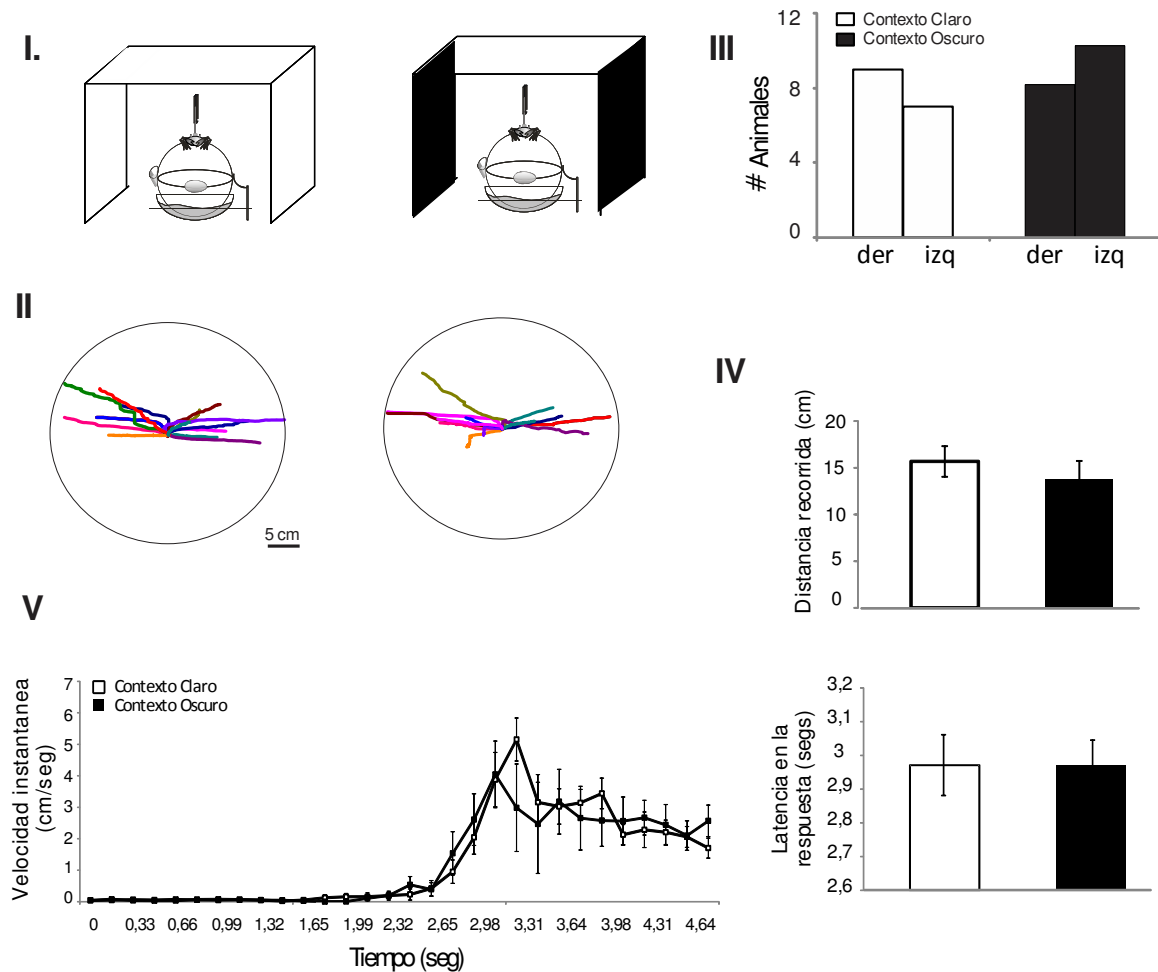


Figura 19. Respuesta de los animales ante el estímulo looming dorsal, en un contexto totalmente iluminado o totalmente oscurecido. Panel I. Configuración del contexto en el que se encuentran los animales durante los ensayos. Cuando se inicia cada ensayo, se enciende el monitor dorsal, donde ocurrirá la expansión del estímulo looming, y los monitores laterales se mantienen con un contexto claro u oscuro. Panel II. Las trayectorias de escape de los animales que responden al looming en ambos contextos, es similar. Panel III. Un análisis cuantitativo muestra que las elecciones hacia ambos lados son balanceadas para ambos grupos. (Contexto claro $n=16$, 2 Pearson, $P=0,72$, Contexto oscuro $n=18$, 2 Pearson, $P=0,73$). Panel IV. Tanto la intensidad de la respuesta de escape, como la latencia en iniciar el escape, no muestran diferencias significativas para ambas condiciones (Intensidad: Test T no pareado de dos colas, $P=0,46$, Latencia: Test T no pareado de dos colas, $P=0,99$). Panel V. La dinámica de escape no muestra diferencias entre ambos grupos, alcanzándose valores de velocidad máxima que no son estadísticamente distintos. ($t:3,1$ segs; Test T no pareado, $P=0,063$).

Los resultados muestran que tanto para la configuración de contexto “Claro” como el contexto “Oscuro”, las elecciones por el lado de escape se encuentran balanceadas en similar proporción (ver fig. 19, panel III). Otros parámetros de la respuesta como la dispersión de las trayectorias, la distancia recorrida, la latencia, y el curso temporal del escape y la velocidad máxima alcanzada, también fueron similares en ambas condiciones contextuales (panel II, IV y V respectivamente).

Además, para corroborar en la condición de los monitores oscuros lo que observamos con respecto a la consistencia de elecciones repetidas (capítulo 1, sección 4), cada individuo fue evaluado frente a 3 presentaciones consecutivas del looming dorsal. Los resultados previos, en donde encontramos que los animales persisten en la elección del mismo lado en más de un 70 % de las veces durante cuatro ensayos consecutivos, podrían eventualmente deberse a algún tipo de señal visual no detectada por nosotros (algún reflejo en los monitores por ejemplo) que le sirviera de clave al animal para continuar guiando su elección de ensayo a ensayo. De ser así, una evaluación con los monitores oscuros debería mostrar una alteración en la persistencia por la elección del lado.

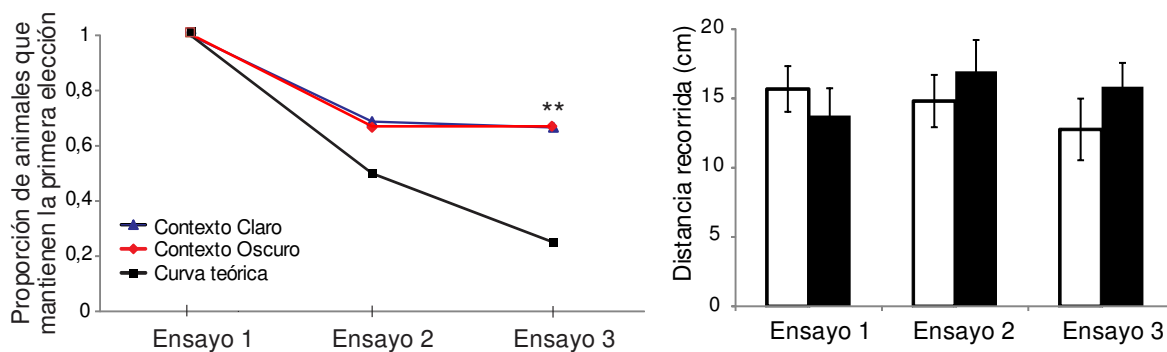


Figura 20. Elecciones en ensayos consecutivos, en distintos contextos simétricos. El gráfico de la izquierda muestra que en los grupos evaluados, un 66% de los animales insiste en la misma elección de lado de escape durante las 3 presentaciones del estímulo, ya sea en un contexto de luminosidad o de oscuridad total, lo cual es un desvío muy significativo en comparación a una elección idéntica en 3 ensayos consecutivos realizada al azar ($N(\text{Contexto claro})=16$, 2 Pearson, $P(E2)=0,28$, $P(E3)=0,02$; $N(\text{Contexto oscuro})=18$, 2 Pearson, $P(E2)=0,31$, $P(E3)=0,01$, comparación contra la curva teórica de elecciones consecutivas independientes). El gráfico de la derecha muestra el análisis cuantitativo de la intensidad de la respuesta en ambas condiciones, que muestra que no hay diferencias en este parámetro de la respuesta de escape, en contextos simétricos de distintas luminosidades (Test T no pareado, $P(E1)=0,46$, $P(E2)=0,46$, $P(E3)=0,27$).

Los resultados muestran que en contextos simétricos, ya sea con los monitores laterales iluminando el contexto (monitores en blanco) o en oscuridad total (monitores en negro), los animales repiten la misma elección que en el primer ensayo: durante 3 presentaciones consecutivas, el 66% de los animales persiste en el lado elegido en el primer ensayo (ver gráfico de la izquierda, fig. 20). Los resultados son idénticos para los grupos con configuraciones contextuales en luminosidad u oscuridad total, con lo cual concluimos que la luminosidad en los monitores laterales no sería un factor que influya en la persistencia de la elección de lado de escape. Tampoco se observan diferencias en la intensidad de la respuesta evocada por el estímulo de peligro en ambos contextos, en ninguno de los ensayos (grafico de la derecha, fig. 20).

El resultado suma evidencias a la hipótesis de que la persistencia en la respuesta esté basada en una estrategia comportamental del tipo “*win & stay*”, luego del primer ensayo. Luego de investigar como la presencia o ausencia de luz proveniente de los monitores laterales en forma simétrica afectaba la elección del lado de escape y la repetición de la misma, procedimos a generar un contexto visual asimétrico, donde un monitor lateral estaba apagado y el otro monitor encendido, mientras los animales eran desafiados con el looming en el monitor dorsal. El grupo “Contexto asimétrico”, se comparaba con un grupo control que se enfrentaba al looming dorsal con ambos monitores laterales encendidos (ver figura 21).

Los resultados fueron contundentes. Casi todos los animales (el 94%) eligieron escapar hacia el lado de mayor luminosidad (monitor encendido) (fig. 21), evidenciando así que la luminosidad es una clave visual que afecta de forma drástica la elección, haciendo sumamente predecible el comportamiento de los animales en esta situación.

En la mitad de los casos el monitor en blanco fue el de la derecha y en la otra mitad fue el de la izquierda. Para mayor claridad, en la figura del panel II (grafico de la izquierda) las respuestas obtenidas en la condición de monitor blanco a la izquierda fueron rotadas especularmente. Como era de esperar, la proporción de elecciones hacia izquierda o derecha en la condición de luminosidad simétrica no fue significativamente diferente.

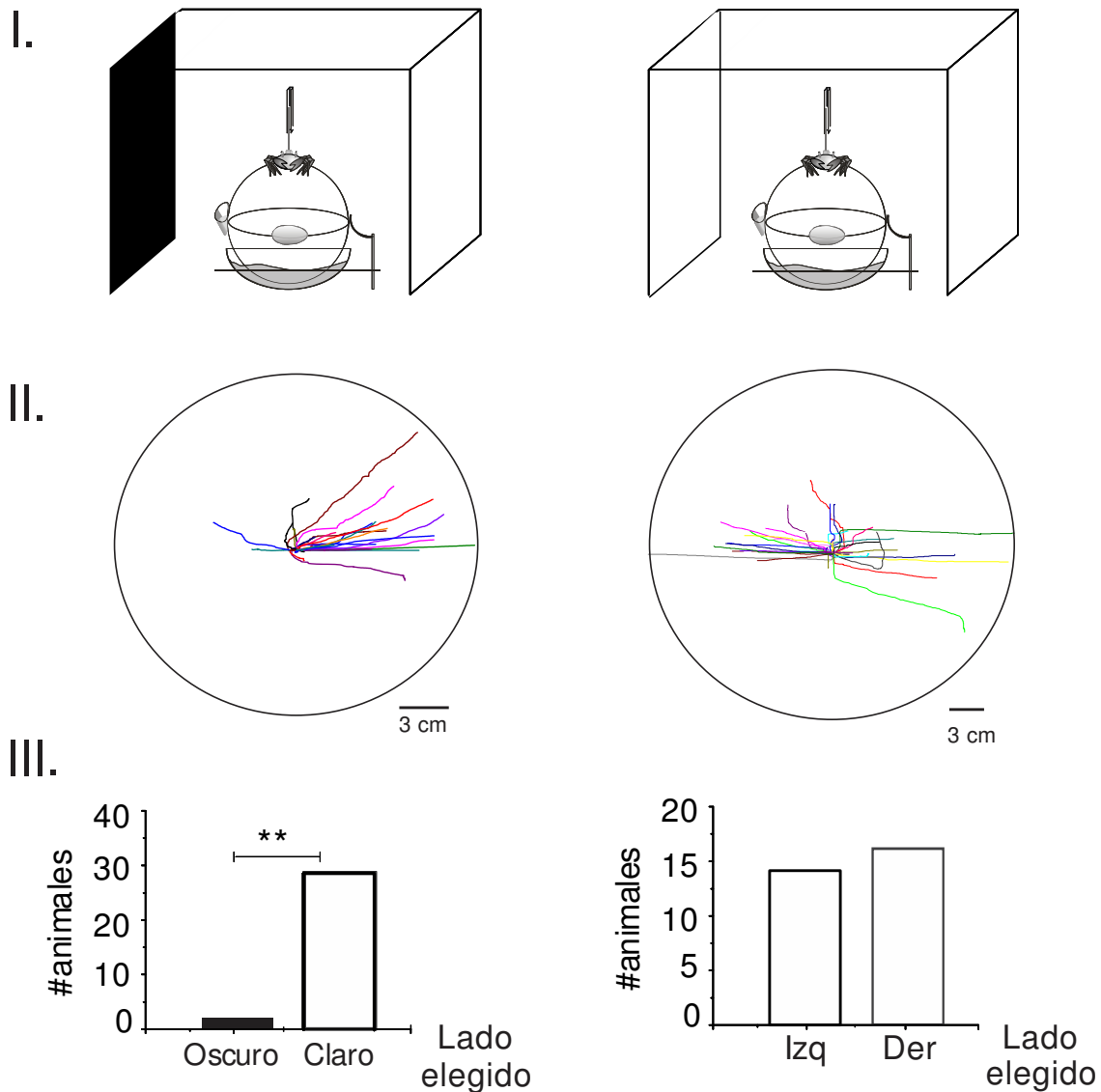


Figura 21. Elección del lado de escape en configuraciones contextuales simétricas o asimétricas. Panel I. Configuración del contexto en el que se presentó el estímulo looming dorsal. El esquema de la izquierda muestra un contexto asimétrico, con un lado apagado (lado izquierdo) y uno encendido con fondo en blanco (lado derecho), y el esquema de la derecha muestra un contexto simétrico (ambos lados con los monitores encendidos). Panel II. Trayectorias individuales de los animales durante el escape evocado ante el estímulo looming dorsal, en ambas configuraciones contextuales (N=31). Panel III. Análisis del número de animales que eligieron escapar hacia uno de los lados en ambas configuraciones visuales del contexto (χ^2 Pearson, Contexto asimétrico : $P < 0,01$, Contexto simétrico, $P = 0,71$).

b) *Patrones combinados.*

A partir de la claridad del resultado anterior, quisimos saber si una condición en la que la parte superior del horizonte visual estuviese iluminado y la inferior a oscuras (i.e. una

situación más congruente con la condición natural) en oposición a una condición en donde lo iluminado fuese la parte inferior, podría afectar la decisión por el lado hacia el cual escapar. La condición experimental se representa en la figura 22. Vale aclarar que, a diferencia de lo que ocurría en el experimento anterior, en esta condición la luminosidad general a cada lado del animal es aproximadamente la misma.

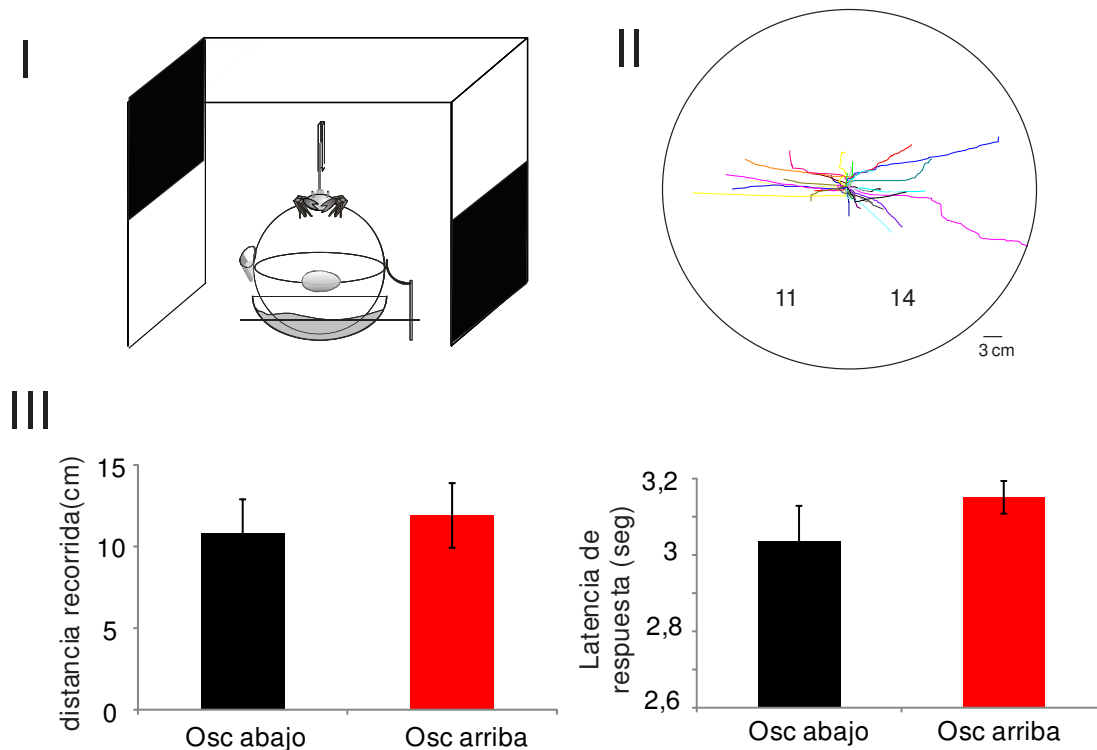


Figura 22. Elección de lado de escape en un contexto visual con patrones combinados. Panel I. Configuración del contexto visual donde se presentó el looming dorsal, con el lado derecho con una mitad superior oscurecida, y el lado derecho con la mitad inferior oscurecida. Panel II. Trayectorias individuales del grupo de animales desafiados (N=25). Panel III. Distancia recorrida durante el escape entre ambos grupos (Osc. abajo n=13, Osc. Arriba n=10, Test T no pareado, P=0,72, y latencia de respuesta ante el estímulo dorsal entre ambos grupos (Test T no pareado, P=0,31).

Para nuestra sorpresa, los resultados muestran que la misma proporción escapa hacia ambos lados (panel I, Fig. 22). Un análisis cuantitativo del momento en que cada animal efectúa la decisión y la distancia con que escapan hacia cada uno de los patrones, es similar (panel III, Distancia: test T, P=0,72, latencia: test T, P=0,31).

c) *Contexto con Barras*

En la naturaleza, cuando los cangrejos se encuentran amenazados por algún predador y están lejos de su cueva, suelen correr hacia un arbusto, una piedra o cualquier otro objeto que se alce verticalmente por sobre el sustrato esencialmente plano en el que habitan. Estudios en *Drosophila* (Maimon y col., 2008) muestran que estos animales se orientan hacia objetos elongados verticalmente. Con estos antecedentes decidimos investigar si en la situación de decidir hacia qué lado escapar, la presencia de una barra orientada verticalmente frente a una orientada horizontalmente ejercía algún efecto (Figura 23). La ubicación de las barras horizontales y verticales eran intercambiadas entre ambas pantallas de modo de obtener como siempre grupos con estímulos balanceados entre ambos lados.

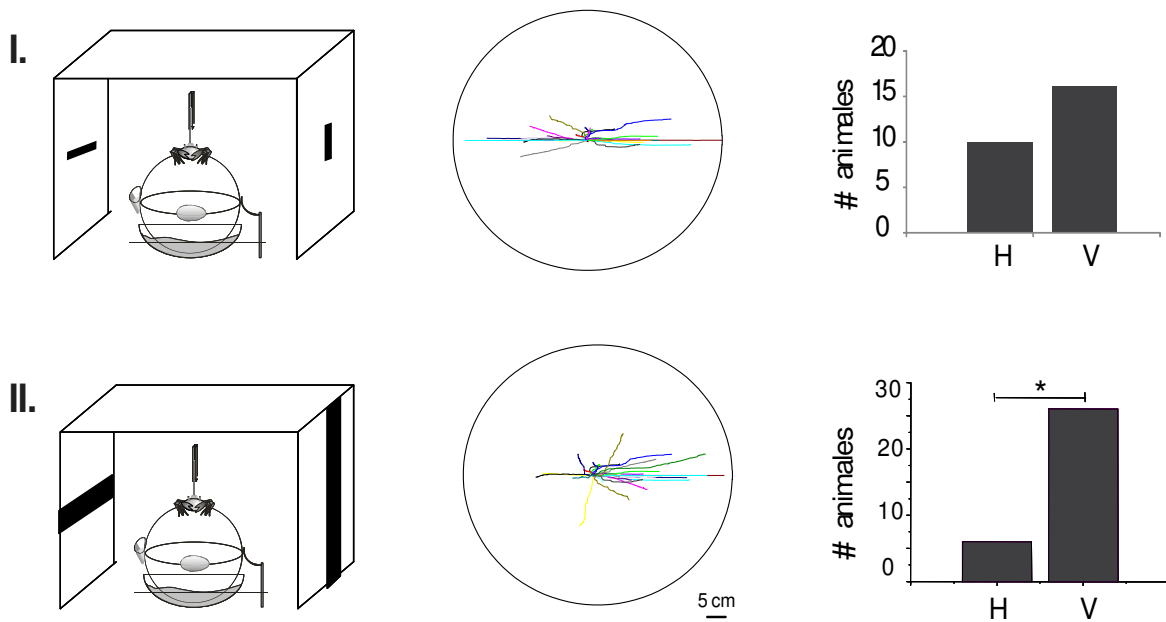


Figura 23. Elección del lado de escape en un contexto visual con barras. Panel I. Ante un entorno con barras verticales y horizontales pequeñas (10 cm x 3 cm), los animales no muestran una preferencia en la elección de lado de escape (N=25, 2 Pearson, P=0,23). Panel II. Ante un contexto con barras horizontales y verticales grandes (25 cm x 5 cm), los animales exhiben una preferencia hacia el lado con la barra vertical al escapar ante el estímulo dorsal (N=31, 2 Pearson, P<0,01).

El primer experimento lo realizamos con barras de tamaño pequeño (10 cm x 3 cm) que subtienden un tamaño aparente de $26,5^\circ \times 8,5^\circ$. Aunque los resultados muestran que una

mayor proporción de animales se inclinó por correr hacia el lado de la barra vertical, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($N=25$, 2 Pearson, $P=0,23$). Decidimos entonces utilizar barras de tamaño más conspicuo (26cm x 5cm) que subtendían ángulos de 52° x 14° . Los resultados confirmaron la tendencia observada con las barras más pequeñas, mostrando ahora una diferencia estadísticamente significativa en la proporción de animales que se decidieron por escapar hacia la barra vertical ($N=31$, 2 Pearson, $P<0,01$).

d) Vector de Polarización de la luz

Otra clave del contexto de la cual se sirven los cangrejos en el ambiente natural para orientarse y guiar su comportamiento locomotor es el plano de polarización de la luz (Zeil y Hofmann, 2001). Decidimos entonces realizar una serie de experimentos para evaluar si el plano de polarización podía ejercer algún efecto sobre la decisión del lado de escape en las condiciones de nuestro paradigma experimental. Para ello utilizamos filtros polarizadores colocados por delante de los monitores laterales, uno de los cuales orientamos de manera de permitir el paso de luz polarizada solamente en el plano horizontal y el otro solamente en el plano vertical (Figura 24). En dos experimentos también utilizamos filtros para polarizar la luz proveniente del monitor dorsal. En estos casos se usaron dos filtros uno sobre cada mitad del monitor, cuyos ángulos de polarización eran ortogonales. La disposición de los filtros y los resultados de cada uno de los experimentos de esta serie se ilustran en la figura 24. En el primer experimento se colocaron los filtros solamente sobre los monitores laterales mientras en el segundo se los colocó solo en el superior.

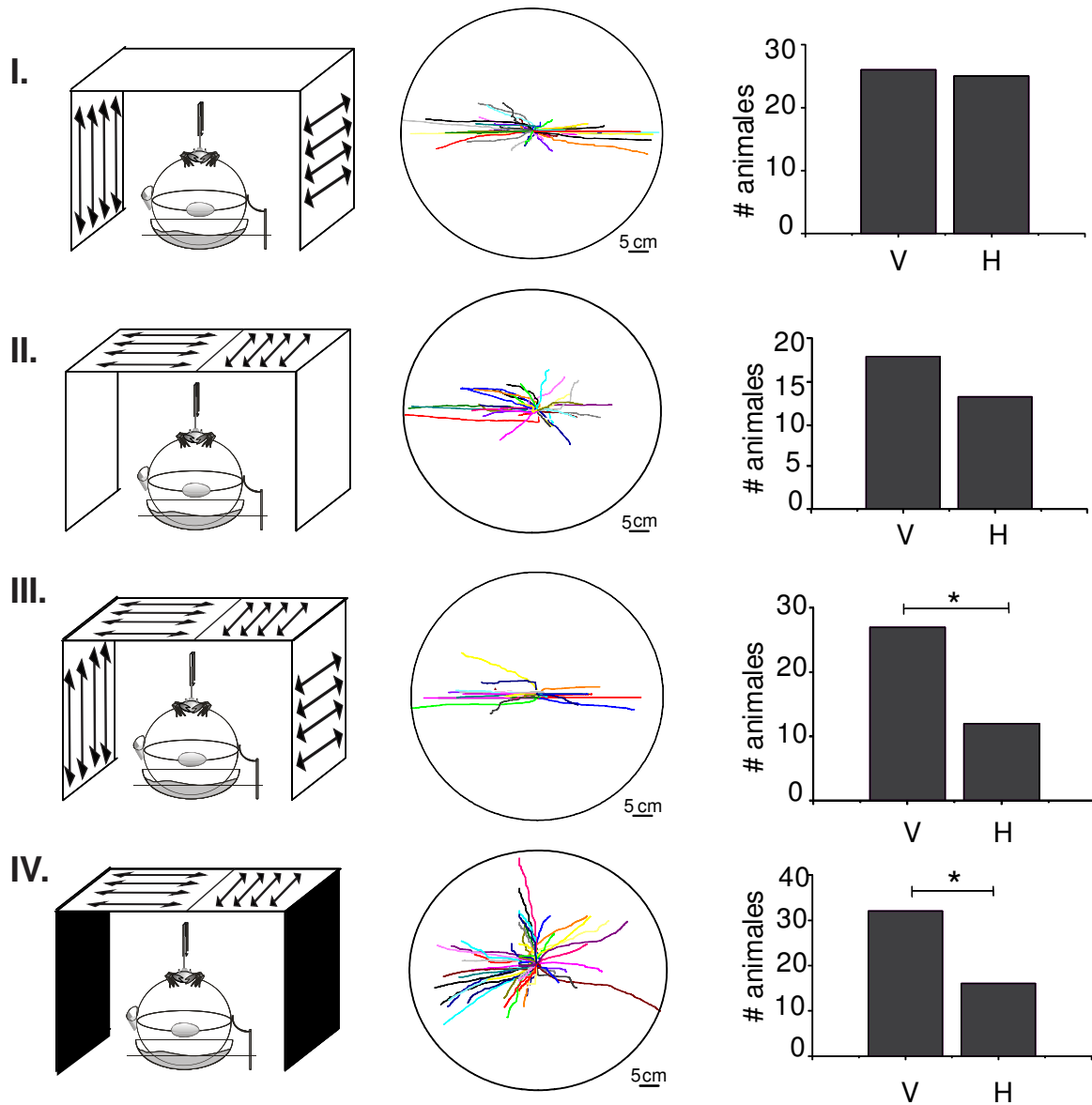


Figura 24. Elección del lado de escape ante el estímulo dorsal en contextos visuales con distintas configuraciones de polarización de la luz. Panel I. En un contexto donde la luz proveniente de los laterales esta vertical vs horizontalmente polarizada no se ve una elección preferida en el grupo de animales entre ambos lados de escape (N=51, χ^2 Pearson, P=0,77). Panel II. Cuando los monitores laterales se encuentran encendidos sin filtros polarizadores, y la luz proveniente del monitor dorsal se encuentra en una mitad polarizada en un plano y en la otra en el plano ortogonal, no hay diferencias significativas en las elecciones (N=33, χ^2 Pearson, P=0,48). Panel III. Cuando toda la luz proveniente de los monitores laterales y dorsal se polarizó utilizando filtros, ambas mitades de manera ortogonal, una proporción significativa de animales prefiere escapar hacia el lado con un ángulo de polarización vertical en el lateral y transversal (al animal) en el dorsal (N=37, χ^2 Pearson, P<0,01). Panel IV. Cuando se apagan los monitores laterales se obtienen resultados similares al panel anterior, aun cuando se polariza únicamente la luz proveniente del monitor dorsal: hay más animales que prefieren escapar hacia el lado con una polarización trasversal de la luz (N=48, χ^2 Pearson, P<0,01).

Como se puede observar en ninguna de las dos condiciones se produjo un efecto estadísticamente significativo sobre la elección del lado de escape de los animales (fig. 24, panel I y II). En el tercer experimento, donde se colocaron filtros tanto en los monitores laterales como en el superior (fig. 24, panel III), sí se pudo observar un efecto significativo sobre la elección por el lado de escape, prefiriendo los animales escapar hacia el lado de donde la luz provenía polarizada en el plano vertical (y trasversal al animal para el monitor dorsal). Finalmente, la última condición, consistente en polarizar ortogonalmente las dos mitades solamente del monitor dorsal, pero con los monitores laterales a oscuras, mostro también proveer información efectiva para inclinar la decisión de los animales por escapar hacia el lado desde donde la luz provenía polarizada en el plano transversal al cangrejo (fig. 24, panel IV). En este último caso también se observa que, en ausencia de un “túnel de luz lateral” por la falta de iluminación procedente de los monitores laterales, hay una mayor dispersión en las trayectorias de escape.

1.2. Actividad exploratoria en distintos entornos visuales.

Con los resultados obtenidos para las claves visuales contextuales analizadas quisimos indagar un poco más acerca del efecto que ejercen las mismas en el comportamiento de estos animales. Otro parámetro interesante de investigar en este caso, donde vemos que el efecto del contexto ejerce una importante influencia en la elección del lado de escape, es la actividad exploratoria, previa al comienzo de la respuesta evocada por el estímulo visual de peligro. Surge la pregunta acerca de si estas alteraciones en el entorno son relevadas únicamente en el momento de tomar una decisión ante un estímulo rápido y peligroso, o si los cangrejos se ven afectados también en otros comportamientos relevantes en el hábitat natural, como por ejemplo la capacidad exploratoria.

Si bien el tiempo previo a la expansión del estímulo (como mostramos en el capítulo 1) es de 2 min y 47 segs, tomamos como tiempo exploratorio válido para el análisis los primeros 30 segundos ya que observamos que, en una situación control donde todo el entorno lumínico es simétrico, los animales exploran mayormente durante esa franja temporal

(observaciones cualitativas desde el sistema de video). Luego, la mayoría permanece en reposo sobre la esfera hasta que detectan la expansión del looming.

Elegimos analizar como es la exploración en un contexto simétrico y en los tres casos de asimetrías contextuales que mostraron ser los que ejercen efectos más claros, evocando mayores preferencias en los escapes. Las asimetrías contextuales que elegimos son aquellas donde ambos lados del dispositivo presentan las siguientes configuraciones: Barra vertical u horizontal grandes, polarización completa del setup (mitad con la luz polarizada con un ángulo horizontal y la otra mitad vertical) y dispositivo con un lado apagado y el otro encendido.

Se registró la actividad espontánea individual para cada grupo experimental, y se analizaron las caminatas exploratorias durante los primeros 30 segundos en dichos contextos. Se cuantificó el número de animales que se encontraban caminando hacia cada lado y la distancia que habían recorrido.

El análisis de la actividad exploratoria en 3 contextos asimétricos, en comparación con un caso control donde los monitores estaban en blanco, reveló que existe una exploración diferencial en el caso de algunos contextos asimétricos (Figura 25). Hay una mayor proporción de animales que exploran el lado con luz polarizado horizontalmente ($N=35$, χ^2 Pearson, $P<0,001$), si bien como vimos antes, curiosamente la mayoría elige escapar hacia el lado polarizado verticalmente (ver Fig 24). Aunque la diferencia no alcanza a ser estadísticamente significativa ($N=21$, χ^2 Pearson, $P=0,07$), claramente hay una mayor proporción de animales que orientan su actividad exploratoria hacia el lado de la barra vertical. Con respecto a la asimetría de luminosidad, los animales se orientan en igual proporción hacia uno u otro lado ($N=18$, χ^2 Pearson, $P=0,63$). Sin embargo, aquellos que caminan hacia el lado oscuro recorren una distancia estadísticamente mayor ($N=18$, Test T no pareado, $P=0,017$). Nuevamente, el lado explorado con mayor intensidad, no es el lado hacia el que eligen escapar frente al looming.

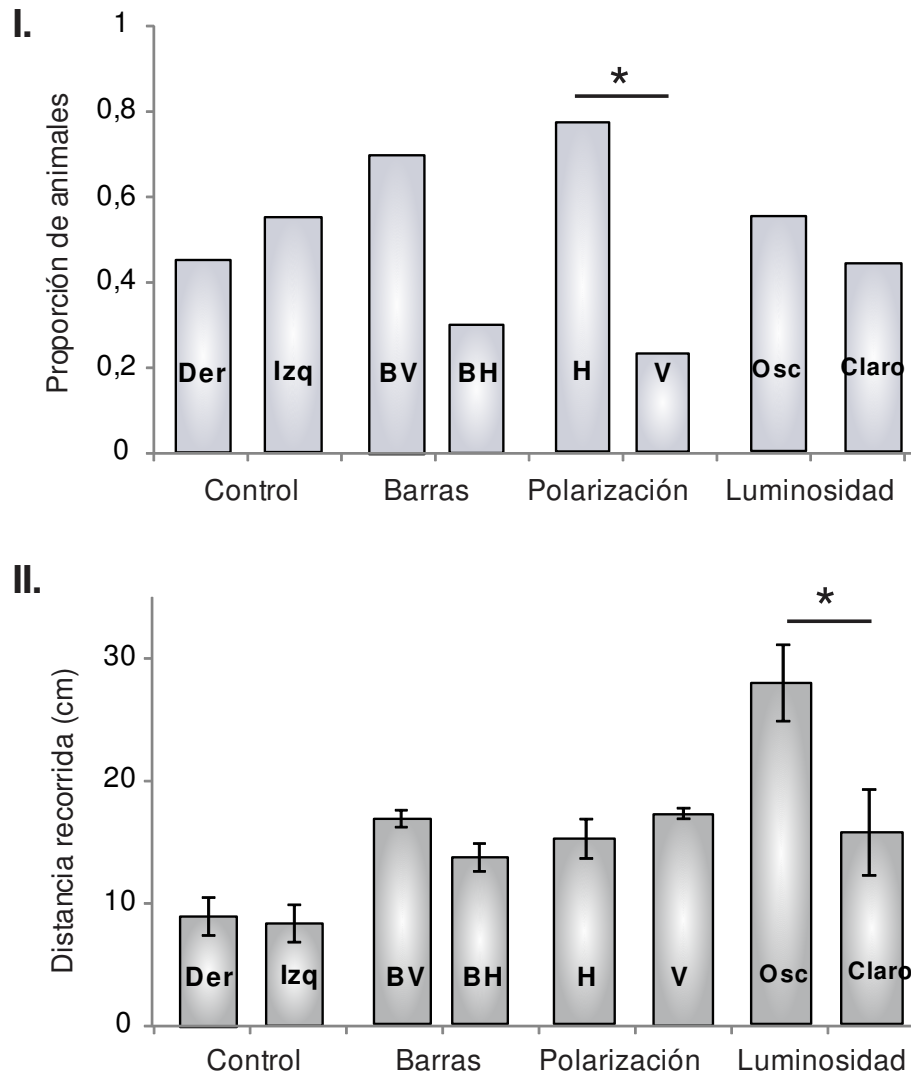


Figura 25. Actividad exploratoria espontánea en contextos visuales simétricos y asimétricos. Panel I. La proporción de animales que exploran uno u otro lado del dispositivo es similar, excepto para el caso del grupo con entorno polarizado asimétricamente, donde una mayor proporción de animales exploró el lado con un ángulo de polarización horizontal (Control N=20, Barras N=21, Polarización N=35, Luminosidad N=18, 2 Pearson, * para $P < 0,05$). Panel II. La distancia recorrida durante la caminata espontánea se ve afectada sólo en el caso de la condición de luminosa asimétrica, donde los animales que exploran el lado oscurecido realizan caminatas más largas (N=18, Test T no pareado, * para $P < 0,05$).

Esto indica que este tipo de claves, usualmente presentes en el habitat natural de los cangrejos, afectan de forma clara el comportamiento exploratorio de estos animales. Los resultados muestran que hay una evaluación diferencial del entorno visual en el que se

encuentran, previo a la decisión de hacia donde van a escapar en estos contextos, aunque no necesariamente la dirección en la que exploran es la misma que en la que escapan.

2. Experimentos de privación monocular.

Habiendo analizado como responden los animales ante el looming dorsal en las condiciones mostradas, quisimos indagar acerca del procesamiento del estímulo que se lleva a cabo para tomar dichas decisiones.

Dado que cada uno de los dos ojos compuestos de los cangrejos posee una visión panorámica de 360°, en principio esto habilita la posibilidad de que la información obtenida desde un único ojo sea suficiente para tomar una decisión sobre la dirección hacia donde escapar. Alternativamente, es posible pensar que la decisión depende exclusiva y necesariamente del procesamiento de la información que se obtiene desde ambos ojos, es decir, que solo se obtenga como resultado de la integración de la información binocular. Para poner a prueba el grado en que la elección del lado de escape depende o es afectado por la visión binocular, diseñamos un experimento de privación monocular anulando la visión de uno de los ojos utilizando pintura negra. En estas condiciones, se realizaron 2 experimentos (Figura 26).

a) Respuesta de animales monoculares a looming laterales.

En el primero, se les presentó el looming desde uno u otro de los monitores laterales en ensayos consecutivos y planeadamente balanceados. Se compararon así las respuestas obtenidas en los ensayos donde los animales recibieron el estímulo del lado de su ojo ocluido con las que se obtuvieron cuando el estímulo provenía del lado de su ojo no ocluido.

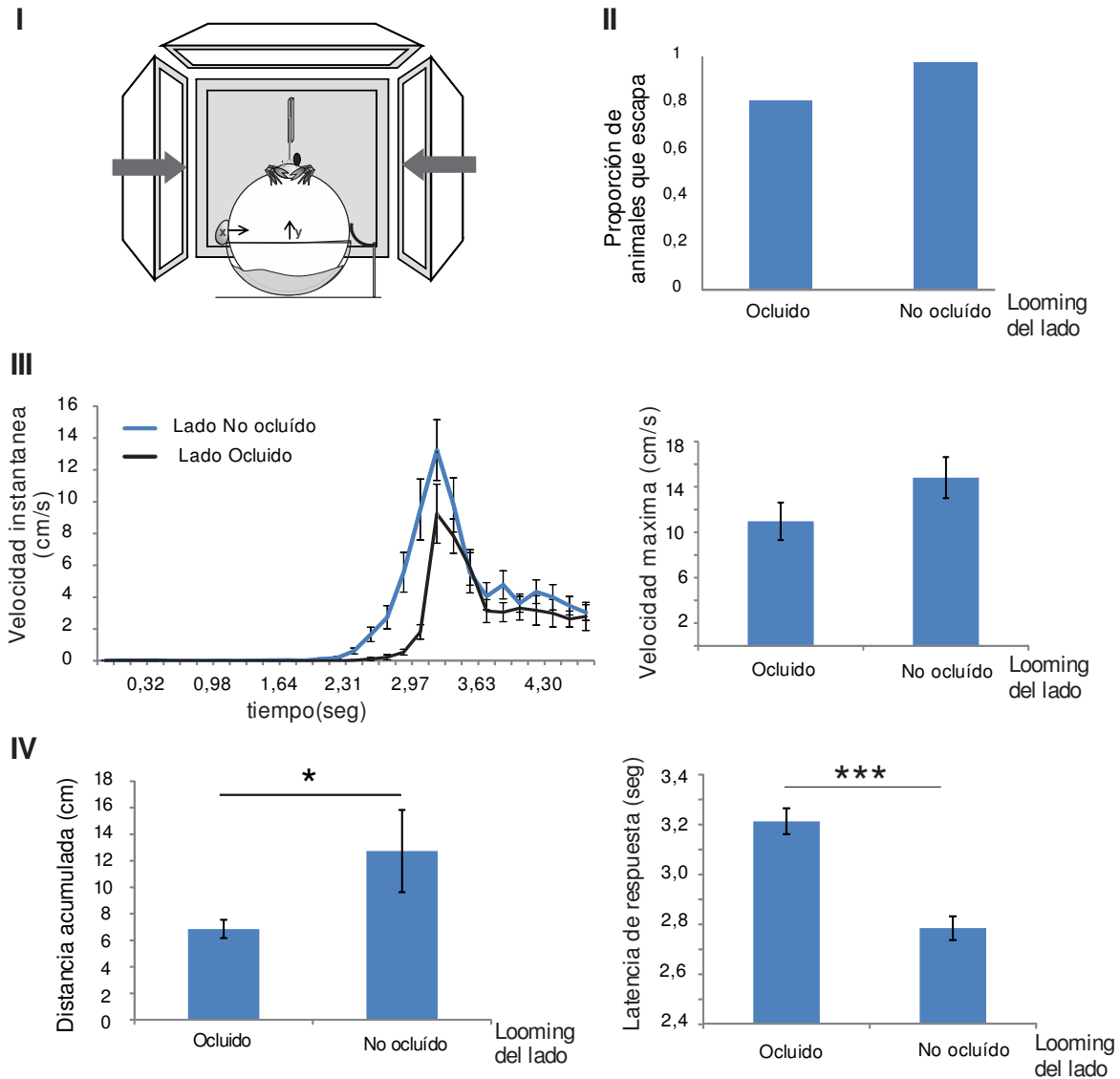


Figura 26. Respuestas ante el estímulo looming lateral, en animales con visión monocular. Panel I. Los animales fueron desafiados con el estímulo looming con aproximación lateral, en un contexto visual con iluminación simétrica. Panel II. Algunos de los animales del grupo desafiado con un looming lateral del mismo lado del ojo ocluido, no escaparon ante el estímulo, a diferencia del otro grupo en el cual escaparon casi la mayoría de los animales (N(lado ocluido)=13, N(lado No ocluido)=15). Panel III. Dinámica de la respuesta de escape en ambos grupos experimentales. Se observa que hay un retraso en la respuesta de escape para el grupo que recibe el looming del lado con el ojo ocluido. No hay diferencias significativas en la velocidad máxima para ambos grupos (Test T no pareado, $P=0,14$). Panel IV. El grupo desafiado con el looming lateral del mismo lado que tenía ocluida la visión, realizó un escape más corto y más tardío que el otro grupo (Distancia acumulada: Test T no pareado, * para $P<0,05$, Latencia de la respuesta: Mann Withney test, *** para $P<0,001$).

Los resultados de la figura 26 muestran que cuando los animales se encuentran privados de la visión de uno de sus ojos cambia la dinámica del escape. Si bien en ambos casos la amplia mayoría de los animales escapan ante el looming lateral y corren hacia el lado contrario a este, cuando el looming se aproxima desde el lado ocluido disminuye ligeramente la proporción de aquellos que efectúan el escape (panel II).

La dinámica del escape es diferente para el caso donde los animales son estimulados desde el lado ocluido, en comparación a cuando reciben el looming desde el lado no ocluido (Panel III). Las diferencias se observan en la distancia total de escape, siendo la misma mayor en el caso del lado no ocluido, y en el momento de iniciar el escape que, en el caso del grupo que recibe el looming del lado no ocluido, es más rápido (Panel IV). Sin embargo, la diferencia en la velocidad máxima alcanzada durante el escape no alcanzó a ser estadísticamente significativa (Panel III), mientras que la dispersión de las trayectorias de escape no pareció verse particularmente afectada.

b) Respuesta de animales monoculares y binoculares a looming dorsal.

En un segundo experimento, evaluamos el lado de escape elegido en animales con un ojo ocluido y en animales control (sin oclusión ocular), al enfrentarlos con un looming dorsal. Luego, con el objetivo de intentar revertir dicha elección, en un segundo ensayo apagamos el monitor del lado que los animales habían elegido. Como ya vimos en el apartado 1.1., al utilizar un contexto asimétrico con un lado apagado se puede predecir que más del 90% de los animales eligen escapar hacia el monitor más claro. Resulta por lo tanto interesante evaluar la interacción que esta condición pueda tener sobre la condición de visión monocular.

Como se puede observar en la figura 27, la respuesta de los animales ante el looming dorsal se vio afectada de manera sorprendente en los animales con visión monocular. A diferencia de los animales binoculares que responden según lo esperado en un entorno simétrico en aproximadamente igual proporción hacia cada lado, los animales con privación monocular escapan en una alta proporción hacia el lado del ojo ocluido (ver Panel I). Esto resultó sorprendente por dos motivos: primero porque los animales escapan hacia el lado en donde

su visión está impedida, y segundo, porque como vimos en la sección 1.1., cuando un monitor está apagado los animales escapan mayoritariamente hacia el lado iluminado. Por ello, era esperable que, al limitar la entrada de luz desde uno de los ojos, los animales escapan hacia el lado desde donde pueden ver normalmente.

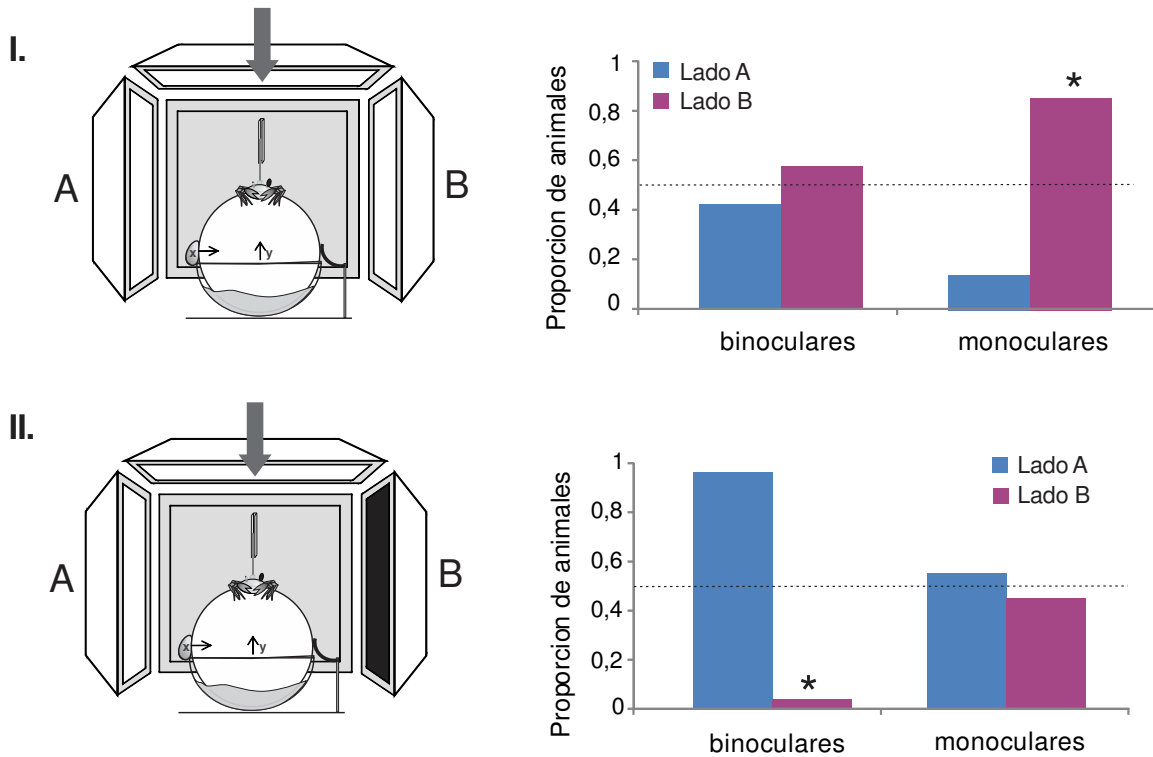


Figura 27. Respuesta ante el estímulo dorsal de los animales con una condición monocular o binocular, y efecto de la alteración del entorno visual. Panel I. En un entorno totalmente iluminado, para el grupo de animales con visión binocular las elecciones hacia lado A o el lado B se dan de manera balanceada ($N=25$; $P=0,23$). Por el contrario los animales del grupo monocular, escapan en mayor proporción hacia el lado B (que corresponde al lado de su ojo ocluido) ($N=26$, χ^2 Pearson, * para $P<0,05$). Panel II. En un segundo ensayo, con el monitor del lado B apagado, los animales del grupo binocular escapan en su mayoría hacia el lado A, mientras que los del grupo monocular escapan de manera balanceada entre ambos lados (χ^2 Pearson, * para $P<0,05$).

Como lo muestran los resultados del panel de la derecha, la segunda parte de este experimento revela que al apagar el monitor del lado que los animales eligieron escapar (intentando revertir la primera elección), los animales binoculares se comportan de acuerdo a lo esperado eligiendo en su mayoría escapar hacia el lado iluminado (ver Panel II). Contrastando con esto, los animales monoculares, que en condiciones de iluminación

simétrica escapaban mayoritariamente hacia el lado de su ojo ocluido, tienden ahora a responder en igual proporción hacia uno u otro lado.

Estos resultados estarían mostrando, al menos, tres cosas:

- 1) Que la decisión por el lado de escape requiere de un procesamiento binocular: la visión con ambos ojos es necesaria para una respuesta adecuada al estímulo looming, ya que el grupo “monoculares” mostró verse afectado en la intensidad y en el tiempo de reacción ante el estímulo lateral.
- 2) Si las elecciones por el lado de escape resultasen de un competencia entre la magnitud de las estimulaciones percibidas por ambos ojos, ante la estimulación dorsal los animales monoculares deberían escapar hacia el lado con el ojo ocluido. Los resultados de nuestro experimento confirman que esto es lo que sucede, evidenciando que existe una función de competencia entre ambas entradas sensoriales que determina el balance de las elecciones.
- 3) El contexto de luminosidad asimétrica que genera el mayor desvío en las elecciones de escape (más de un 90% de respuestas hacia el lado iluminado) tiende a revertir, aunque no completamente, las elecciones de los animales monoculares en condiciones de igual iluminación. El resultado indica entonces una especie de competencia entre la decisión por el lado de mayor iluminación y el lado privado de la visión.

3. Discusión

En este capítulo mostramos los resultados obtenidos sobre qué características del entorno visual en el cual *Neohelice* debe elegir un lado de escape, podrían afectar dicha decisión. Respecto al entorno visual en el que el estímulo es presentado, generamos contextos artificiales con calidades de información que se hallan presentes en el hábitat natural de los cangrejos, como son variaciones en luminosidad, polarización de la luz, y presencia de objetos. Estas claves afectaron tanto la actividad exploratoria, como las elecciones de escape ante el looming dorsal.

En un contexto simétrico (ya sea con los dos monitores laterales encendidos o apagados), los animales escapan con un patrón balanceado de elecciones. En cambio, en el

contexto de luminosidad asimétrica, los animales eligieron escapar hacia el lado iluminado. Cualquiera sea la interpretación sobre la relevancia que este fenómeno pueda tener en el comportamiento de los animales en el ambiente natural, el efecto que provoca tener un lado apagado y el otro encendido en el laboratorio es tan determinante para la elección de lado de escape que permite una fuerte predicción cada vez que se repite el experimento.

Con respecto al efecto de la luz polarizada, se encontró que los efectos más importantes se obtenían cuando se aumentaba la superficie de polarización de los monitores, encontrándose que la contribución más importante la aportaba la polarización de la pantalla dorsal. Curiosamente, mientras que la mayor parte de los animales eligieron escapar hacia la fuente de luz polarizada en el plano vertical (o transversal al animal en el monitor superior), la actividad exploratoria pareció ser más conspicua hacia la fuente de luz polarizada en el plano horizontal (o longitudinal al animal en el monitor superior). Al presente, la interpretación de estos resultados en términos de su posible significancia en los comportamientos desarrollados en el ambiente natural es incierta. De todos modos cabe destacar que los resultados ponen de manifiesto la sensibilidad de estos cangrejos por la luz polarizada, así como la factibilidad para utilizar esta clave en estudios de comportamiento en el laboratorio.

Con relación al efecto de la presencia de objetos contextuales sobre la elección por el lado de escape, encontramos que los animales inclinan claramente su escape hacia el lado donde se halla una barra vertical en preferencia a una horizontal. Estos resultados coinciden con las observaciones que se realizan en el campo, donde puede observarse que en ausencia de una cueva, cuando se ven amenazados, los cangrejos suelen orientar su escape hacia objetos inmóviles que sobresalgan del terreno.

El conjunto de estos resultados muestra claramente que, además de la dirección desde la que se acerca un objeto amenazante, los animales tienen en cuenta mucha información contextual para decidir hacia dónde dirigir su escape.

Con el fin de investigar el grado en que la información proveniente de cada ojo afecta la determinación de la elección por el lado de escape, realizamos experimentos con animales monoculares. Los resultados mostraron que frente al looming dorsal la elección de los animales es la de escapar hacia el ojo ocluido. Esto sugiere que el predominio de la

información del ojo libre sobre la del ojo ocluido parece determinar el lado hacia el cual escapar. Dicho de otro modo, los resultados mostraron que la elección parece depender en buena medida de la competencia entre la información provista por cada ojo.

Sección 3.

Resultados.

Capítulo 3

Decisiones basadas en la experiencia previa.
Plasticidad de la elección de lado de escape.

1. Paradigma de condicionamiento aversivo

Si recopilamos los resultados obtenidos hasta esta parte, todos los grupos de animales que evaluamos en entornos simétricos ejecutaron respuestas de escape a izquierda y derecha en igual proporción y, ante ensayos consecutivos, los individuos tienden a repetir la primera elección. Esta situación representa una oportunidad para investigar la plasticidad de este comportamiento ya que, para cada individuo, las elecciones posteriores al primer ensayo son predecibles. La figura 28 muestra los resultados obtenidos en un grupo de animales enfrentados al estímulo dorsal en siete ensayos consecutivos, confirmando los resultados mostrados en el capítulo 1: el porcentaje de animales que escapan hacia el lado contrario al que lo hicieron en su primera elección es menor al 40% en todos los ensayos.

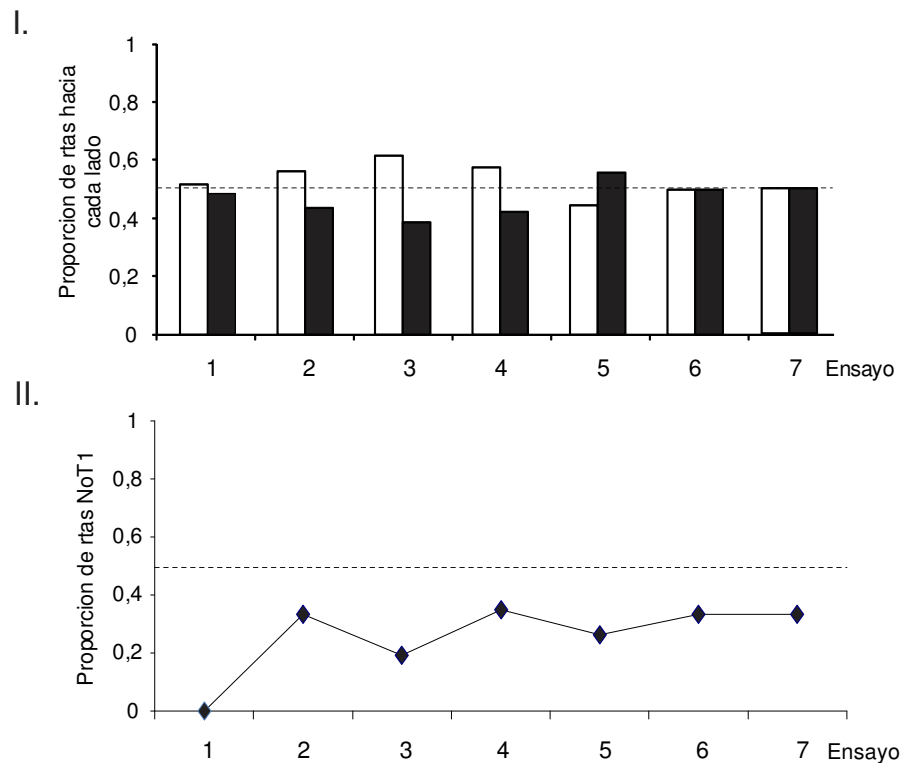


Figura 28. Persistencia en la elección del lado de escape ante el looming dorsal en entornos simétricos. Panel I. Las elecciones se dan en forma balanceada a izquierda y derecha en cada ensayo (blanco=izq, gris=der. N=21, χ^2 Pearson; $P > 0,1$ para todos los ensayos). Panel II. La decisión tomada en el primer ensayo se repite en las presentaciones consecutivas del looming dorsal, y la proporción de cambios de lado de escape respecto al elegido en el ensayo 1, se mantiene por debajo del 40 % en todos los ensayos.

Nos proponemos entonces investigar el grado en que la persistencia de estas elecciones, entendida como una preferencia por el lado hacia el cual escapar, puede ser afectadas por entrenamientos de aprendizaje. Los grupos control que utilizaremos serán grupos de animales sometidos a ensayos consecutivos como el mostrado en la Figura 28.

1.1. Puesta a punto de las condiciones más adecuadas de entrenamiento

1.1.1. Estímulos y respuestas involucradas en el condicionamiento de lado de escape.

Para el desarrollo y la puesta a punto de los parámetros óptimos del condicionamiento aversivo, debemos considerar la complejidad del mismo y los estímulos y respuestas que involucra. Si bien la idea de someter a los animales a experimentos controlados implica un empobrecimiento respecto de estímulos naturales, los mismos no dejan de ser estímulos complejos en el sentido en que no sabemos con certeza de que manera son percibidos por el animal. En cada ensayo los animales iban a tener, además de las claves lumínicas (del entorno) y táctiles (del sustrato en el que se desplazan), al menos dos estímulos incondicionados aversivos (Fig. 29, panel I). En principio, ya sabíamos que el estímulo incondicionado looming (EI1) provoca una fuerte respuesta incondicionada (RI) de escape. En nuestro paradigma, agregamos un segundo estímulo aversivo incondicionado (EI2) consistente en un shock eléctrico.

En el protocolo de condicionamiento diseñado, al grupo “condicionado” se le castigó la primera elección de lado de escape ante el looming con un shock eléctrico, y en cada uno de los ensayos donde el animal persistía en ella. De esta forma, esperábamos que el animal aprenda que esa elección conlleva a un *resultado* negativo, y como consecuencia luego de algunos ensayos, cambie su preferencia escapando hacia el otro lado (fig. 29, panel II).

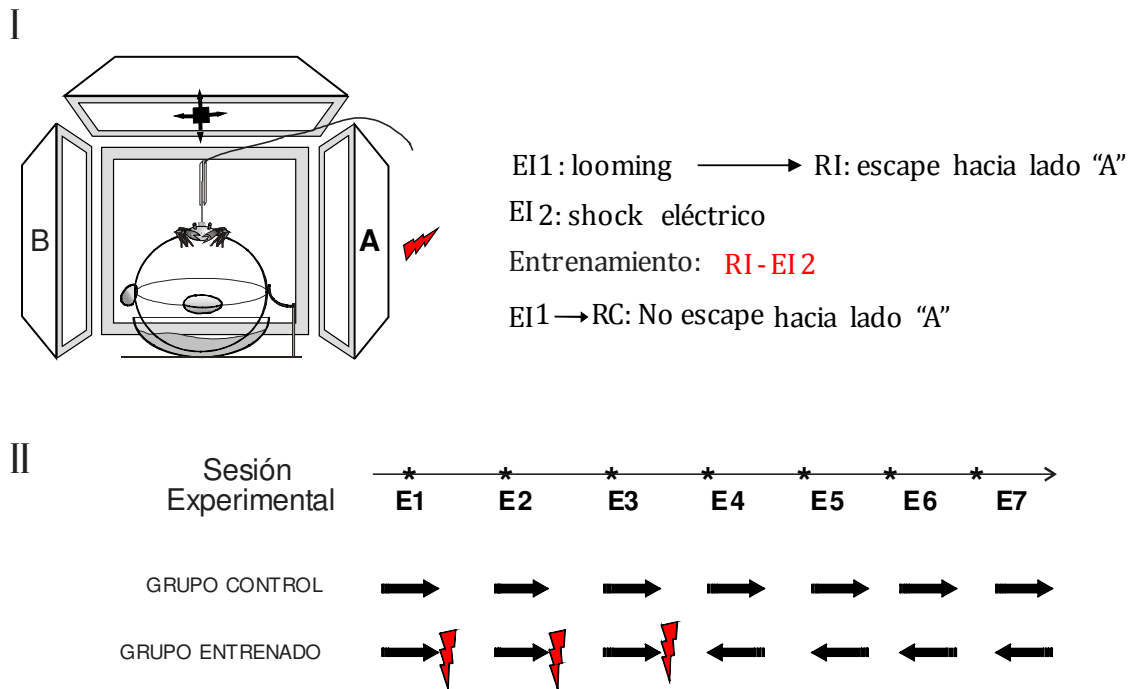


Figura 29. Tipos de estímulos utilizados y ejemplo del protocolo de condicionamiento aversivo. Panel I. Luego del estímulo incondicionado 1(EI 1), el estímulo *looming*, el animal toma la primera elección de escape y exhibe una respuesta incondicionada (RI) ante dicho EI1, corriendo lateralmente en este caso hacia el lado “A”, recibiendo entonces un segundo estímulo incondicionado a través del shock eléctrico (EI2), en forma contingente con la RI de escape ante el *looming* durante el escape hacia ese lado. Esperamos que al utilizar un shock eléctrico como un segundo estímulo incondicionado (EI2), en forma contingente con la RI de escape ante el *looming*, luego de varios ensayos el animal modifique su elección dejando de escapar hacia su lado preferido. Este cambio de elección se interpretaría entonces como una respuesta condicionada (RC). **Panel II.** Durante una sesión de sucesivos ensayos con el estímulo dorsal, los animales repiten la respuesta tomada en el primer ensayo, escapando siempre hacia el mismo lado (grupo control). Se espera que el grupo entrenado con el shock eléctrico, luego de varios ensayos donde los animales son castigados luego de la primera elección de lado de escape ante el EI1, exhiba un cambio comportamental y los cangrejos comiencen a elegir el lado opuesto para escapar.

1.1.2. Dispositivo de estimulación eléctrica dorsal

La puesta a punto del condicionamiento aversivo involucró la búsqueda de los parámetros óptimos del shock eléctrico. Para esto ideamos un dispositivo de estimulación que pudiera ir sobre el animal mientras el mismo se encontraba sobre la esfera durante la sesión de entrenamiento, y que pudiera ser controlado desde el lado de afuera del dispositivo, sin perturbar al mismo (Fig. 30). El “estimulador” constaba de dos cables muy livianos que

llegaban hasta el animal adosados a la varilla de madera, y se insertaban en el caparazón (donde se realizaban previamente 2 pequeños agujeros) aproximadamente 3 mm hasta contactar la hemolinfa.

Los cables estaban conectados a un transformador que podía enviar un shock eléctrico en un rango desde 9 a 24 Volts. El envío de la señal se realizaba desde el exterior del setup, en el momento elegido, previa programación desde el software.

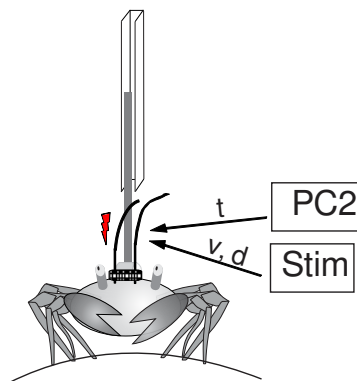


Figura 30. Dispositivo de estimulación eléctrica dorsal. Los alambres se insertan en el caparazón hasta contactar la hemolinfa por delante de la varilla de madera. La pc2 envía mediante programación el momento de disparo del shock(t), y desde el estimulador se controla el voltaje (v) y la duración del estímulo (d).

1.1.3. Búsqueda de los parámetros más adecuados de condicionamiento

La primera fase, entonces, consistió en diseñar el protocolo de estimulación de los animales. Los parámetros del EI2 (shock eléctrico) que decidimos modificar fueron:

- Voltaje del estímulo
- Duración del estímulo
- Momento de la aplicación del estímulo

Voltaje y Duración del estímulo de shock eléctrico. El rango de tensión del shock eléctrico abarcaba de 9 a 24 Volts, y tanto la tensión como la duración del shock eran configuradas desde el estimulador. Comenzamos haciendo pruebas con valores de 24 volts, pero casi todos los animales realizaban respuestas de freezing o respondían levantando las quelas en lugar de escapar. Con respecto a la duración del pulso de corriente, se aplicaba un

pulso continuo de corriente, y la misma dura lo que se controle desde el estimulador. Tras una serie de pruebas preliminares, elegimos hacer los condicionamientos con una duración de 500 mseg. y un voltaje de 15 Volts, ya que era un voltaje que tenía un efecto aversivo en los animales (cambiaban el lado de escape) y no realizaban una alta proporción de freezing. Luego de una sesión habitual de entrenamiento (7 ensayos), al ser devueltos a los recipientes contenedores, los animales exhibían una actividad exploratoria normal.

Momento de aplicación del estímulo eléctrico: búsqueda de la contigüidad adecuada entre el looming y el shock eléctrico. El momento de aplicación del shock eléctrico era programado desde la PC2, siempre luego del inicio y durante la ejecución de la RI. Nuestra intención fue parrear este nuevo estímulo con la respuesta de escape del animal provocada por el looming, y lograr un cambio en la elección del lado de escape. Entonces, la primera parte de la puesta a punto consistió en la búsqueda de la contigüidad adecuada entre la RI y el EI2 para lograr que los animales aprendan el valor negativo de su primera elección (Fig. 29, panel I). Analizando los perfiles de la respuesta de velocidad de escape de los animales ante el looming dorsal, elegimos 3 momentos en los cuales castigar a los animales post-escape: a los 1, 2 y 3 segundos después del pico máximo de expansión del estímulo (Fig. 31).

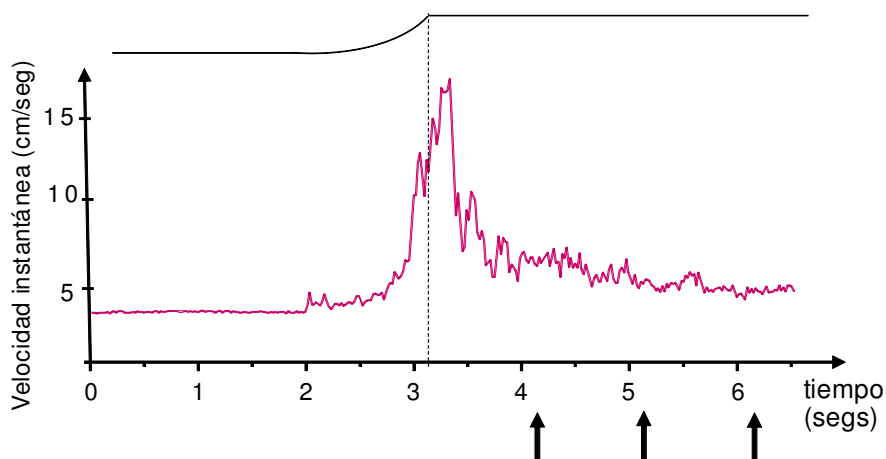


Figura 31. Tipo de estímulos durante la sesión de condicionamiento y velocidad instantánea ante el looming con aproximación dorsal. Se grafica la dinámica de escape de un individuo (línea rosa) y en la parte superior, la dinámica de expansión del estímulo (línea negra). Las flechas negras muestran los puntos temporales elegidos para enviar el shock eléctrico al animal luego del escape, en distintos experimentos de condicionamiento aversivo (1, 2 y 3 segundos post-expansión máxima del looming).

Comenzamos realizando los experimentos de búsqueda de la contigüidad apropiada, pareando el shock eléctrico con la respuesta del animal a distintos tiempos luego del final de la expansión del estímulo *looming*. El parámetro de respuesta que consideramos como indicativo de una modificación en la conducta debida a la experiencia asociada al shock fue *el cambio en la elección de lado de escape respecto de la primera elección*, es decir, respecto de aquella que el animal efectuó frente al *looming* antes de recibir ningún shock eléctrico.

Para esta primera fase utilizamos 4 grupos, cada uno de entre 14 y 24 animales, que incluyen un grupo “control” (CT) y tres grupos entrenados (EN). El grupo control experimentó todo el tratamiento, incluyendo la perforación en el caparazón y la colocación de los alambres como a los grupos tratados, pero no fue castigado con el shock eléctrico.

En el gráfico de puntos y líneas mostrado más abajo, se puede observar que el grupo control utilizado nunca supera una proporción de “cambios de lado” del 30%, aún luego de 7 repeticiones del mismo estímulo, mostrando que en el grupo no condicionado la preferencia por uno de los lados de escape persiste a lo largo de los ensayos (figura 32).

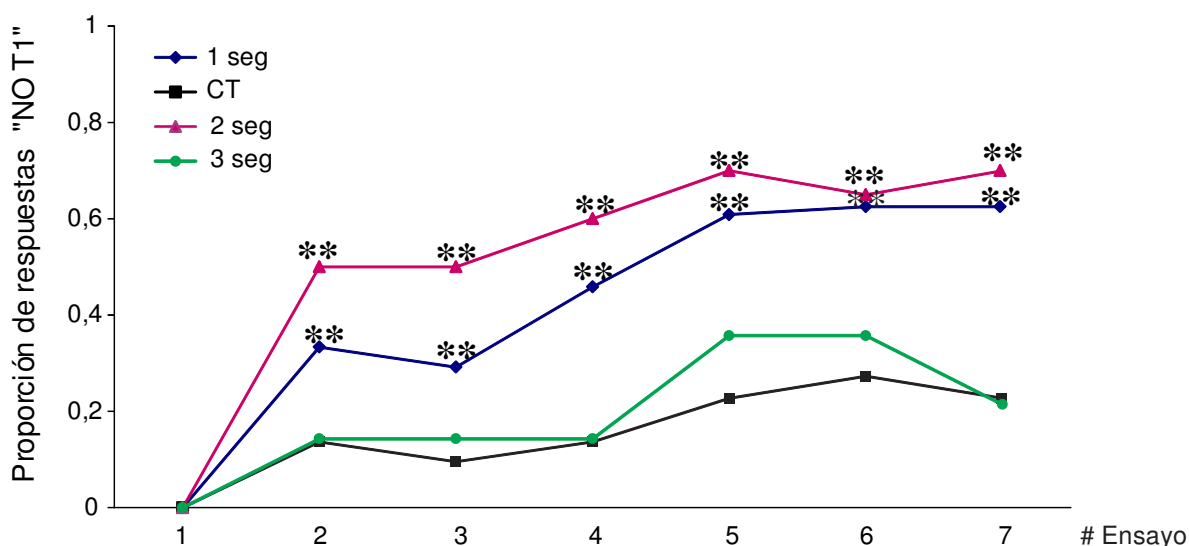


Figura 32. Paradigma de condicionamiento aversivo. Se muestra la proporción de cambios de lado ante sucesivas presentaciones del *looming* dorsal. Los cuatro grupos experimentales son el grupo control (CT), el cual nunca recibe el shock eléctrico, y los tres grupos entrenados (EN) que reciben el shock con intervalos de 1, 2 y 3 segundos luego de la finalización del estímulo *looming*. (χ^2 Pearson, ** se indica para todos los ensayos con $P < 0,01$, CT n=23, EN(1 seg) n=24, EN(2 seg) n=20, EN(3 seg) N=14, todos los grupos se comparan contra el control).

Los grupos entrenados se comparan estadísticamente con el grupo control. De los animales a los cuales se les castigó la primera elección de lado de escape a distintos tiempos luego del final de la expansión del looming, el grupo con un intervalo entre estímulos de 3 segundos se comportó de manera similar al control, no alcanzando cambios significativos en el porcentaje de reversión de las elecciones para ninguno de los ensayos (χ^2 Pearson, $P > 0,1$ para todos los ensayos).

Por el contrario, los grupos entrenados con intervalos de 1 y 2 segundos mostraron un aumento en la proporción de “cambios de lado”, inclusive con tan solo un ensayo de condicionamiento (χ^2 Pearson, $P < 0,01$ para todos los ensayos) El grupo que mostró la curva de aprendizaje aparentemente más rápida fue aquel en el que el intervalo entre looming y shock eléctrico fue de 2 segundos.

1.1.4. Efecto del shock sobre la actividad locomotora de los animales entrenados y modificación del dispositivo de estimulación eléctrica.

En los animales entrenados, el shock eléctrico era aplicado desde la parte dorsal del cuerpo, a través de los electrodos que penetrando en el caparazón estaban en contacto directo con la hemolinfa. Ante la primera aplicación del mismo, los animales se detenían brevemente realizando una reacción de sobresalto (agachando un poco el cuerpo), y en algunos casos realizando reacciones de levantamiento de quelas o de alguna de las patas. Luego de esta primera reacción, continuaban con una caminata, generalmente hacia el mismo lado hacia el cual habían escapado. Si bien luego del experimento los animales aparentemente retomaban la actividad locomotora normal, quisimos evaluar con más precisión el efecto que tenía el shock eléctrico sobre la conducta motora durante la sesión misma de entrenamiento. Para esto, analizamos la proporción de animales que respondían congelándose (freezing) en los sucesivos ensayos (Fig. 33). Los resultados muestran que dicha proporción se incrementa notablemente a partir del quinto ensayo, rozando porcentajes que se mantienen cercanos al 40%.

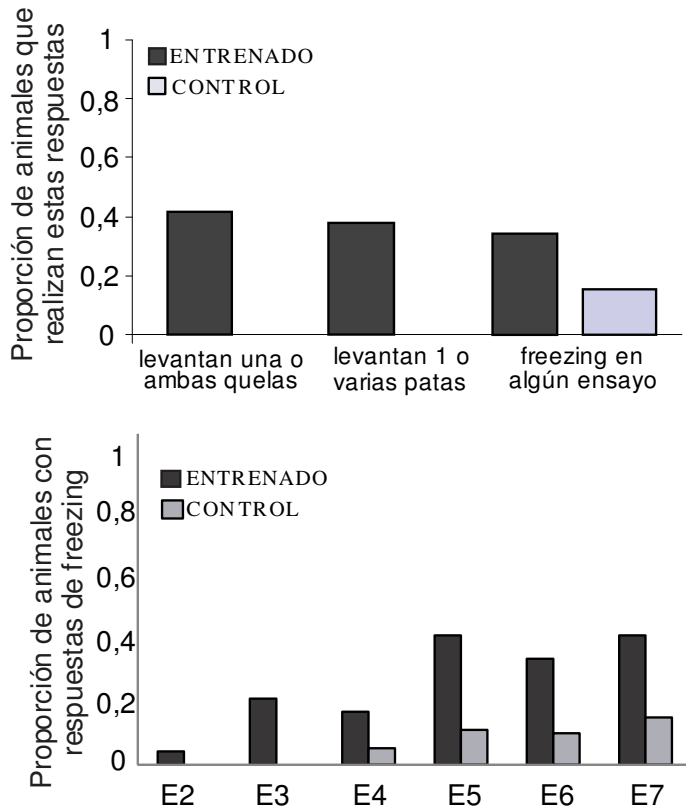


Figura 33. Tipo de respuestas comportamentales de los animales en el paradigma de condicionamiento aversivo. En el gráfico superior se muestra el tipo de respuestas que exhiben los animales entrenados, en alguno de los ensayos, en comparación con los animales del grupo control (EN n=29, CT n=13). En el gráfico inferior se muestra la proporción de freezing (respuesta de congelamiento) en animales que son entrenados con el shock eléctrico llegando directamente a la hemolinfa, en comparación con el grupo control, perforado, pero que no recibe el shock. Se puede observar que a partir del 5º ensayo, casi el 40% de los animales deja de responder ante el estímulo de looming dorsal.

Los individuos que realizaron respuestas de congelamiento no fueron incluidos en el análisis de aprendizaje mostrado en la figura 33, ya que en ellos no era posible evaluar su elección de escape hacia uno u otro lado. El aumento del porcentaje de congelamiento conlleva entonces una reducción del tamaño muestral hacia el final de los ensayos.

Dispositivo de estimulación eléctrica lateral

Con idea de reducir el número de animales que realizaban congelamientos durante el entrenamiento y también de lograr una condición que pudiese resultar más efectiva para el aprendizaje, decidimos modificar el modo en que se le administraba el shock eléctrico al animal. Para esto, armamos un pequeño arnés en forma de puente que montado sobre el cangrejo alcanzaba los laterales de su caparazón. En cada uno de los extremos laterales se encontraban ubicados dos electrodos por los que se podía administrar el shock eléctrico al costado izquierdo o derecho de forma independiente. El estímulo se administraba sobre la

superficie del animal, es decir sin necesidad de perforarle el caparazón para introducir los electrodos. La elección del lado al cual se administraba el shock eléctrico era controlada por el experimentador a través de un selector manual ubicado fuera de la arena experimental. La elección del lado a ser estimulado se hacía inmediatamente luego de observar la respuesta del animal a través de una cámara y monitor de video. Así, si la elección durante el primer ensayo había sido por ejemplo escapar hacia la derecha, el shock se administraba del lado derecho, lo que se repetía en cada ensayo siguiente en el que el animal volviese a elegir ese mismo lado. Los ensayos hacia el lado opuesto nunca eran castigados.

Con este nuevo dispositivo, la respuesta de los animales ante el shock eléctrico aplicado externamente a uno u otro lado del cuerpo era muy distinta que al del shock aplicado en la parte dorsal e interna del cuerpo. En esta nueva configuración, la mayoría de los animales cambiaban la respuesta de escape de manera inmediata al aplicarles el castigo. Al parecer, la señalización lateral del shock eléctrico aplicado con el puente, resultaba más clara y apropiada para el paradigma que intentábamos desarrollar.

2. Condicionamiento de evitación activa.

A partir de los cambios realizados, repetimos el experimento de condicionamiento, eligiendo los parámetros que habían resultado más efectivos: shock eléctrico de 15 volts y de 500 ms de duración, a los 2 segundos luego de la expansión máxima del estímulo looming. En este caso, los individuos del grupo control llevaban colocado el puente, pero no recibían el shock luego de la respuesta comportamental.

2.1. Aprendizaje del cambio de lado de escape.

Los resultados de la Figura 34 muestran que el porcentaje de animales que realizaron respuestas de congelamiento se redujo considerablemente (panel I izquierda), con lo cual alcanzamos mejores condiciones para este protocolo de condicionamiento. También efectuamos un análisis cuantitativo, donde medimos la intensidad en la respuesta como

distancia recorrida en cada escape, entre el grupo condicionado y el grupo control (fig. 34, panel I derecha). Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas entre ambos grupos, indicando que el shock eléctrico aplicado en la parte lateral del caparazón no tiene un efecto dañino en la actividad motora de los animales.

El entrenamiento en estas condiciones es efectivo, alcanzándose en los ensayos finales un porcentaje de respuestas correctas (cambio del lado elegido en el ensayo 1) algo mayor que con las condiciones anteriores (panel II).

Es importante destacar que el protocolo en estas condiciones se repitió muchas veces a lo largo de distintos experimentos durante esta tesis doctoral, y siempre se obtuvieron resultados similares. Cabe sin embargo mencionar que si bien una alta proporción de animales a partir del primer ensayo ya cambiaban su elección, luego de un par de ensayos con elecciones correctas (y donde por lo tanto no recibían el refuerzo negativo), volvían a insistir con el lado elegido la primera vez. Esto se deja entrever por lo general a partir del cuarto o quinto ensayo de la curva de entrenamiento, donde volvía a bajar la proporción de animales que efectuaban elecciones correctas (ver fig. 34, panel II). En esos ensayos, los animales que insistían en la primera elección volvían a ser castigados.

Para el final del entrenamiento sin embargo, tanto en el grupo control como en el entrenado, aumentaba considerablemente la proporción de animales que disminuían mucho la intensidad del escape o cambiaban la estrategia y comenzaban a efectuar respuestas de congelamiento. Es por esto, que siempre limitamos los protocolos a no más de 7 ensayos, en los que obteníamos trayectorias individuales de escape claras, que nos permitían realizar todos los análisis cualitativos y cuantitativos necesarios.

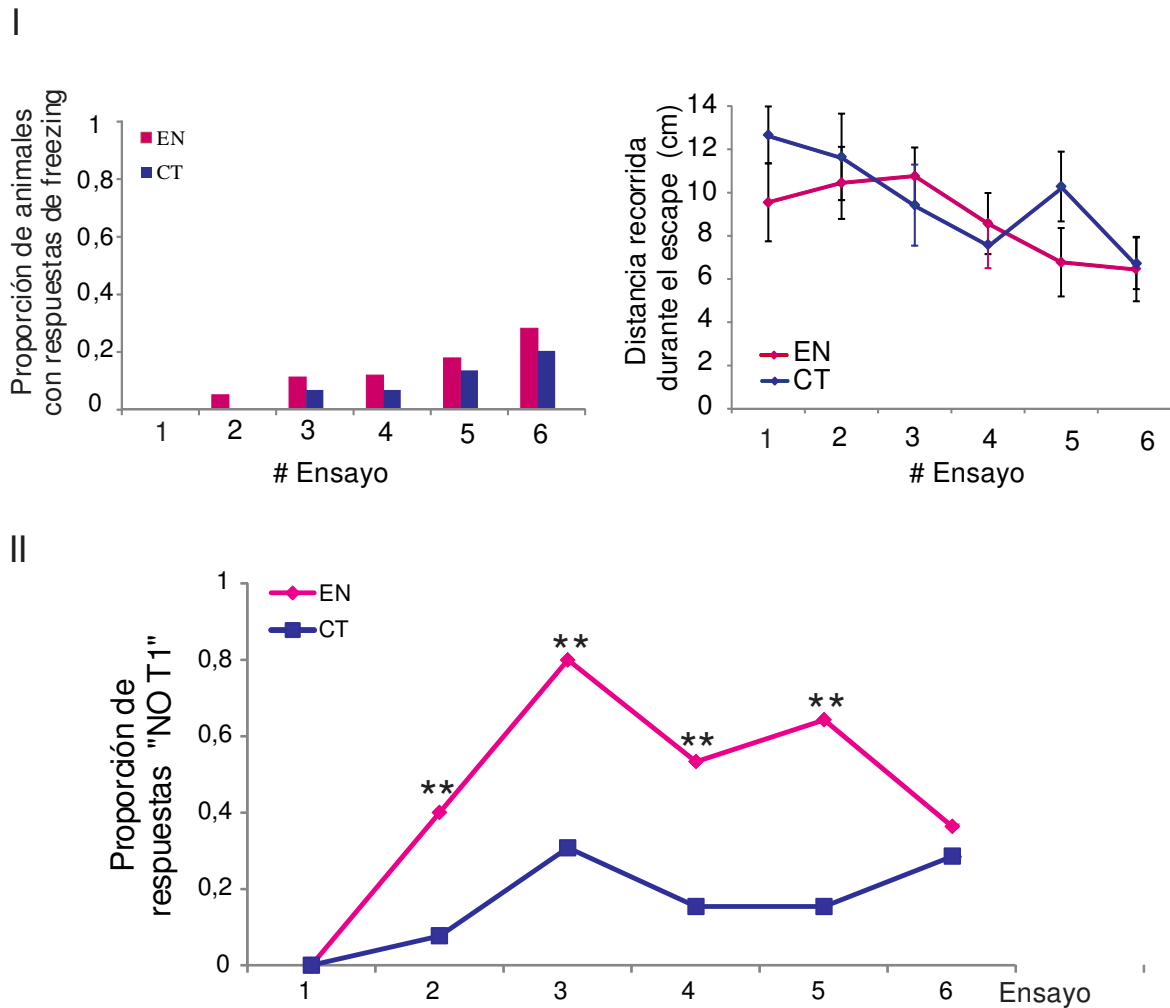


Figura 34. Curva de aprendizaje para un grupo de cangrejos entrenado con shock eléctrico aplicado 2 segundos luego de la finalización del estímulo, con el dispositivo de estimulación lateral. Panel I. Proporción de animales que realizan respuestas de congelamiento (grafico de la izquierda, EN N=14, CT N=15). La intensidad de la respuesta de escape en un grupo experimental que recibe un condicionamiento aversivo, con un shock eléctrico de 15 volts y de 500 ms de duración, aplicado en forma externa a los 2 segundos luego de la expansión máxima del estímulo looming, no es diferente a la intensidad de la respuesta de un grupo control que no recibe el shock (gráfico de la derecha, Test de T no pareado, $P > 0,1$ para todos los ensayos). Panel II. Curva de aprendizaje para el grupo entrenado con el shock lateral, en comparación con el grupo control. Se observa que con tan solo un ensayo, los animales entrenados aprenden a cambiar el lado de escape. Se observan diferencias significativas para los primeros cuatro ensayos entre el grupo entrenado y el grupo control. (2 de Pearson, ** para $P < 0,01$).

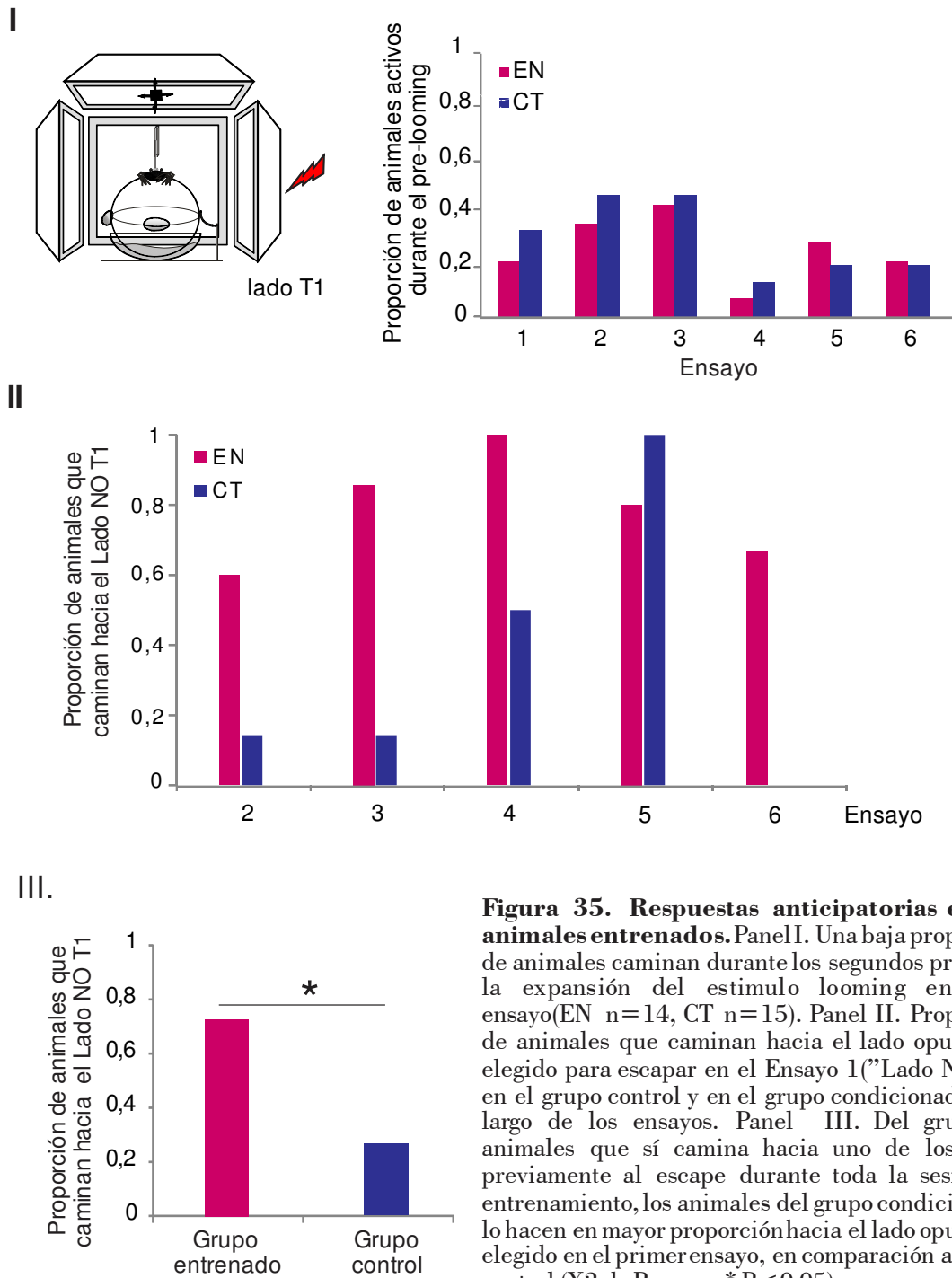
2.2. Actividad anticipatoria durante el entrenamiento.

Quisimos investigar si los animales que aprendían a cambiar el lado de escape, exhibían una respuesta anticipatoria que pudiera ser predictiva de la toma de decisiones previa al escape. En este sentido, un cambio de lado en la etapa de exploración previa al looming, podría sugerir que los animales entrenados preveen con una valoración diferente los dos lados posibles de escape.

Para medir esa eventual actividad anticipatoria calculamos, dentro de la baja proporción de animales que se hallaba caminando inmediatamente antes del looming, hacia qué lado lo estaban haciendo. Para esto consideramos una ventana temporal de 30 segundos previos al comienzo de la expansión, en cada ensayo.

Cabe destacar que proporciones similares de animales del grupo condicionado como del grupo control realizan caminatas previamente a la expansión del looming, en cada ensayo (Figura 35, panel I). Esto sugiere, en primer lugar, que el shock eléctrico no tiene un efecto en la actividad general de los animales y que, además, hay una disminución consistente entre el ensayo 3 y 4 de los animales que caminan (Panel I). Esto puede ser consecuencia de lo mencionado anteriormente acerca del cambio de estrategia a partir del cuarto o quinto ensayo, donde los animales vuelven a insistir con el lado elegido la primera vez, y por lo cual hay una proporción de animales que vuelve a recibir el shock eléctrico.

A continuación nos fijamos, ensayo tras ensayo, hacia qué lado caminaban los animales activos (Fig. 35, panel II). Se observa que luego del primer ensayo los animales del grupo entrenado caminan en mayor proporción hacia el lado opuesto al de la primera elección, a diferencia del grupo control que lo hace en mayor proporción hacia el mismo lado. Un análisis cuantitativo de la totalidad de casos de animales que caminan de manera anticipatoria hacia el lado no elegido en el primer ensayo muestra que hay una proporción mayor en el grupo entrenado, a comparación del grupo control (panel III).



Los resultados mostrados en la figura 35 evidencian que los animales que fueron entrenados con el shock eléctrico luego de la primera elección de lado de escape, realizan más caminatas hacia el lado opuesto al castigado (Lado No T1). Estos resultados muestran

que el condicionamiento no modifica únicamente la respuesta de lado de escape ante el estímulo dorsal, sino también el comportamiento de caminata en los ensayos subsiguientes, sugiriendo que el entrenamiento cambia para los animales la valoración de cada uno de los lados del dispositivo.

2.3. Efecto del lado de aplicación del estímulo incondicionado en el condicionamiento de elección del lado de escape.

Como vimos en los experimentos anteriores, la toma de decisiones acerca del lado de escape, resulta ser lo suficientemente plástica como para poder ser modificada con tan solo un ensayo en el paradigma de condicionamiento aversivo. Sin embargo, con este protocolo, el shock eléctrico se aplicaba siempre desde el lado del animal hacia el cual este prefería escapar. Continuando el mismo diseño de castigar la elección por el lado preferido, cabe preguntarse si recibir el castigo desde un costado u otro del animal tiene algún efecto.

Para investigar esto, diseñamos un protocolo de condicionamiento en el cual el grupo experimental, que al igual que antes seguía siendo castigado en cada elección por su lado preferido, recibía de manera predeterminada un shock eléctrico desde uno de sus costados, pudiendo ser el costado ipsilateral a su lado de escape preferido o el costado opuesto (Figura 36, esquemas de la izquierda). Insistimos en aclarar que, con independencia del costado en el que se administrara el shock, el castigo fue siempre administrado ante la elección del lado de escape preferido en el ensayo 1. Los animales fueron entonces separados en dos grupos, definidos como “E+” (castigados en el costado hacia el cual escapan) y “E-” (castigados en el costado opuesto hacia el cual escapan). El grupo control no recibía shock eléctrico a lo largo del entrenamiento.

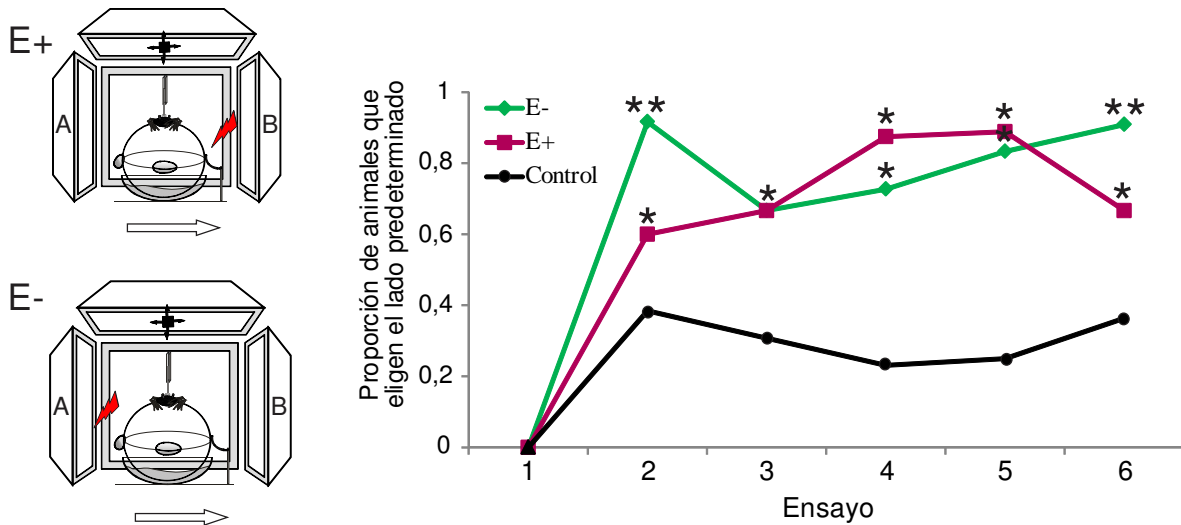


Figura 36. Efecto del costado en el cual se administraba el castigo sobre el condicionamiento aversivo. En los grupos entrenados, los animales son castigados desde el costado hacia el cual escapan (E+), o desde el costado del cual escapan (E-). A la derecha se muestran las curvas de entrenamiento para los grupos “E-”, “E+” y control. (EN(E-)n=12, EN (E+) n=10, CT n=13, 2, * para $P < 0,05$, ** para $P < 0,01$).

Los resultados muestran que, en el caso de los animales que fueron “reforzados” desde su primera elección, recibiendo un shock eléctrico desde el costado hacia el cual preferían escapar (como en los entrenamientos que veníamos usando), la curva de aprendizaje confirma los resultados anteriores (grupo E+). Los animales que fueron “reforzados” desde su primera elección, recibiendo un shock eléctrico desde el costado opuesto al de su lado de escape preferido (grupo E-), aunque aparentan tener un mejor desempeño en el ensayo 2 (2 Pearson, $P < 0,05$), muestran una curva de adquisición semejante a la del grupo E-. En otras palabras, el hecho de recibir el castigo desde el costado del animal correspondiente al lado hacia el que prefiere escapar, o desde el otro costado, no parecen afectar sustancialmente este aprendizaje.

3. Discusión

A partir del paradigma de toma de decisiones dicotómica sobre el lado de escape en *Neohelice granulata* (que desarrollamos y describimos en los primeros dos capítulos de esta tesis), diseñamos un protocolo de condicionamiento aversivo, basado en la persistencia de la elección de lado que exhiben los animales ante ensayos consecutivos con el looming dorsal.

A partir de varios experimentos, se alcanzaron parámetros adecuados para lograr que los animales aprendieran a revertir la primera elección y se logró poner a punto un paradigma que denominaremos “Condicionamiento de Evitación Activa (CEA)”. Dentro de los paradigmas de condicionamiento instrumental, resulta apropiado distinguir entre uno que genera una “evitación activa”; en el que realizar un determinado comportamiento impide una consecuencia aversiva, y uno que genera una “evitación pasiva”, en el cual el aprendizaje consta en suprimir el comportamiento. En nuestro caso, la mayoría de los animales exhiben un comportamiento activo, de cambio en la elección del lado de escape luego de la sesión de condicionamiento. Es por esto, que nuestro paradigma de condicionamiento puede considerarse un “Condicionamiento de Evitación Activa”.

Con respecto a las limitaciones que presenta el CEA en *Neohelice granulata*, los experimentos realizados muestran que si aumentamos el número de ensayos los animales aumentan la proporción de freezing (experimentos no mostrados). Con respecto a multiplicar las sesiones de entrenamiento en distintos días, los animales no mantienen el lado elegido en el 1er ensayo a las 24 hs, con lo cual la decisión vuelve a ser al azar. Las pruebas que hicimos con más sesiones de entrenamiento en las condiciones puestas a punto para esta tesis, no mejoraron la adquisición del aprendizaje. No obstante, es un tema que merece continuar siendo explorado.

Las figuras 34 y 35 (panel I), muestran que el shock per se no afecta ni la respuesta de escape ni la caminata previa al looming, y que la dinámica de locomoción durante toda la sesión de entrenamiento resulta comparable entre el grupo control y el grupo entrenado.

El paradigma de CEA resulta ser efectivo en tan solo un ensayo de entrenamiento (fig. 32 y fig. 34), con una proporción significativa de animales que aprenden a cambiar el lado de escape. Además, los animales entrenados que realizan caminatas previamente a la expansión

del estímulo dorsal, anticipan a partir del segundo ensayo la respuesta condicionada, caminando hacia el lado opuesto al castigado (fig. 35).

Resulta interesante comparar los resultados mostrados en este capítulo con los obtenidos en experimentos realizados en otros crustáceos. En experimentos realizados en el cangrejo *Carcinus maenas*, se condicionó a los animales en un paradigma de evitación en el cual los animales deben elegir entre dos cámaras trasladándose con una caminata (una cámara es castigada con un shock y la otra no). En los experimentos realizados, se muestra que los animales repiten la primera elección a menos que sean castigados en el primer ensayo, resultados similares a los mostrados en esta tesis con *Neohelice granulata* (Magee and Elwood, 2013). Sin embargo, en ese estudio los animales recibían un shock cada 5 segundos si permanecían en la cámara incorrecta, con lo cual el condicionamiento requería de cierto *shaping* (moldeamiento de la respuesta), a diferencia de nuestro caso, donde un solo shock logra revertir la elección. En un estudio anterior realizado en otro crustáceo, *Procambarus clarkii*, los animales aprenden a desarrollar la evitación de una de las cámaras de manera más gradual, en un protocolo que utiliza 20 ensayos por día durante 32 días (Kawai y col., 2004).

En *Neohelice granulata*, Denti y col. (1988) realizaron experimentos de evitación pasiva, en los cuales el cangrejo debía aprender a evitar pasar de una cámara oscura a una iluminada (opción preferida). Para lograr esto, los animales experimentales recibían un shock cuando pasaban a la cámara iluminada, a diferencia de los animales control que no lo recibían. Los resultados eran analizados en función de la disminución de la latencia en pasar de la cámara oscura a la iluminada. El análisis mostraba que *Neohelice* aprendía a evitar la cámara iluminada con solo un trial de condicionamiento (Denti y col., 1988). Sin embargo, Magee y Elwood (2013) cuestionan los resultados argumentando que la mayor latencia podría ser atribuida a algún efecto nocivo del shock eléctrico sobre la respuesta motora de estos animales. En los experimentos mostrados en esta tesis, el paradigma de elección activa entre dos opciones, elimina estos inconvenientes. En este caso, el aprendizaje se obtiene con solo un ensayo de condicionamiento, y mostramos que no hay efectos dañinos del shock sobre la locomoción de los animales.

En definitiva, los resultados de este capítulo aportan nuevas e importantes evidencias acerca de que el comportamiento del cangrejo por escapar corriendo hacia un lado en particular no

está rígidamente determinado, sino que es motivo de una decisión que está sujeta a variables entre las que se incluye la experiencia previa adquirida por el animal. En efecto, los resultados demuestran que se trata de un comportamiento plástico, cumpliendo así un requisito fundamental para entenderlo como un proceso de toma de decisiones.

Los resultados de los experimentos en este capítulo muestran además que las condiciones logradas para el protocolo de condicionamiento aversivo de cambio de lado de escape, resultan adecuadas para continuar explorando el aprendizaje y la valoración de las opciones en el paradigma de toma de decisiones de *Neohelice granulata*.

Sección 3.

Resultados.

Capítulo 4

Procesamiento de la elección de lado de escape: el papel de las neuronas gigantes de la lóbula.

1. Introducción

En la introducción de la presente tesis mencionamos la notable sensibilidad de los cangrejos a estímulos visuales de movimiento y, en particular, a los estímulos looming. En los capítulos anteriores, investigamos a nivel comportamental aspectos de la toma de decisiones de estos animales frente a estímulos de aproximación fundamentalmente dorsal. En este capítulo exploraremos los posibles correlatos de esos procesos a nivel neurofisiológico. En particular, nos concentraremos en analizar la respuesta de las neuronas gigantes de la lobula (LG por lobula giants) ya que, además de ser altamente sensibles al movimiento visual de objetos (Berón de Astrada y Tomsic 2002; Sztarker y Tomsic 2004; Medan y col., 2007), demostraron estar estrechamente vinculadas al control de comportamientos del cangrejo guiados visualmente (Sztarker y Tomsic 2008; 2011; Oliva y col. 2007; Oliva y Tomsic 2014; Medan y col., 2015), reflejando incluso en su actividad los cambios del comportamiento relacionados con aprendizajes visuales (e.g. Tomsic y col. 2003; Sztarker y Tomsic 2011).

A partir de esos antecedentes y de las evidencias experimentales comportamentales, podemos hacer predicciones acerca de las variables que podrían estar siendo codificadas en el cerebro durante el procesamiento de esta toma de decisiones. En este capítulo, intentaremos buscar correspondencias entre las variables que afectan la decisión comportamental del animal (capítulos 1 y 2 de esta tesis) y las respuestas de neuronas LG individuales.

Las actividad de las neuronas LG han mostrado reflejar muy fielmente la intensidad de la respuesta de escape (e.g. Tomsic y col., 2003; Sztarker y Tomsic, 2008, 2011; Oliva y col., 2007; Oliva y col. 2014). Los cuatro tipos de neuronas LG que han sido caracterizadas se conoce que procesan información binocular (Sztarker y Tomsic 2004; Scarano y Tomsic, comunicación personal). Es por lo tanto dable formular la hipótesis de que podría existir una competencia entre las intensidades de la respuesta de las LG de ambos lóbulos ópticos, que define la dirección en la que se va a realizar el escape. La idea es sencilla: las LG del lado que respondan más intensamente determinarían el escape hacia el lado opuesto. En los experimentos de la figura 27 con animales monoculares (un único ojo con capacidad de ver), se observó que cuando el looming lateral se presenta del lado del ojo ocluido la respuesta tiene menor intensidad y mayor latencia. Esto sería consecuencia de que la percepción visual del

objeto con el lado medial del ojo es menor que con el lado lateral, como lo indican resultados anatómicos y fisiológicos previos (Berón de Astrada y col., 2011; Medan y col., 2015). Por ello, es dable pensar que las LG del lóbulo óptico ipsilateral a la posición del estímulo, respondan con más intensidad que las que se hallan ubicadas en el lóbulo contralateral. Por otra parte, frente al looming dorsal la respuesta de animales monoculares hacia el lado del ojo ocluido (resultados de la figura 28) y, por ende, sin respuesta de las LG de ese lado del cerebro, está en línea con esa posibilidad. A partir de esta hipótesis, planteamos modelos sencillos acerca del procesamiento neuronal que se estaría llevando a cabo para varias de las situaciones comportamentales exploradas, y que incluimos en un “Modelo de Dominancia Ocular” (ver figura 37).

En el primer capítulo de esta tesis se muestra la impredecibilidad del lado de escape en individuos de *Neohelice granulata* ante la primera presentación del estímulo looming dorsal en un entorno homogéneo. Dado que este estímulo se encuentra precisamente centrado en el campo dorsal del animal, y ambos ojos estarían recibiendo la misma información visual en un entorno simétrico, la misma se procesaría de manera similar en ambos lóbulos ópticos provocando escapes balanceados hacia ambos lados. En tal situación, para el modelo de Dominancia Ocular que proponemos, sería esperable que la intensidad de la respuesta de las LG en un lóbulo óptico o en el otro fuera similar (ver panel superior, fig. 37).

Para el caso del estímulo looming lateral, esta decisión pasa a ser completamente predecible: casi el 100% de los animales escapa hacia el lado opuesto al de aproximación del estímulo. En este caso, con nuestro modelo de “dominancia ocular”, la predicción es que la actividad de las LGs del lóbulo óptico ipsilateral al estímulo evocante sería mayor que la registrada frente al estímulo contralateral, provocando la respuesta comportamental hacia el lado contralateral (ver panel del medio, fig. 37)

En el caso del estímulo looming dorsal en contextos visuales asimétricos, como cuando se presenta en el dispositivo con uno de los monitores apagados, sabemos que el animal escapa hacia el lado más luminoso en un 80% de los casos (el lado contralateral al del monitor apagado). En esta situación, el modelo de “dominancia ocular”, propone una mayor actividad de las neuronas LG del lado ipsilateral al lado de mayor oscuridad monitor apagado, guiando así las respuestas de escape hacia el lado iluminado (ver panel inferior, fig. 37).

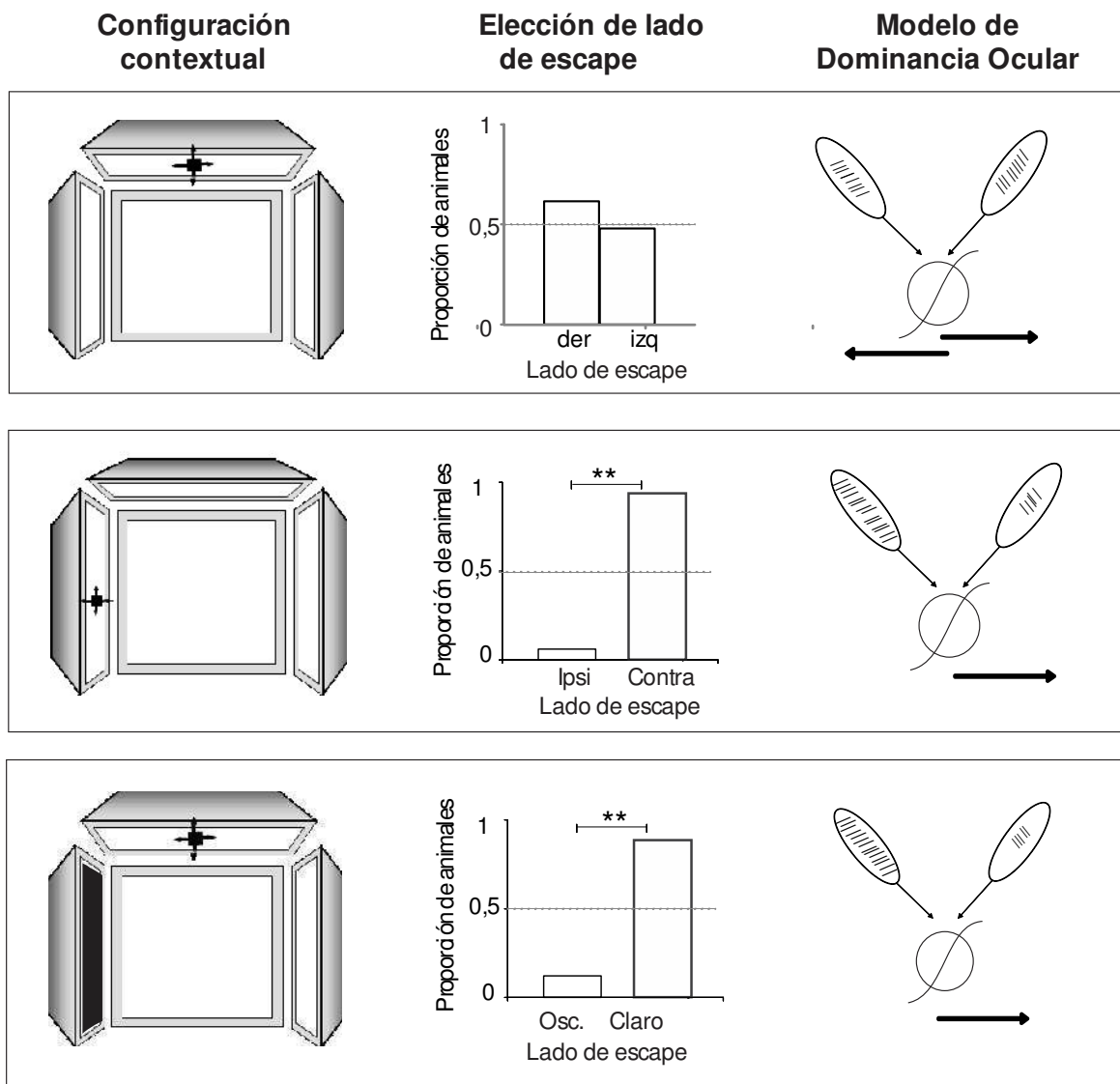


Figura 37. Modelo de Dominancia Ocular para predecir las respuestas comportamentales. Panel superior. Una situación de escapes balanceados, como es el resultante de un contexto simétrico en el que se presenta el estímulo looming dorsal, podría estar explicada por un procesamiento por parte de las LG con una intensidad similar en ambos lóbulos visuales. Panel medio. En el caso del looming presentado en el monitor lateral, los resultados comportamentales se dan de manera contundente hacia el lado opuesto. En tal caso, proponemos que habría una mayor intensidad en la respuesta de las LG del lado ipsilateral al looming. Panel inferior. Cuando el looming dorsal es presentado en un contexto visual asimétrico como el que se muestra en el esquema (un monitor apagado), los animales escapan en alta proporción hacia el lado más iluminado. En este caso, proponemos que la respuesta de las LG del lado oscurecido debería ser mayor a la que se obtiene en las correspondientes LGs desde el lado iluminado. Los resultados comportamentales son los mismos que se mostraron en experimentos de los capítulos 1 y 2.

Otras condiciones experimentales, como la asimetría en la polarización de la luz, la presencia de barras con distintas orientaciones o la condición de monocularidad, permiten también predecir el lado de escape. No obstante, para poner a prueba nuestra hipótesis de determinación del lado de escape por competencia interocular entre neuronas LG decidimos explorar las respuestas de neuronas LG frente a: 1) looming laterales, 2) looming dorsal en condiciones de entorno visual simétrico y 3) looming dorsal en condiciones de asimetría de iluminación contextual. Se eligieron estas condiciones (ilustradas en la figura 37), porque ofrecieron elección comportamentales muy claras y además fáciles de abordar con experimentos electrofisiológicos.

2. Métodos específicos

Para evaluar cómo es procesado el estímulo looming por las neuronas gigantes de la lóbula, registramos la respuesta de 36 neuronas LG de distintos tipos frente a los mismos estímulos visuales y condiciones de luminosidad que se utilizaron en los experimentos comportamentales. En la mayoría de los casos se registró una única LG por animal, evaluándose la respuesta frente a 6 a 12 estímulos, que fueron repetidos al menos dos veces. En cada neurona se consideró, para cada tipo de estímulo, el promedio de respuesta de todos los registros que se efectuaron.

Como explicamos en la sección de Materiales y Métodos Generales, los animales eran precisamente centrados en el dispositivo de electrofisiología, y eran sometidos al estímulo looming. Los registros comenzaron siempre luego de al menos 10 minutos de impalada la neurona, facilitando tanto el reposo del animal frente a estímulos visuales como la estabilización de la actividad eléctrica de la neurona registrada.

En una primera fase, analizamos las respuestas de las LG registradas frente a los estímulos looming, calculando distintos parámetros de la respuesta a estos estímulos. El parámetro de la respuesta electrofisiológica que tomamos en cuenta para el análisis fue el número de potenciales de acción (PA), puesto que se trata de una medida básica sobre la información que estas neuronas de proyección envían río abajo del lóbulo óptico.

En la figura 38 se muestra un ejemplo de respuesta de una neurona LG de la clase monoestratificada de tipo 1 (MLG1) frente a un estímulo looming de aproximación dorsal. Como puede observarse, la actividad de esta neurona muestra una fase de escasa o nula tasa de disparos durante el período previo a la estimulación (actividad espontánea), una fase donde la frecuencia de disparos se incrementa conforme el estímulo se expande (actividad evocada) y una fase nuevamente carente de disparos luego de la finalización de la expansión del estímulo.

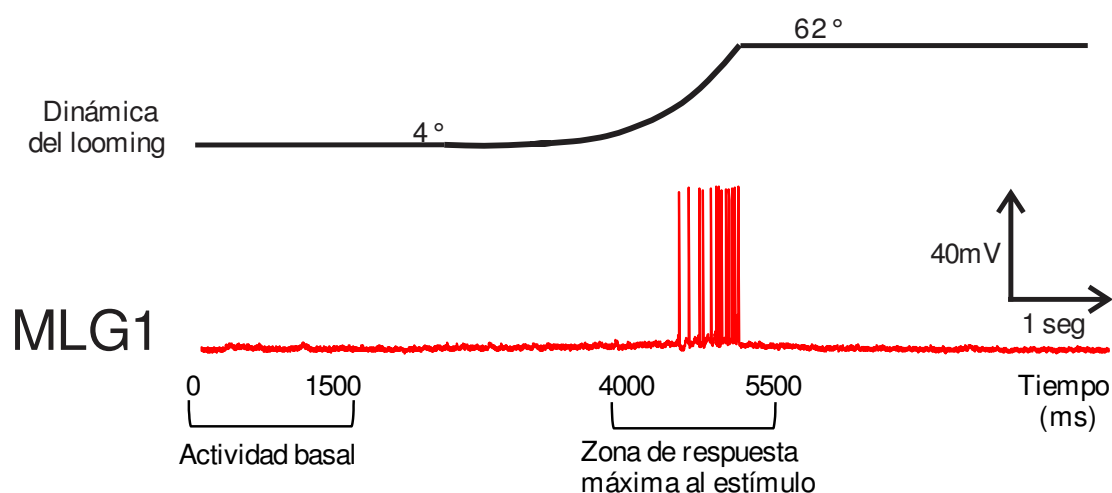


Figura 38. Registro de una MLG1 (neurona gigante de la lóbula, subtipo 1). Para los análisis, se calcularon parámetros correspondientes a las respuestas registradas en zonas de la misma duración, señaladas como “actividad basal” (sin estimulación), y “Zona de respuesta máxima al estímulo” (que incluye parte de la expansión del estímulo dorsal). El trazo superior en negro muestra la dinámica de estimulación con el estímulo looming.

Para nuestros análisis, consideramos los siguientes parámetros de la respuesta:

- Intensidad de la respuesta (PA)*: Esto lo calculamos como número de potenciales de acción medidos durante el período de máxima respuesta de la neurona, menos los potenciales de acción registrados durante la actividad basal previa a la estimulación con el looming.
- Latencia de respuesta (t)*: momento del primer potencial de acción registrado luego del inicio del movimiento del estímulo.

Estos parámetros se obtienen de las siguientes zonas que delimitamos para cada registro:

Actividad basal: consideramos la respuesta basal de la neurona como la intensidad de disparo registrada durante los 1500 ms previos a que comienza el movimiento del estímulo looming.

Zona de respuesta Máxima: consideramos 1500 ms que contienen los 1200 ms previos a la finalización de la expansión del looming y 300 posteriores al final de la expansión (dado que algunas neuronas continúan su respuesta por algún tiempo).

Clasificación de las LG en los distintos subtipos conocidos. Se utilizaron los criterios fisiológicos descritos por Medan y col. (2007) para clasificar a las LG registradas en los 4 subtipos conocidos, resumidos en la tabla 1. Cabe aclarar que el estímulo de movimiento utilizado para esta caracterización era un estímulo traslacional, no un estímulo de expansión.


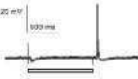






Subtipo LG	Actividad espontánea	Respuesta al movimiento	Pulso de Luz	Sensibilidad Mecánica	Campo Receptivo
MLG1	Muy silenciosa	Potenciales de acción, montados sobre EPSP. 	Respuesta fásica. Puede ser una depolarización o hiperpolarización tanto al on como al off, o eventualmente un potencial de acción. 	No	Definido pequeño
MLG2	Variable	Muy variable. Potenciales de acción, seguidos de hiperpolarización luego de finalizado el estímulo. 	Pocos spikes al inicio y al final. 	Sí	Completo uniforme
BLG1	Alta. Regular.	Aumento en tasa de disparo que persiste cuando termina el estímulo. 	Hiperpolarización al principio. Leve incremento de spikes durante el pulso. 	Sí	Completo no tan uniforme
BLG2	Constante. En salvas.	Hiperpolarización inicial seguida de aumento de frecuencia. 	Breve hiperpolarización al inicio y al final. 	Sí	Amplio

Tabla 1. Propiedades fisiológicas que permiten distinguir a los cuatro grupos de LG, ante un estímulo traslacional (modificada a partir de Tabla 2, Tesis Doctoral Violeta Medan, 2008).

En la figura 39 se muestra la respuesta característica de estos subtipos de neuronas gigantes de la lóbula al estímulo looming dorsal.

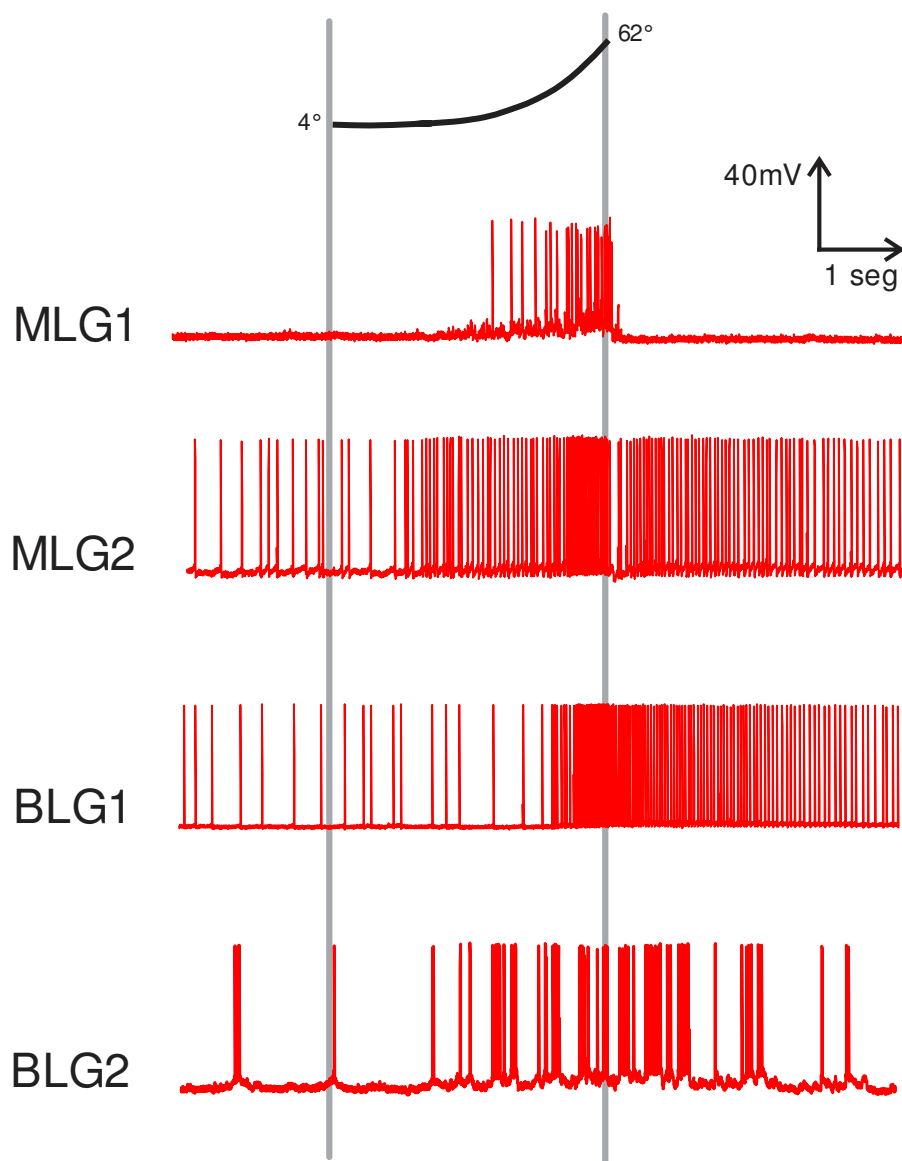


Figura 39. Respuesta de las LG ante el estímulo looming dorsal. Se muestran registros representativos de 4 neuronas pertenecientes a los 4 tipos de LG descritas en el laboratorio. En la figura se puede ver las respuestas típicas de las neuronas MLG1, MLG2, BLG1 y BGL2 a un estímulo cuadrado en expansión (estímulo looming dorsal). Como puede observarse, los estímulos de colisión generan respuestas intensas, aumentando su tasa de disparo a medida que se produce la expansión. En la parte superior se grafica con una curva negra la dinámica de estimulación con el looming dorsal en un contexto simétrico.

3. Respuesta neuronal en función de la dirección de aproximación del estímulo.

A continuación nos propusimos caracterizar las respuestas de las neuronas registradas al estímulo looming proveniente desde los monitores laterales, y compararlos con el estímulo looming proveniente desde el monitor dorsal.

En la figura 40 se muestran los resultados para los promedios de las respuestas obtenidas de neuronas registradas en animales que fueron desafiados con el looming proveniente del monitor dorsal, ipsilateral, o contralateral al lado de registro.

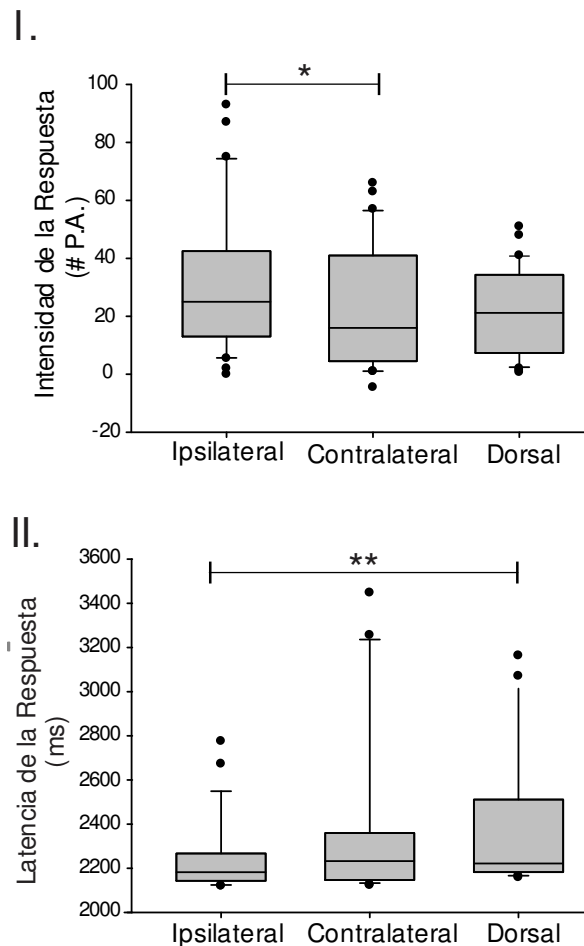


Figura 40. Sensibilidad de las LG por la dirección de aproximación del estímulo looming. Se muestran los promedios de las respuestas registradas en 31 LG ante los estímulos looming presentados en el monitor ipsilateral, monitor contralateral y monitor dorsal con respecto al lado donde se efectuó el registro. I. Intensidad de la respuesta medida como cantidad de potenciales de acción (Test de Friedman, comparaciones múltiples a posteriori de Dunn, Ipsilateral vs Contralateral, * para $P < 0,05$). II. Latencia de la respuesta. (Test de Friedman, comparaciones múltiples a posteriori de Dunn Ipsilateral vs dorsal, ** para $P < 0,01$).

Los resultados para intensidad de la respuesta muestran que hay diferencias estadísticas significativas según el monitor desde el cual se presenta el estímulo siendo mayor la respuesta entre el looming ipsilateral y el contralateral al lado del registro (Test de Friedman, $P=0,033$, comparaciones múltiples a posteriori de Dunn, Ipsilateral vs Contralateral: $P<0,05$, Fig. 40, panel I). Asimismo, la latencia de la respuesta es menor cuando el looming es ipsilateral al ojo de registro (Test de Friedman, $P=0,005$, comparaciones múltiples a posteriori de Dunn: Ipsilateral vs dorsal: $P<0,05$, Fig. 40, panel II).

En particular, el dato individual acerca de la intensidad de respuesta en cada uno de los monitores, nos sirvió para categorizar la preferencia de cada uno de estos elementos, según respondieran con mayor intensidad al looming presentado en uno u otro monitor lateral. De las 32 neuronas evaluadas con los estímulos laterales, 23 mostraron preferencia por el monitor ipsilateral al lado de registro, 2 no mostraron preferencia de lado y 7 mostraron una mayor respuesta al estímulo presentado en el monitor contralateral. Una mayor sensibilidad a los estímulos presentados en el monitor contralateral indica que se trata de neuronas con campos receptivos orientados en esa dirección, las que podrían estar siendo registradas desde su árbol dendrítico, o desde las arborizaciones terminales de neuronas que se proyectan desde el lado contralateral (Tesis Medan 2008).

4. Respuesta neuronal ante el looming dorsal en distintos contextos.

Con el objeto de evaluar el efecto del contexto en el procesamiento del looming dorsal por parte de las LG, evaluamos la respuesta electrofisiológica de las mismas en situaciones donde se presenta el estímulo dorsal en una configuración del contexto simétrica o asimétrica. Por un lado, la respuesta ante el estímulo de expansión presentado en el monitor dorsal evoca una respuesta menos intensa, en comparación al estímulo looming lateral (fig. R40, panel I). Sumado a esto, la pregunta que nos propusimos responder requería detectar pequeñas diferencias en el procesamiento de este estímulo en distintos contextos visuales.

Contextos visuales simétricos

Se calculó la intensidad de la respuesta ante el looming dorsal medida como número de potenciales de acción obtenidos en la región de máxima respuesta, en entornos visuales iluminados u oscuros (Figura 41). Cuando el estímulo dorsal es presentado en un entorno visual simétrico, como es la situación en la que se encuentran encendidos o apagados ambos monitores laterales, las LG responden al looming dorsal con intensidad similar, a pesar de la diferencia en la luminosidad general del entorno. Estos resultados son coherentes con los resultados comportamentales mostrados en el capítulo 2, en los cuales las intensidades de escape de los cangrejos en estas configuraciones contextuales son comparables.

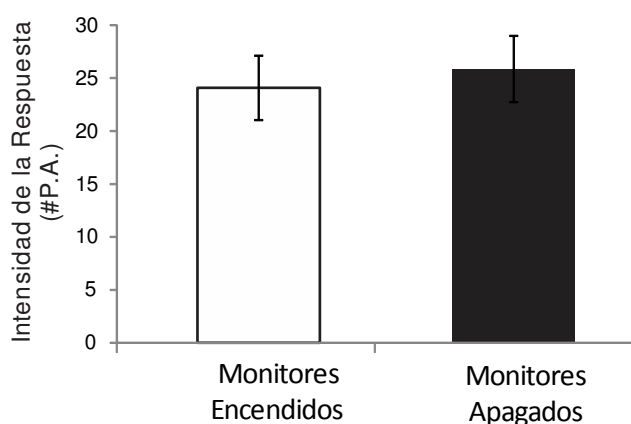


Figura 41. Respuesta de las LG en contextos visuales simétricos. En configuraciones simétricas del contexto visual, las intensidad de respuesta de las LGs ante el estímulo dorsal con ambos monitores laterales encendidos o apagados son similares (N=23, Test T pareado, P=0,34).

Contextos visuales asimétricos

Para analizar la respuesta de las neuronas ante el estímulo looming dorsal en entornos asimétricos, utilizamos la misma configuración que en el dispositivo comportamental: un monitor lateral apagado y uno encendido. Para comenzar el análisis, decidimos considerar el conjunto completo de neuronas registradas sin distinguir entre los subtipos de LG. En la figura 42 se muestran las diferencias en la respuesta de las neuronas ante estas dos configuraciones del entorno.

Para cada neurona registrada, calculamos su preferencia en la respuesta ante el looming en ambas configuraciones. Para esto calculamos, para cada elemento, un “Índice de

preferencia contextual”, que incluyera las respuestas ante el looming dorsal en ambos contextos visuales (ipsilateral apagado o contralateral apagado). El índice se calculó como un cociente de la intensidad de la respuesta entre ambas condiciones:

IPC (Índice de preferencia contextual)= Intensidad de la respuesta con el lado ipsilateral apagado / Intensidad de la respuesta con el lado contralateral apagado.

Para este análisis, IPC=1 implica que no hay preferencia entre la respuesta de la neurona en ambos contextos. Si agrupamos todos los índices obtenidos para las neuronas, obtenemos la distribución mostrada en el panel II de la figura 42. De las 36 neuronas evaluadas, 22 (62%) mostraron IPC mayores a 1 (mayor respuesta cuando el looming dorsal es presentado con el lado ipsilateral apagado) (fig.42, panel II).

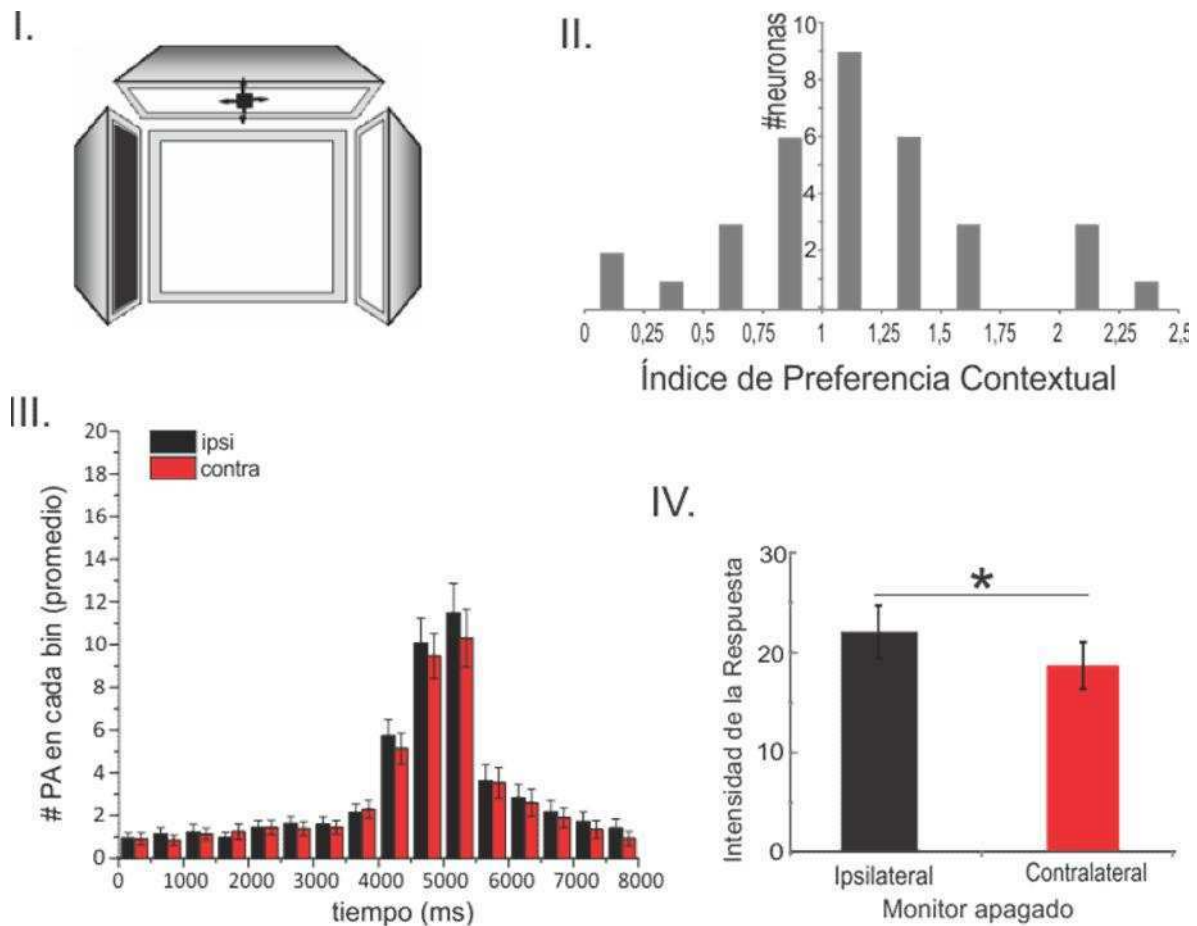


Figura 42. Respuesta de las LG ante el estímulo de aproximación dorsal presentado en dos contextos visuales diferentes. I. Se registró la respuesta de cada neurona ante el estímulo presentado en un entorno visual donde el monitor ipsilateral o contralateral se encontraban apagados. De cada neurona se tomaron las respuestas ante ambas condiciones. II. Se calcularon los IPC (Índices de preferencia contextual) de cada neurona. Se muestra el número de neuronas que cae en cada rango de IPC. Las neuronas con valores de IPC que superan un valor de 2,25 se contabilizan dentro del último bin. El 62% de las LG responde más cuando el estímulo dorsal se presenta en un entorno con el monitor ipsilateral apagado (N= 36, X2 Pearson, $P < 0,05$). III. Se muestra la cantidad de potenciales de acción obtenidos en ambas condiciones, por todo el conjunto de neuronas LG, separados en fracciones de 0,5 segundos. Se observa que en el momento de máxima expansión del estímulo (entre 4 y 5,5 segundos), la respuesta de las LG en un entorno donde el monitor ipsilateral se encuentra apagado es mayor que en entornos donde el monitor contralateral es apagado. IV. Un análisis cuantitativo de la respuesta en la Zona de Máxima Respuesta (de 4 a 5,5 segs) de cada neurona en entornos con luminosidad asimétrica, muestra que las neuronas responden más cuando el monitor ipsilateral se encuentra apagado (N= 36, Test T pareado, * para $P < 0,05$).

A continuación, quisimos observar la dinámica para la intensidad de la respuesta de todas las neuronas analizadas. El análisis se realizó fraccionando los primeros 8 segundos en espacios de 500 ms, y en cada uno de esos bloques se contabilizó la cantidad promedio de potenciales de acción de todas las neuronas registradas (Figura 42, panel III). Por último se cuantificó la intensidad de la respuesta de todas las neuronas en ambas condiciones, considerando la región de máxima respuesta (Figura 42, panel IV).

Los resultados muestran claramente que el sentido de la asimetría de iluminación contextual lateral afecta diferencialmente la respuesta de las LGs al looming dorsal. Cuando el monitor apagado es el monitor ipsilateral, las neuronas responden con mayor intensidad ante el estímulo dorsal. Esto sucede en una ventana temporal definida, entre 4 y 5,5 segundos, con lo cual no parecería ser debido a la diferencia en la luminosidad general, sino una lectura diferencial del looming dorsal en ambos contextos (N=36, Test T pareado, $P = 0,011$).

Efecto del contexto en el procesamiento del Looming Dorsal en los distintos subtipos de LG.

Aun cuando las neuronas que denominamos genéricamente LG comparten entre sí muchas características, los 4 tipos distintos que han sido identificados se diferencian en varios aspectos. A raíz de esto, nos preguntamos si las diferencias observadas en el procesamiento del estímulo en relación con las asimetrías contextuales se dan a nivel de algún tipo de LG en particular, o es un procesamiento que surge de la acción concertada de las LG como un todo.

Analizamos entonces las respuestas de las neuronas LGs separadas en cada uno de los 4 tipos conocidos: MLG1, MLG2, BLG1 y BLG2. La figura 43 muestra los IPC de cada una de las neuronas agrupadas en esos tipos (los valores de IPC por fuera del rango de 0 a 2 fueron saturados en esos máximos). El gráfico también muestra en código de colores las preferencias de cada neurona frente a la presentación de estímulos looming laterales, donde las barras azules corresponden a neuronas con mayor respuesta al looming ipsilateral (23 neuronas, incluyendo las dos con IPC=1), las rojas a neuronas que respondieron más al looming contralateral (7 neuronas) y las negras a neuronas que no mostraron una preferencia clara o que no pudieron ser evaluadas con los looming laterales (6 neuronas).

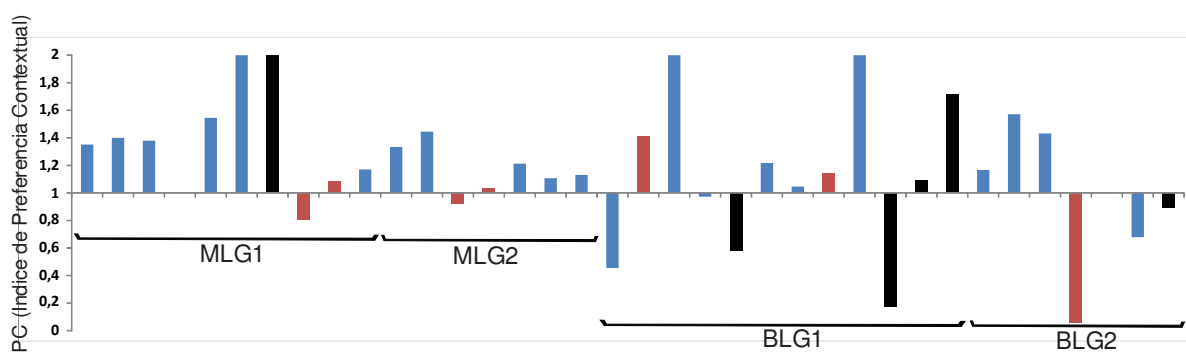


Figura 43. IPC para cada tipo de LG. En azul se muestran las neuronas que muestran una preferencia por el looming proveniente del monitor ipsilateral, en rojo las que responden más al looming contralateral y en negro las que no muestran preferencia o no pudieron ser evaluadas con los loomings laterales (N=36). Las dos neuronas con un IPC=1 (sin barras), tenían una preferencia por el looming ipsilateral.

Al analizar los Índices de Preferencia Contextual en función del tipo de neurona LG, podemos observar que la mayoría se encuentra por encima de 1, evidenciando así una mayor respuesta en el caso del monitor ipsilateral apagado (Figura 43). Sin embargo, también se observa que hay diferencias dentro de los subtipos de LG. Los grupos que muestran mayor variabilidad en el IPC son las BLG1 y las BLG2, donde el número de neuronas que respondieron más intensamente con el lado contralateral o ipsilateral apagado fue similar. En los tipos MLG1 y MLG2, la mayoría de las neuronas (8 de 10 y 6 de 7 respectivamente) respondieron más ante el looming dorsal cuando el monitor ipsilateral se encontraba apagado.

Para evaluar de manera más detallada el comportamiento de cada tipo de LG, analizamos las respuestas discretizadas en espacios temporales de 500 ms para cada una de las 4 clases. Los resultados se muestran en la columna izquierda de la figura 44. En el caso de las MLG1, los histogramas de número de potenciales de acción muestran que la respuesta al looming dorsal es más intensa cuando este fue presentado en un entorno con el monitor ipsilateral apagado, que cuando el contexto se hallaba invertido. Algo similar puede observarse en el grupo de las neuronas MLG2, en especial sobre la región de máxima respuesta. Por otra parte, la respuesta de las neuronas de tipo BLG1 y BLG2 no parece haber sido afectada por las variantes de iluminación contextual. Estas impresiones se confirman cuando el análisis se restringe a la zona de máxima respuesta, cuyos resultados se muestran en la columna derecha de la figura 44. En efecto, durante el momento de máxima expansión del estímulo (entre 4 y 5,5 segundos), la respuesta de las MLG1 y las MLG2 en el entorno donde el monitor ipsilateral se encuentra apagado es significativamente mayor que en el entorno donde el monitor contralateral es el apagado ($P < 0,01$, $N = 10$ y $P < 0,05$, $N = 7$ respectivamente; Wilcoxon matched-pairs). Por otro lado, no se hallaron diferencias en las respuestas de las neuronas de tipo BGL1 y BGL2 (Wilcoxon matched-pairs, $N = 12$, $P = 0,58$, y $N = 7$, $P = 0,68$, respectivamente).

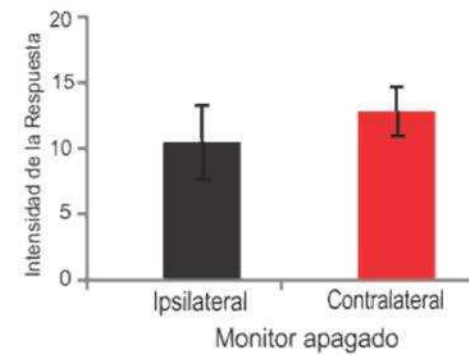
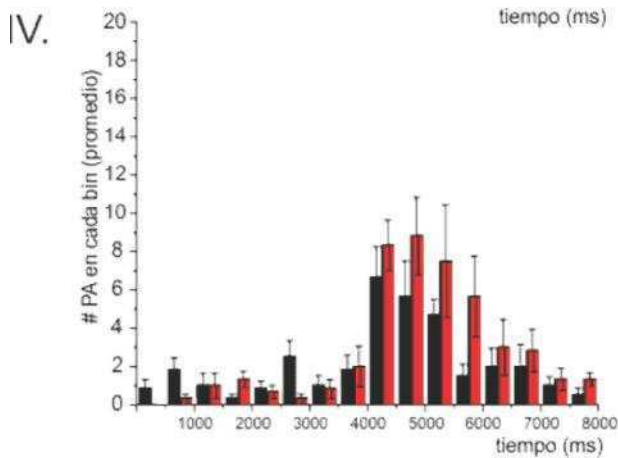
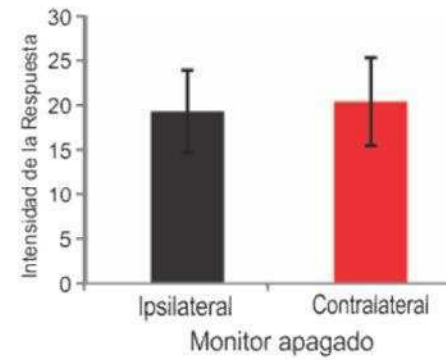
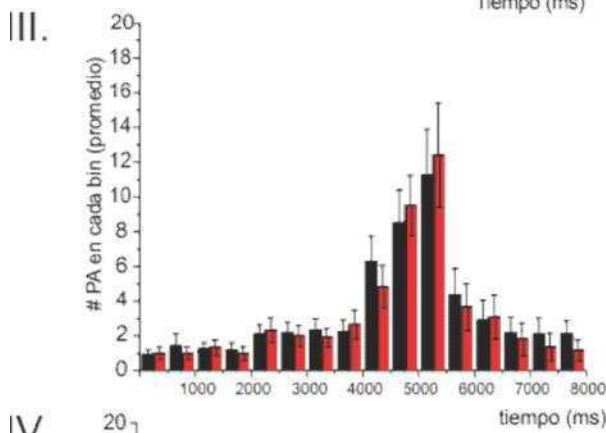
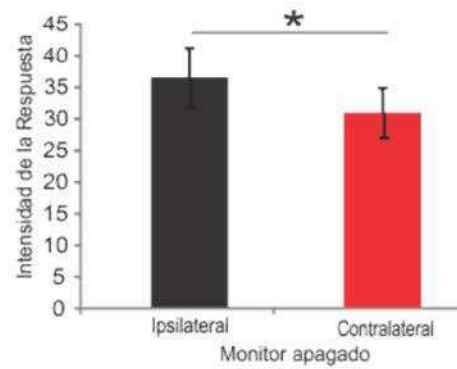
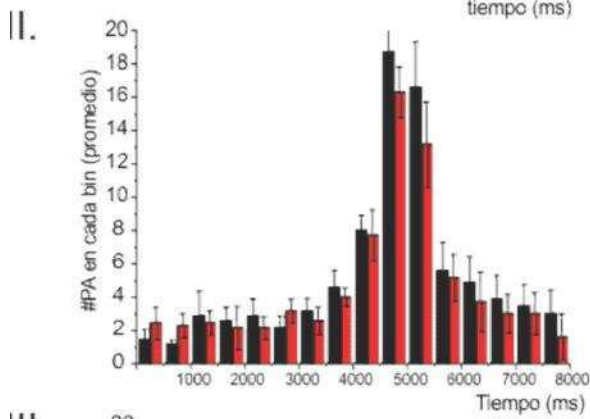
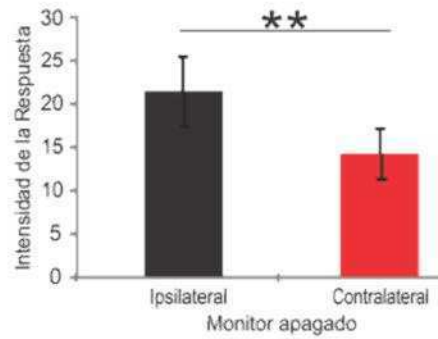
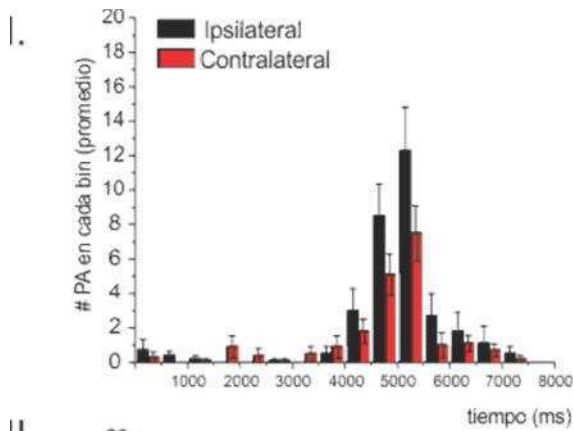


Figura 44. Respuesta de cada tipo de LG ante el looming dorsal en contextos asimétricos. I. Se analizó la cantidad de potenciales de acción evocados por todas las MLG1 en ambos contextos y el promedio en la zona de máxima respuesta (N=10, Wilcoxon matched-pairs, ** para $P < 0,01$). II. Número de potenciales de acción evocados por todas las MLG2 en ambos contextos y el promedio en la zona de máxima respuesta (N=7, Wilcoxon matched-pairs, * para $P < 0,05$). III. Número de potenciales de acción evocados por todas las BLG1 en ambos contextos y el promedio en la zona de máxima respuesta (N=12, Wilcoxon matched-pairs, $P = 0,58$). IV. Número de potenciales de acción evocados por todas las BLG2 en ambos contextos y el promedio en la zona de máxima respuesta (N=7, Wilcoxon matched-pairs, $P = 0,68$).

5. Discusión

Al comienzo de este capítulo planteamos una hipótesis simple sobre el mecanismo neuronal de decisión del lado de escape, basada en antecedentes previos y en los resultados comportamentales más robustos de esta tesis. Nuestra hipótesis, sencillamente, es que la decisión por el lado hacia el cual escapar resulta de una competencia de la intensidad de respuesta de las neuronas de cada lado del cerebro.

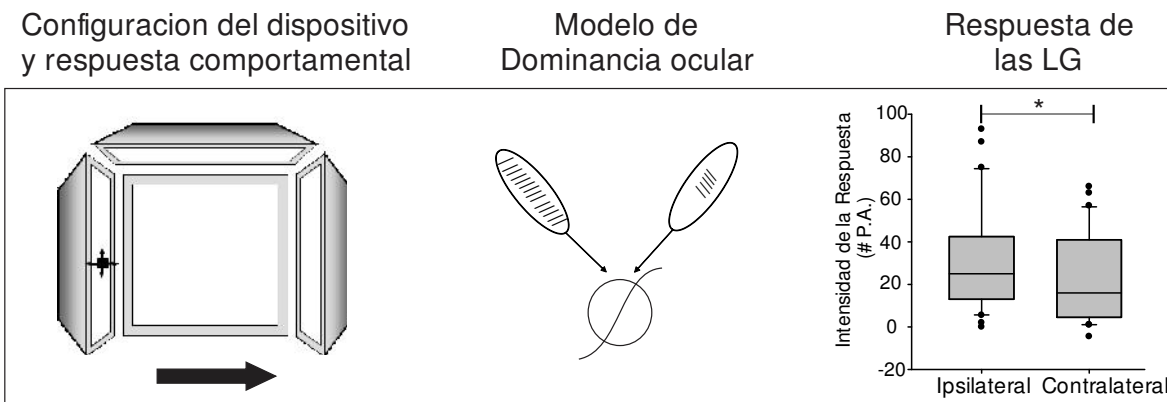
Considerando resultados previos del laboratorio, en los que se mostró una importante correlación entre la intensidad de la respuesta de neuronas gigantes de la lóbula (LG) y la intensidad de la respuesta de escape de los cangrejos, nuestra hipótesis propone que *una competencia entre las intensidades evocadas por LG de ambos pedúnculos oculares, sería el mecanismo que determinaría el lado de escape a ese nivel de procesamiento.*

A partir de la hipótesis de competencia neuronal, planteamos modelos sencillos acerca del procesamiento que se estaría llevando a cabo para cada una de las situaciones comportamentales exploradas. Para poner a prueba dicha hipótesis, evaluamos las respuestas electrofisiológicas de 36 LG en un dispositivo con condiciones de presentación del estímulo y de configuración contextual similares a las utilizadas en el dispositivo comportamental.

Los resultados presentados en este y los anteriores capítulos muestran que:

- 1) Los animales desafiados con los looming laterales escapan indefectiblemente en la dirección contraria a la de aproximación del estímulo. En nuestro modelo esto implica que la intensidad de la respuesta de las neuronas que son estimuladas desde el lado

ipsilateral, superaría a la de las LG del otro lóbulo óptico, imponiendo de ese modo la decisión por escapar hacia el lado contralateral. Al evaluar las respuestas de las LG ante looming laterales, encontramos que en efecto responden con mayor intensidad ante estímulos que se aproximan desde el lado ipsilateral al de registro. Estos resultados electrofisiológicos son coherentes con el modelo de dominancia ocular para la decisión por el lado de escape que hemos planteado

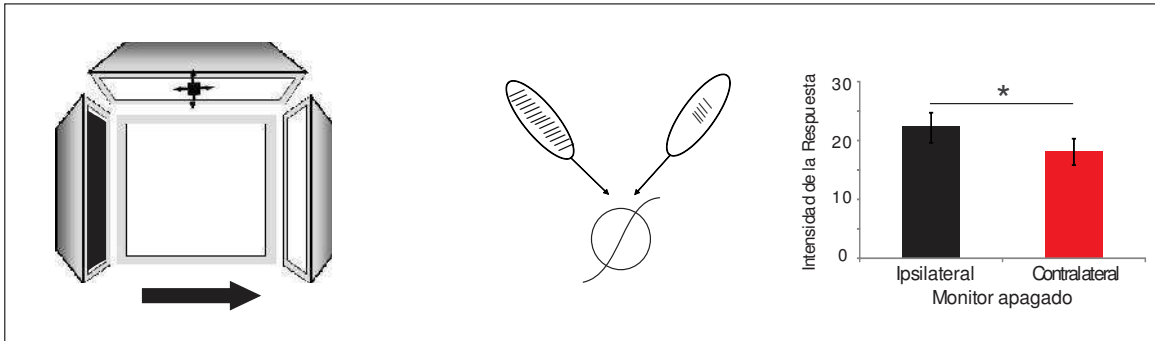


2) Resultados comportamentales del capítulo 2 mostraron que cuando son desafiados con el looming dorsal en un contexto de luminosidad asimétrica, lo animales claramente deciden escapar hacia el lado más iluminado. De acuerdo a nuestro modelo de dominancia ocular, deberíamos esperar que la respuesta de las neuronas LG al looming dorsal fuese mayor en condiciones donde el monitor lateral que se encuentra apagado es el ipsilateral al lado del registro. Y eso fue en efecto lo que pudimos observar (Fig. 42). Es importante destacar que estas neuronas no parecen estar codificando la luminosidad general, ya que la intensidad de la respuesta es similar en el caso del contexto simétrico iluminado u oscurecido. Las neuronas solo responden de manera diferente al looming dorsal en el caso en el que haya una asimetría contextual en la iluminación, siendo la respuesta más intensa cuando el monitor ipsilateral es el que se encuentra apagado. Estos resultados son entonces también coherentes con nuestro modelo de dominancia ocular que predice por que los animales escapan de manera contralateral al lado apagado.

Configuración del dispositivo y respuesta comportamental

Modelo de Dominancia Ocular

Respuesta de las LG

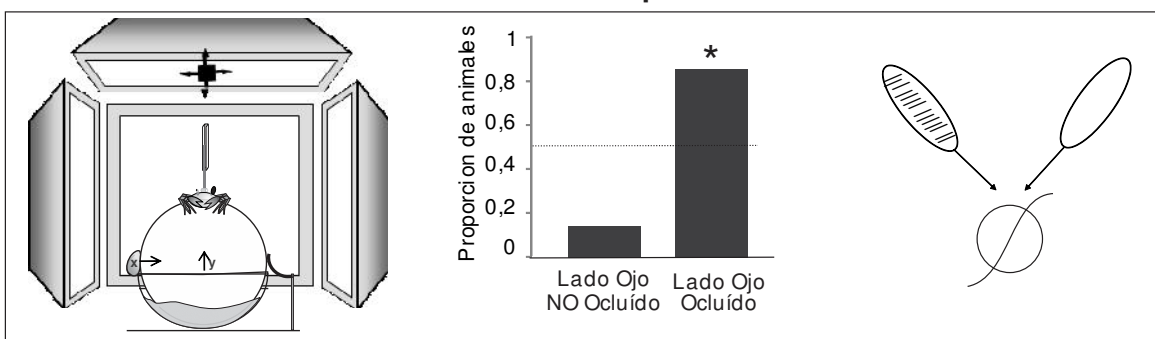


3) El modelo de dominancia ocular para la elección del lado de escape permite explicar también los resultados comportamentales obtenidos con animales monoculares (Fig. 27, panel I). En esos experimentos, obtuvimos resultados completamente anti-intuitivos ya que, ante el looming dorsal, los animales escapaban hacia el lado del ojo ocluido, es decir hacia donde su visión se encontraba disminuida. Si pensamos dichos resultados a la luz del modelo de procesamiento que los resultados de este capítulo estarían sugiriendo, los mismos resultan coherentes. En efecto, en animales monoculares la información del estímulo se procesaría a través de uno solo de los lóbulos ópticos, lo que impone un dominio en la competencia interocular de las LG haciendo que el animal escape hacia el lado del ojo ocluido.

Configuración contextual

Elección de lado de escape

Modelo de Dominancia Ocular



4) Cuando analizamos las respuestas de los distintos tipos de LG, los resultados muestran que las MLG1 y las MLG2 muestran respuestas más intensas ante el looming dorsal

cuando el lado ipsilateral está apagado. Esto no es así para las neuronas de los tipos BLG1 y BLG2. Los resultados sugieren entonces que las MLG tendrían un papel más destacado que las BLG en lo referidos a la determinación del lado de escape. De hecho, el ensamble de neuronas LGM1 representa un mapa de posiciones de objetos que parece ser fundamental en el control direccional de las respuestas de escape (Medan y col., 2015). No obstante el número de neuronas de cada tipo de LG registradas es aún bajo, y sería necesario aumentarlo para evaluar de manera más robusta el rol que cada tipo tiene en este proceso de toma de decisión. Además, otras neuronas no particularmente sensibles al movimiento, como las dimming y sustaining de la medula, podrían también participar de estos procesos.

Hecha esta salvedad, los resultados apoyan nuestra hipótesis de que el mecanismo de procesamiento para la elección del lado de escape en *Neohelice granulata*, involucra una competencia entre las intensidades de la respuesta de las LG de ambos lóbulos ópticos.

Sección 4. Conclusiones Generales y Discusión.

Neohelice granulata es un modelo experimental muy utilizado en estudios relacionados al aprendizaje y la memoria; no sólo por sus habilidades cognitivas, sino también porque es factible acceder a su sistema nervioso con el fin de correlacionar sus cambios con variables comportamentales (ver Sección Introducción). En esta tesis, utilizamos este modelo invertebrado y nos focalizamos en un fenómeno ampliamente presente en numerosos taxones, como es la *toma de decisiones*.

A lo largo de esta tesis comprobamos que el cangrejo es un excelente modelo experimental para ahondar esta temática, dado que es factible llevar a cabo estudios tanto desde lo conductual como desde lo electrofisiológico. Con respecto a los experimentos, aunque es sumamente difícil reconstruir el flujo de información que reciben los animales en su hábitat natural, los resultados obtenidos a partir de las condiciones experimentales utilizadas en el laboratorio, nos permiten obtener información muy valiosa.

Nuestro objetivo general al iniciar este trabajo de investigación era que, en un contexto de riesgo inminente y sometido a una situación de ambigüedad acerca de la decisión correcta que tomar (como lo es el lado de escape ante un estímulo looming dorsal), variables del contexto en el cual está inmerso el animal así como experiencias previas, influyen en la elección del lado de escape de este animal. Para encarar este objetivo, contábamos en el laboratorio con dispositivos experimentales que permiten registrar y sincronizar las señales visualmente relevantes para el animal, tanto para la respuesta comportamental como para la respuesta neuronal.

Los principales resultados que aporta esta tesis son:

- Ajustamos con éxito las condiciones de los dispositivos comportamentales y electrofisiológicos, para comenzar a poner a punto un paradigma de toma de decisiones de dos alternativas en *Neohelice*. Estos dispositivos experimentales nos permitieron registrar y sincronizar las señales visualmente relevantes para el animal de manera muy fiable, tanto para la respuesta comportamental como para la respuesta neuronal.

- Logramos una situación precisamente simétrica, tanto en la posición del estímulo sobre el cangrejo, como la del contexto que lo rodeaba. Esto nos permitió tener una

situación control a partir de la cual modificar el contexto, y evaluar la respuesta de *Neohelice* en distintas condiciones.

- Mostramos que este animal puede detectar desfasajes del estímulo dorsal a partir de 8,8° de desplazamiento del centro de la línea vertical (Capítulo 1, sección 3.1). Este resultado muestra la sensibilidad visual del cangrejo a la posición del estímulo en el campo dorsal. Aunque sabemos que la mayor zona de agudeza visual de este animal se ubica en una banda alrededor del ecuador del ojo (Berón y col 2011) donde la sensibilidad a la posición de los objetos se halla por debajo de 1° (Medan y col., 2015).

- Caracterizamos la respuesta de elección de lado de escape del animal ante el estímulo looming desde el campo dorsal del animal, y analizamos las variables que afectan la elección de lado de escape. Mostramos que la luminosidad, la polarización de la luz y la presencia de objetos virtuales afectan la decisión de hacia dónde escapar.

- Mostramos que se trata de una toma de decisiones plástica, poniendo a punto un paradigma de evitación activa que muestra que el cangrejo asigna un valor a las opciones y modifica su elección de lado de escape, en tan solo un ensayo de condicionamiento.

- Caracterizamos la respuesta de las LG ante el looming dorsal en distintos contextos visuales, y mostramos evidencias que apoyan un modelo de competencia interocular, donde el desbalance entre los disparos de las LG de ambos pedúnculos oculares, determinan el lado de escape ante el estímulo dorsal.

La mayoría de los resultados particulares fueron discutidos en cada capítulo. A continuación, discutiremos algunos puntos generales que surgen de estos resultados, y los alcances de los mismos.

Las respuestas de escape ante el estímulo looming dorsal se dan de manera equiprobable hacia ambos lados

Ante el looming dorsal la gran mayoría de los animales (88%) despliega una respuesta de escape medible eligiendo la mitad de ellos escapar hacia su derecha y la otra mitad hacia su izquierda, con lo cual este paradigma resulta adecuado para analizar la toma de decisiones restringido a dos alternativas en la respuesta de escape. Con respecto al escape ante el

estímulo dorsal, los resultados muestran que esta condición representa una incerteza para el animal, que aumenta el tiempo de la decisión acerca de hacia dónde escapar. Esto implicaría que esa decisión tiene una complejidad mayor que aquella implicada en las respuestas a los looming laterales y por consiguiente requiere de más tiempo de procesamiento (capítulo 1). Es de destacar que, en cada uno de los experimentos que analizamos en condiciones de contextos simétricos, para cada grupo de cangrejos obtuvimos respuestas de lado de escape balanceadas a derecha e izquierda. Con respecto a los parámetros que definen el lado de escape ante este estímulo, dicha decisión no parece ser influida por asimetrías físicas, como por ejemplo la presencia de diferencias en el tamaño de las quelas.

Persistencia individual de la primera elección como estrategia de explotación de un resultado ante una situación de peligro.

Por otra parte, los análisis de toma de decisiones a nivel individual, muestran que los animales que se enfrentan a esta decisión de manera repetida eligen escapar significativamente siempre hacia un mismo lado (ver Capítulo 1, sección 4). Sin embargo, nuestros experimentos muestran que esto no es debido a una asimetría física que predisponga el escape hacia uno de los lados (capítulo 1, sección 5.1), y sugieren fuertemente que este comportamiento repetitivo no es el resultado de una lateralización de la respuesta (capítulo 1, sección 5.2), fenómeno que sí se ha observado en numerosos modelos animales, tanto vertebrados como invertebrados (Vallortigara y Rogers, 2005, Letzkus y col., 2006, Tommasi, 2009). En abejorros de la especie *Bombus sp.* se ha observado que, cuando son enfrentados a una decisión de dos alternativas (seguir forrajeando una inflorescencia hacia uno u otro lado), los individuos deciden moverse de manera repetida hacia el mismo lado (Kells y Goulson, 2001). Los autores sugieren que la hipótesis más plausible es que el abejorro repite su comportamiento debido a que ha probado ser exitoso. Esto está en línea con la hipótesis de “información costosa” de Chittka y col. (“costly information” hypothesis, Chittka y col., 1999), que propone que si la información acerca del “éxito” de realizar otra elección es costosa de obtener (este sería el caso para las decisiones de obtención de alimento y mucho más para la evitación de predadores), siempre que el animal este manteniendo el éxito con la elección que

toma, debería continuar apostando a esa alternativa. Así, la repetición del lado elegido para escapar en *Neohelice* podría ser el resultado de una toma de decisiones “conservadora”, donde lo más eficiente es seguir apostando por el lado que resultó ser una buena elección (efectivamente no hubo ataque de un predador), en lugar de arriesgarse a elegir un nuevo lado. Esta explicación es factible en el caso de una toma de decisiones como la de escape ante estímulos peligrosos, como sucede en el caso de *Neohelice*.

Sin embargo, cuando el estímulo se presenta nuevamente a un cangrejo, pero en un largo término (por ejemplo, a las 24 horas), la decisión de hacia dónde escapar resulta nuevamente impredecible (capítulo 1, sección 5.2). Resultados similares fueron reportados por Müller y col. (2010), quienes observan que las abejas mantienen la respuesta dentro de un mismo día, pero no luego de tres días. Por otra parte, que un mismo animal no persista en la elección de lado de escape que el día anterior mostró ser efectiva, puede deberse o bien a que no hay memoria de esta decisión a largo término en las condiciones de estos experimentos, o bien que las claves internas y condiciones externas no identificadas son diferentes entre ambos días, y el contexto de decisión es diferente.

Pero, ¿cómo se construye el valor relativo de seguir explotando una decisión conocida versus reducir la incerteza de una elección nueva a través de la exploración? Para comenzar a abordar esta pregunta, decidimos investigar la influencia que algunas características del contexto y de la experiencia de los animales podían ejercer sobre esta decisión.

Los cangrejos toman en cuenta claves contextuales en la elección del lado de escape ante el estímulo dorsal

Al reconstruir en condiciones de laboratorio algunas claves contextuales que sabemos son de relevancia para estos animales en su entorno natural, pudimos obtener información importante respecto a los parámetros que afectan a esta toma de decisiones. Resultó claro que en contextos de luminosidad simétrica (ya sea con los dos monitores laterales encendidos o apagados), los animales escapan con un patrón balanceado de elecciones (ver capítulo 2, sección 1.1). En cambio, en el contexto de luminosidad asimétrica, los animales eligieron escapar hacia el lado iluminado en una proporción muy

alta. Esta respuesta, altamente predecible, resulta una situación potencialmente útil para seguir explorando en profundidad este paradigma. Además de la luminosidad, otras claves relevantes como la presencia de barras con distinta orientación, y el plano de polarización de la luz, afectaron la elección del lado elegido ante el looming dorsal.

Estos resultados muestran que la misma información sensorial (misma posición y aproximación del estímulo), en diferentes contextos, lleva a la toma de decisiones diferentes, pero que pueden ser altamente predecibles.

Los cangrejos aprenden a cambiar el lado de escape: plasticidad en la valoración de las alternativas.

Dado que nuestro modelo experimental es un animal colectado de entornos naturales, es lógico que decisiones que enfrenta en dichos ambientes sean de naturaleza plástica, y adaptativamente modificable a los desafíos que enfrenta.

Por un lado, en un contexto de peligro inminente, sería poco intuitivo pensar que las alternativas se evalúen únicamente en base a la información contextual. En cambio, es dable pensar que cada alternativa (típicamente una acción, como explotar elecciones anteriores o explorar otras) necesita ser evaluada en relación a sus consecuencias potenciales, y a su congruencia con motivaciones internas. Así, en una toma de decisiones donde el valor asociado a la respuesta es variable, podemos pensar los experimentos de condicionamientos como situaciones donde las alternativas tienen valores distintos.

En la situación donde no hay ninguna asimetría visual asociada al contexto, los animales persisten ensayo tras ensayo en la primera elección. Podemos suponer que dicha primera elección tiene un resultado que consideran “positivo”. Quisimos evaluar la flexibilidad de la toma de decisiones cambiando el valor de las alternativas (castigando la primera elección).

Al castigar la primera elección del animal, cambia el valor asociado a dicha elección comportamental tomada, y la decisión cambia en tan solo un ensayo de condicionamiento (ver capítulo 3). Estos experimentos muestran que hay una evaluación permanente de las alternativas disponibles y los valores asociados a las mismas, y los continuos compromisos

en la decisión de persistir en una dada actividad o cambiar a una diferente, mostrando así una enorme plasticidad durante el procesamiento de esta toma de decisiones. Los experimentos de condicionamiento son otra estrategia para mostrar que esta es una decisión plástica, modificable, y que representa una instancia que puede incorporar información “aprendida”. En el capítulo 2 mostramos que son capaces de guiarse escapando hacia una barra vertical frente a una horizontal. Sería interesante investigar la posibilidad de implementar esta habilidad en un paradigma de discriminación de objetos. Esto representa una oportunidad para explorar si estos animales tienen capacidad de aprender claves complejas o incluso abstractas (como la habilidad de las abejas para aprender el concepto de simetría, Giurfa y col. 2001), e intentar que asocien claves que inicialmente no muestran un valor preferencial, a un resultado negativo o positivo. También, la posibilidad de explorar la capacidad de invarianza espacial del reconocimiento de claves, entrenando al animal por ejemplo con la barra vertical en una posición retinotópica seguida del castigo ante la elección de uno de los lados de escape, para luego ver si es capaz de manifestar ese aprendizaje cuando la barra se presenta en otra parte de su campo visual. Este tipo de experimentos de discriminación de claves visuales, sin embargo, suelen requerir de varias sesiones de condicionamientos, y continúa siendo un desafío lograr un protocolo de más de 7 ensayos donde el animal siga respondiendo con un escape.

Modelo de competencia interocular propuesto para la toma de decisiones ante estímulos looming dorsales

Como mencionamos en la introducción, una de las razones para estudiar los sistemas nerviosos de invertebrados es que, en algunos casos, la meta abstracta de comprender en detalle como el sistema nervioso produce el comportamiento, aparece como un horizonte realizable (Edwards y col., 1999).

Como pudimos observar en los experimentos comportamentales de esta tesis, la decisión del lado de escape está altamente determinada por el procesamiento neural de ambos pedúnculos oculares (capítulo 2, sección 2). Aun cuando en los animales monoculares responden a los looming laterales escapando siempre en sentido opuesto a la

posición del estímulo, indicando que en condiciones de baja ambigüedad la dirección del escape puede ser determinada monocularmente, frente a la incerteza que involucra el looming dorsal, el predominio de la información del ojo libre sobre la del ojo ocluido parece determinar el lado hacia el cual escapar. Dado que en tal circunstancia la elección parece depender en buena medida de la competencia entre la información provista por cada ojo, inferimos que debe existir un interjuego entre la lectura que realizan los grupos de neuronas de cada uno de los lóbulos ópticos que procesan la información del estímulo y del contexto.

Con todos los resultados comportamentales obtenidos, nos permitimos formular un modelo hipotético sencillo del procesamiento neuronal subyacente a dichas salidas motoras. Con estos resultados, se hace compatible un modelo de procesamiento de competencia interocular entre las entradas visuales de ambos pedúnculos oculares. El balance entre el procesamiento que realizan las neuronas involucradas en esta toma de decisiones de cada uno de los lóbulos ópticos, determinaría la salida motora. Este modelo, además, instala la hipótesis de que neuronas del lóbulo óptico del cangrejo no solo procesan la información acerca del estímulo, sino que además integran señales sobre el entorno visual y la valoración del mismo que afectan lo anterior.

Como dijimos, se trata de un modelo sencillo que no pone en consideración el aporte diferencial de las neuronas dentro de cada hemisferio en particular. En efecto, en los experimentos de la figura 26 con animales monoculares (un único ojo con capacidad de ver), se observó que cuando el looming lateral se presenta del lado del ojo ocluido la respuesta tiene menor intensidad y mayor latencia. Esto sería consecuencia de que la percepción visual del objeto con el lado medial del ojo es menor que con el lado lateral, como lo indican resultados anatómicos y fisiológicos previos (Berón de Astrada y col., 2011; Medan y col., 2015). Por ello, es dable pensar que las LG del lóbulo óptico ipsilateral a la posición del estímulo, respondan con más intensidad que las que se hallan ubicadas en el lóbulo contralateral. El modelo de competencia interocular simple que planteamos aquí no tiene en cuenta estas diferencias y solo analiza la competencia en términos de las contribuciones globales de las neuronas de cada hemisferio. Como vimos, esto resulta suficiente para explicar en buena medida los resultados comportamentales obtenidos en este estudio. Sin embargo, una modelo más realista requerirá incorporar también las interacciones (probable

competencia) entre las actividades de neuronas que en el mismo hemisferio son sensibles a objetos que se presentan del lado ipsilateral o medial.

Las LG participan en las vías de procesamiento de la toma de decisiones de lado de escape ante el estímulo dorsal

Trabajos previos en nuestro laboratorio mostraron una correspondencia estricta entre la respuesta de escape y la respuesta de las LG, en varias condiciones de estimulación visual. Los mecanismos neuronales involucrados en la toma de decisiones de la direccionalidad de escape, en distintos contextos visuales y en diferentes condiciones de valoración, podrían involucrar también a estas neuronas. En el último capítulo de esta tesis, comenzamos a explorar el rol de estas neuronas en el procesamiento de esta toma de decisiones, y mostramos evidencias que apoyan el modelo simple de procesamiento neuronal propuesto.

Los resultados del capítulo 4 sugieren que el procesamiento de esta toma de decisiones podría darse incluso a nivel de las neuronas LG, aunque el número de elementos registrados para cada uno de los tipos de LG resulta aún escaso. En un trabajo reciente se describió el papel central que el ensamble de 16 neuronas del tipo LGM1 tiene en la direccionalidad de la respuesta frente a estímulos que provienen desde diferentes posiciones del espacio a nivel del horizonte. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que las neuronas MLG1 también cumplirían un rol relevante en la determinación de la dirección del escape frente al looming dorsal. Sería interesante explorar si estas neuronas están involucradas también en la representación de la valoración de las alternativas. El hecho de que el paradigma de evitación activa ofrezca una respuesta comportamental predecible con tan solo un shock eléctrico, alienta la posibilidad de explorar las bases neurales del mismo.

Para concluir, este paradigma nos permitió investigar el proceso de toma de decisiones en la dirección de escape, y los factores que afectan esta decisión. La probabilidad de la elección hacia un lado o el otro, depende de una toma de decisiones compleja, que cambia con la dirección de aproximación del estímulo, el contexto visual en el

que se encuentra el animal, y el cambio en el “valor” asignado a la respuesta, mediante un proceso de aprendizaje.

Esta tesis parte de un enfoque neuroetológico para comprender la toma de decisiones. En este tipo de enfoques, deben tenerse en cuenta el efecto de las presiones evolutivas sobre los circuitos neuronales que median la elección. En este sentido, se espera que los sistemas de decisión para mejorar la adaptación al medio ambiente local, y en particular las soluciones eficientes para los problemas específicos, sean simples, pero adaptables para resolver problemas en diversas situaciones. La toma de decisiones ante estímulos dorsales en *Neohelice* descrita en esta tesis, mostró ser una oportunidad experimental única para explorar este tipo de paradigmas. Los resultados de este estudio son un importante aporte al estudio del fenómeno de toma de decisiones en invertebrados; además de abrir nuevos interrogantes y perspectivas con relación al estudio de las vías neurales involucradas.

Bibliografía

- Behrens T., Woolrich M., Walton M. y Rushworth M. 2007. Learning the value of information in an uncertain world. *Nature Neuroscience*, 10, 1214 – 1221.
- Berón de Astrada M., Bengochea M., Medan V. y Tomsic D. 2011. Regionalization in the eye of the grapsid crab *Neohelice granulata* (= *Chasmagnathus granulatus*): variation of resolution and facet diameters. *J Comp Physiol A*. Volume 198, Issue 3, pp 173-180.
- Berón de Astrada M. y Tomsic D. 2002. Physiology and morphology of visual movement detector neurons in a crab (Decapoda: Brachyura). *J. Comp. Physiol. A*, 188: 539-551.
- Berón de Astrada M., Sztarker J. y Tomsic D. 2001. Visual interneurons of the crab *Chasmagnathus* studied by intracellular recordings in vivo. *J. Comp. Physiol. A*, 187: 37-44.
- Berón, M. P. 2003. Dieta de juveniles de Gaviota Cangrejera (*Larus atlanticus*) en estuarios de la provincia de Buenos Aires. *Hornero* 018 (02): 113-117.
- Bisazza A., Rogers L.J. y Vallortigara G. 1989. The Origins of Cerebral Asymmetry: A Review of Evidence of Behavioural and Brain Lateralization in Fishes, Reptiles and Amphibians *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Vol. 22, No. 3, pp. 411–426.
- Bogacz R., Brown E., Moehlis J., Holmes P., y Cohen J.D. 2006. The Physics of Optimal Decision Making: A Formal Analysis of Models of Performance in Two-Alternative Forced-Choice Tasks. *Psychological Review*, Vol. 113, No. 4, 700–765.
- Castellano, M.A.; Diaz Palarea, M.D.; Barroso, J. y Rodriguez, M. 1989. Behavioral lateralization in rats and dopaminergic system: individual and population laterality. *Behav-Neurosci*. 103(1): 46-53.
- Chan R. WM. y Gabbiani F. 2013. Collision-avoidance behaviors of minimally restrained flying locusts to looming stimuli. *J Exp Biol*. 216(4): 641–655.
- Chittka L., Skorupski P. y Raine N.E. 2009. Speed–accuracy tradeoffs in animal decision making. *Trends in Ecology and Evolution*, Vol.24 No.7.
- Chittka L., Thomson J.D. y Waser N.M. 1999. Flower Constancy, *Insect Psychology, and Plant Evolution*. *Naturwissenschaften*. Volume 86, Issue 8, pp 361-377
- Chivers D.P., Mirza R.S., Bryer P.J. y Kiesecker J.M. 2001. Threat-sensitive predator avoidance by slimy sculpins: understanding the importance of visual versus chemical information. *Canadian Journal of Zoology*, 79(5): 867-873.

- Denti A., Dimant B. y Maldonado H. 1988. Passive Avoidance Learning in the Crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiology & Behavior*, Vol. 43, pp. 317-320.
- Davies W.J. 1979. Behavioural hierarchies. Review article. *Trends in Neurosciences*, Volume 2, Pages 5-7.
- Edwards D.H., Heitler W.J. y Krasne F.B. 1999. Fifty years of a command neuron: the neurobiology of escape behavior in the crayfish. *Trends Neuroscience*. 22, 153–161.
- Feder M.E. 1987. *New Directions in Ecological Physiology*. Cambridge University Press, chapter 7.
- Fotowat H. y Gabbiani F. 2011. Collision Detection as a Model for Sensory-Motor Integration. *Annu. Rev. Neurosci.* 34:1–19.
- Fotowat H. y Gabbiani F. 2007. Relationship between the Phases of Sensory and Motor Activity during a Looming-Evoked Multistage Escape Behavior. *The Journal of Neuroscience*, 27(37): 10047-10059.
- Frasnelli E. 2013. Brain and behavioral lateralization in invertebrates. *Frontiers in Psychology*. Review. Volume 4. Article 939.
- Gabbiani F., Krapp H.G. y Laurent G. 1999. Computation of Object Approach by a Wide-Field, Motion-Sensitive Neuron. *The Journal of Neuroscience*, 19(3): 1122-1141.
- Ghirlanda S., Frasnelli E. y Vallortigara G. 2009. Intraspecific competition and coordination in the evolution of lateralization. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*; 364(1519): 861–866.
- Gillette R., Huang R.C., Hatcher N. y Moroz L.L. 2000. Cost-benefit analysis potential in feeding behavior of a predatory snail by integration of hunger, taste, and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 28;97(7):3585-90.
- Giurfa M. 2007. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A*, Vol. 193, Issue 8, pp 801-824.
- Giurfa M., Zhang S., Jenett A., Menzel R. y Srinivasan M.V. 2001. The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect. *Nature*. 19; 410(6831):930-3.
- Gold J.I. y Shadlen M.N. 2001. Neural computations that underlie decisions about sensory stimuli. *Trends in Cognitive Sciences*, Volume 5, Issue 3, Page 134.

- Gold J.I. y Shadlen M.N. 2007. The Neural Basis of Decision Making. *Annu. Rev. Neuroscience*. 30:535.
- Hemmi J.M. y Tomsic D. 2012. The neuroethology of escape in crabs: from sensory ecology to neurons and back. *Current Opinion in Neurobiology*. Volume 2, Issue 2, Pages 194–200.
- Hemmi, J. M. 2005a. Predator avoidance in fiddler crabs: 1. Escape decisions in relation to the risk of predation. *Anim. Behav.* 69, 603-614.
- Hemmi, J. M. 2005b. Predatory avoidance in fiddler crab: 2. The visual cues. *Anim. Behav.* 69, 615-625.
- Hemmi, J. M. y Zeil, J. 2003a. Burrow surveillance in fiddler crabs. 1. Description of behaviour. *J. Exp. Biol.* 206, 3935-3950.
- Hemmi, J. M. y Zeil, J. 2003b. Burrow surveillance in fiddler crabs II. The sensory cues. *J Exp Biol* 206, 3951-3961
- Hemmi, J. M. y Zeil, J. 2003d. Robust judgement of inter-object distance by an arthropod. *Nature* 421, 160-163.
- Herberholz J. y Marquart G.D. 2012. Decision making and behavioral choice during predator avoidance. *Frontiers in Neuroscience*. Volume 6. Article 125.
- Iribarne O.O. y Martinez M.M. 1999. Predation on the southwestern Atlantic fiddler crab (*Uca uruguayensis*) by migratory shorebirds (*pluvialis dominica*, *P. squatarola*, *arenaria interpres*, and *numenius phaeopus*). *Estuaries*. Volume 22, Issue 1, pp 47-54.
- Kawai N., Kono R. y Sugimoto S. 2004. Avoidance learning in the crayfish (*Procambarus clarkii*) depends on the predatory imminence of the unconditioned stimulus: a behavior systems approach to learning in invertebrates. *Behavioural Brain Research* 150 (2004) 229–237.
- Kells, A.R. y Goulson D. 2001. Evidence for handedness in bumblebees. *J. Insect Behav.*, 14. pp. 47–55.
- Kight S.L., Steelman L., Coffey G., Lucente J. y Castillo M. 2008. Evidence of population-level lateralized behaviour in giant water bugs, *Belostoma flumineum* Say (Heteroptera: Belostomatidae): T-maze turning is left biased. *Behavioural Processes*. 79: 66-69.

- Kristan W. y Gillette R. 2007. Chapter 20: Behavioral Choice. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Volume 49. pp 533-553.
- Kristan W.B. 2008. Neuronal Decision-Making Circuits. Minireview Current Biology 18, R928–R932.
- Land, M.F. 1999. The roles of head movements in the search and capture strategy of a tern (Aves, Laridae). J Comp Physiol A. 184: 265-272.
- Layne J., Land M. y Zeil J. 1997. Fiddler Crabs Use the Visual Horizon to Distinguish Predators from Conspecifics: A Review of the Evidence, Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom . Volume 77, Issue 01, pp 43-54.
- Land, M.F y Layne J. 1995. The visual control of behaviour in fiddler crabs. Journal of Comparative Physiology A. Volume 177, Issue 1, pp 91-103.
- Letzkus P., Ribi W.A., Wood J.T., Zhu H., Zhang S. H. y Srinivasan M.V. 2006. Lateralization of Olfaction in the Honeybee *Apis mellifera*. Current Biology. Report. Volume 16, Issue 14, Pages 1471–1476.
- Lima S. y Dill L.M. 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. Canadian Journal of Zoology, 68(4): 619-640,
- Louie K. 2013. Exploiting Exploration: Past Outcomes and Future Actions, Neuron, Volume 80, Issue 1, Pages 6-9.
- Luppi T., Bas C., Méndez Casariego A., Albano M., Lancia J., Kittlein M., Rosenthal A., Farías N., Spivak E. y Iribarne O. 2013. The influence of habitat, season and tidal regime in the activity of the intertidal crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*. Helgoland Marine Research. volume 67, Issue 1, pp 1-15.
- Magee B. y Elwood R.W. 2013. Shock avoidance by discrimination learning in the shore crab (*Carcinus maenas*) is consistent with a key criterion for pain. The Journal of Experimental Biology 216, 353-358.
- Maimon G., Straw A.D. y Dickinson M.H. 2008. A Simple Vision-Based Algorithm for Decision Making in Flying *Drosophila*. Current Biology 18, 464–470.
- Medan V., Berón de Astrada M., Scarano F. y Tomsic D. 2015. “A network of visual motion-sensitive neurons for computing object position in an arthropod”. Journal of Neuroscience, in press 2015

- Medan, V. 2008. Caracterización morfológico-funcional de neuronas sensibles al movimiento involucradas en comportamientos visuales del cangrejo *Chasmagnathus*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Medan, V., Oliva, D. y Tomsic, D. 2007. Characterization of lobula giant neurons responsive to visual stimuli that elicit escape behaviors in the crab *Chasmagnathus*. *J Neurophysiol* 98(4), 2414-28.
- Merten K. y Nieder A. 2012. Active encoding of decisions about stimulus absence in primate prefrontal cortex neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. vol. 109 no. 16, 6289-6294.
- Muller H., Grossmann H. y Chittka L. 2010. ‘Personality’ in bumblebees: individual consistency in responses to novel colours? *Animal Behaviour* 80 (2010) 1065-1074.
- Nilsson D.E. y Osorio D. 1998. Homology and parallelism in arthropod sensory processing. *Arthropod Relationships. The Systematics Association Special Volume Series. Volume 55*, pp 333-347.
- Oliva D. y Tomsic D. 2014. Computation of object approach by a system of visual motion-sensitive neurons in the crab *Neohelice*. *Journal of Neurophysiology*. Vol. 112 no. 6, 1477-1490.
- Oliva D. y Tomsic D. 2012. Visuo-motor transformations involved in the escape response to looming stimuli in the crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*. *J Exp Biol* 215, 3488-3500.
- Oliva, D.E. 2010. Mecanismos de detección visual y evitación de colisiones en un nuevo modelo experimental, el cangrejo *Chasmagnathus granulatus*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Oliva, D., Medan, V. y Tomsic, D. 2007. Escape behavior and neuronal responses to looming stimuli in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Grapsidae). *J Exp Biol* 210(Pt 5), 865-80.
- Palmer CR. y Kristan WB Jr. 2011. Contextual modulation of behavioral choice. *Current Opinion in Neurobiology*, Volume 21, Issue 4, August 2011, Pages 520–526.
- Pedreira, M.E. y Maldonado, H. 2003. Protein Synthesis Subverts Reconsolidation or Extinction Depending on Reminder Duration. *Neuron Report*. Volume 38, Issue 6, Pages 863–869

- Pedreira, M.E., Perez-Cuesta, L.M. y Maldonado, H. 2002. Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *J Neurosci.*, 22, 8305-8311.
- Scarano F. y Tomsic D. 2014. Escape response of the crab *Neohelice* to computer generated looming and translational visual danger stimuli. *J Physiol. Paris.* 108(2-3):141-7.
- Shaw B.K. y Kristan W.B., Jr. 1999. Relative Roles of the S Cell Network and Parallel Interneuronal Pathways in the Whole-Body Shortening Reflex of the Medicinal Leech. *J Neurophysiol* 82:1114-1123.
- Smolka J., Zeil J. y Hemmi J.M. 2011. Natural visual cues eliciting predator avoidance in fiddler crabs. *Proceedings of the Royal Society B.* Volume: 278 Issue: 1724.
- Strausfeld N.J. y Andrew D.R. 2011. A new view of insect–crustacean relationships I. Inferences from neural cladistics and comparative neuroanatomy. *Evolution of the Arthropod Nervous System: Part 1.* Pages 276–288. *Arthropod Structure & Development.* Volume 40, Issue 3.
- Sugrue L.P, Corrado G.S. y Newsome W.T. 2005. Choosing the greater of two goods: neural currencies for valuation and decision making. *Nature reviews: Neuroscience.* Volume 6.
- Sztarker J. y Tomsic D. 2011. Brain modularity in arthropods: individual neurons that support "what" but not "where" memories. *J Neurosci.*, 31(22):8175-80.
- Sztarker J. y Tomsic D. 2008. Neuronal correlates of the visually elicited escape response of the crab *Chasmagnathus* upon seasonal variations, stimuli changes and perceptual alterations. *J. Comp. Physiol. A.* 194: 587-596.
- Sztarker J., Strausfeld N.J. y Tomsic D. 2005. Organization of the optic lobes that support motion detection in a semiterrestrial crab. *J. Comp. Neurol.* Volume 493, Issue 3, pages 396–411.
- Sztarker J. y Tomsic D. 2004. Binocular Visual Integration in the Crustacean Nervous System. *J. Comp. Physiol. A* 190, 951-962.
- Tommasi L. 2009. Mechanisms and functions of brain and behavioural asymmetries. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364, 855-859.
- Tomsic D. y Maldonado. 2014. Neurobiology of Learning and Memory of Crustaceans. Chapter 19: pp 509-334. In: *Crustacean Nervous Systems and their Control of Behavior* (third volume of a ten-volume set on *The Natural History of Crustaceans*). Eds: Derby C and Thiel M. Oxford University Press.

- Tomsic D. y Romano A. 2013. A multidisciplinary approach to learning and memory in the crab *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*. Chapter 26: pp 337-355. In: Invertebrate Learning and Memory. Eds: Menzel R. and Benjamin P.R. Handbook of Behavioral Neuroscience (Series Editor: Joe Huston, Düsseldorf, Germany).
- Tomsic D., Berón de Astrada M. y Sztarker J. 2003. Identification of individual neurons reflecting short- and long-term visual memory in an arthropod. *J. Neurosci.* 23, 8539-8546.
- Tomsic D. 2002. Visual learning in crabs investigated by intracellular recordings in vivo. In: *The Crustacean Nervous System*. K. Wiese Ed. pp: 328-335.
- Tomsic D., Pedreira M.E., Romano A., Hermitte G., Maldonado H. 1998. Context-US association as a determinant of long-term habituation in the crab *C. granulatus*. *Ani. Learn. Behav.* 26, 196-209.
- Tomsic D., Massoni V. y Maldonado H. 1993. Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs. Ontogenic, ecological and opioid system correlates. *Journal of Comparative Physiology A*, 173:621-633.
- Townsend-Mehler J.M, Dyer F.C. y Maida K. 2011. Deciding when to explore and when to persist: a comparison of honeybees and bumblebees in their response to downshifts in reward. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. Volume 65, Issue 2, pp 305-312.
- Uchida, N. y Mainen Z.F. 2003. Speed and accuracy of olfaction discrimination in the rat. *Nature Neuroscience*. Volume 6, Numer 11.
- Vallortigara G. y Rogers L.J. 2005. Survival with an asymmetrical brain: Advantages and disadvantages of cerebral lateralization. *Behavioral and Brain Sciences*. 28, 575–633.
- Yang, C. H., Belawat, P., Hafen, E., Jan, L. Y. y Jan, Y. N. 2008. *Drosophila* egg-laying site selection as a system to study simple decision-making processes. *Science* 319: 1679-1683.
- Zeil J. y Hoffman M. 2001. Signals from “Crabworld”: cuticular reflections in a fiddler crab colony. *The Journal of Experimental Biology* 204, 2561–2569.