## Biblioteca Digital F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

### **Tesis Doctoral**





## Goldin, Matías Alejandro

2013

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:

Goldin, Matías Alejandro. (2013). Enfriamientos de núcleos telencefálicos para testear la relación de escalas temporales en un modelo de canto de aves. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

#### Cita tipo Chicago:

Goldin, Matías Alejandro. "Enfriamientos de núcleos telencefálicos para testear la relación de escalas temporales en un modelo de canto de aves". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

### **EXACTAS** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA** Universidad de Buenos Aires

**Dirección:** Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293 **Contacto:** digital@bl.fcen.uba.ar



## UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Física

# Enfriamientos de núcleos telencefálicos para testear la relación de escalas temporales en un modelo de canto de aves

Por

Lic. Matías Alejandro Goldin

Director del trabajo: Dr. Gabriel Mindlin Consejero de estudios: Dr. Claudio Iemmi Lugar de trabajo: Laboratorio de Sistemas Dinámicos, Departamento de Física, FCEyN, UBA

> Tesis de Doctorado en Ciencias Físicas Buenos Aires, 2013

# Enfriamientos de núcleos telencefálicos para testear la relación de escalas temporales en un modelo de canto de aves

Lic. Matías Alejandro Goldin

Buenos Aires, 2013

### Resumen

En este trabajo estudiamos los mecanismos neuronales en el cerebro de las aves involucrados en la generación de los gestos motores del canto. Exploramos este sistema utilizando herramientas de análisis experimentales, teóricas y computacionales.

La naturaleza del control telencefálico sobre los circuitos premotores y motores se encuentra en debate. Las hipótesis de funcionamiento van desde la usurpación completa de circuitos a los que conecta "río abajo" (*downstream* en inglés) a mecanismos interactivos de control. En este trabajo, mostramos teórica y experimentalmente, que el control motor telencefálico del canto en canarios (*Serinus canaria*) es consistente con una estrategia interactiva.

Utilizamos predicciones de un modelo teórico de control respiratorio, para mostrar que el enfriamiento leve de un núcleo del telencéfalo (HVC) conlleva al estiramiento en el canto, pero que un enfriamiento adicional causa la reestructuración progresiva del mismo. Esto es consistente con la hipótesis de que los gestos respiratorios son respuestas subarmónicas a una escala de tiempo presente a la salida de HVC.

Construimos un dispositivo enfriador que nos permitió realizar un enfriamiento controlado, local y bilateral de la zona del cerebro donde se encuentra el HVC. Logramos medir simultáneamente el canto y la presión dentro de los sacos aéreos, para diferentes temperaturas de enfriamiento de este núcleo bilateral. Como resultado obtuvimos estiramientos y luego rompimientos de las estructuras silábicas del canto, lo cual sugiere la existencia de al menos una escala temporal adicional en la ruta motora, que interactúa con la que se halla en HVC.

Encontramos también evidencia en los patrones de presión de canarios de la existencia de bifurcaciones que ocurren naturalmente entre transiciones de distintos tipos de sílabas. Estas pudieron ser interpretadas como modificaciones suaves de dos parámetros que describen la actividad de HVC en nuestro modelo interactivo, y una de ellas pudo ser manipulada con enfriamiento.

La interacción entre una función motora vital, como la respiración, y el control motor del telencéfalo sobre el canto sugiere la existencia de mecanismos más generales de cómo la integración no lineal de estructuras cerebrales evolutivamente nuevas con los circuitos preexistentes dan lugar a comportamientos nuevos y diversos.

Estos resultados ayudan a construir confianza en un punto de vista que considera la actividad motora generada por el sistema del canto como el resultado de al menos dos escalas de tiempo no lineales interactuando, y sugieren que la diversidad puede surgir de cambios suaves en instrucciones muy sencillas.

Palabras Clave: Sistemas dinámicos, sistemas complejos, dinámica neuronal, neurociencia, ruta motora, canto de aves, respiración, temperatura, escalas de tiempo, bifurcaciones

## Cooling telencephalic nuclei to test the interplay between timescales in a birdsong model

### Abstract

In this work we study the neuronal mechanisms in the brain of birds involved in the generation of the motor gestures responsible for singing. We explore this system with experimental, theoretical and computational analytical tools.

The nature of telencephalic control over premotor and motor circuits is debated. Hypotheses range from complete usurping of downstream circuitry to highly interactive mechanisms of control. We show theoretically and experimentally, that telencephalic song motor control in canaries is consistent with a highly interactive strategy.

Using predictions from a theoretical model of respiratory control, we show that mild cooling of a forebrain nucleus (HVC) led to song stretching, but further cooling caused progressive restructuring of song, consistent with the hypothesis that respiratory gestures are subharmonic responses to a timescale present in the output of HVC.

We built a cooling device that allowed us to perform a controlled and local temperature decrease of the bilateral zone of the brain where HVC is. We measured simultaneously the song and the intra air sac pressure for different cooling temperatures of this bilateral nucleus. This allowed us to find stretching and then breaking of the syllabic structure of song, which suggests the existence of at least an additional timescale in the motor pathway, interacting with the one present in HVC.

We also found evidence of naturally occurring bifurcations in the transitions between different type of syllables of the pressure patterns of canary song. These could be interpreted as smooth modifications of two parameters that describe the activity of HVC in our interactive model, and one of them could be manipulated by means of cooling. This interaction between a life-sustaining motor function (respiration) and telencephalic song motor control suggests a more general mechanism of how nonlinear integration of evolutionarily new brain structures into existing circuitry gives rise to diverse, new behavior.

These results allow to build confidence on a view that considers the motor activity generated by the song system as the result of at least two nonlinearly interacting timescales, and suggests that diversity may arise from slight changes of very simple instructions.

**Keywords:** Dynamical systems, complex systems, neuronal dynamics, neuroscience, motor pathway, birdsong, respiration, temperature, timescales, bifurcations

A Sofi.

## Agradecimientos

Finalmente llegó el momento. Cada etapa de este camino recorrido tuvo distintos acompañantes. Algunos estuvieron al principio, otros al final, y algunos siempre. Sin duda, no podré en estas sencillas líneas plasmar todo el reconocimiento que se merecen.

Gabo, mi director, mi maestro, el maestro de todos los que formamos parte del Laboratorio de Sistemas Dinámicos. Gracias por salvarme y haberme dado el espacio para continuar en el mundo de la ciencia, en aquel momento tan difícil. Y por todos los momentos difíciles que atravesé en el doctorado, en los que siempre me apoyaste. Por la buena onda que tenés siempre, por la buena ciencia que me hacés buscar, que me enseñás a que sea parte de mí, de que sea la naturaleza la fuente de inspiración. Y por todas las lecciones, por mostrarme el camino para mejorar todo el tiempo, tanto en el trabajo como personalmente, por haber confiado en mí. Y por el proyecto de ciencia que armaste en Argentina, por haber creado un lugar de trabajo maravilloso, y haber formado a todos sus integrantes, para construir entre todos la hermosa historia que está apareciendo, con todas tus grandes ideas que van dirigiendo y guiando el trabajo de todos, y que permiten que nosotros, los LSDs, tengamos también grandes pequeñas ideas.

A todos los miembros pasados y presentes del Laboratorio de Sistemas Dinámicos. Jorge, un gran compañero. Gracias por tus buenos consejos, por tu apoyo. Por haber estado firme en los momentos más críticos del experimento y el doctorado, y por haberme dado confianza. Jaco, gran amigo, sigo tus pasos. Gracias por haberme presentado en el laboratorio. Por toda la ayuda que me seguís brindando. Espero no perderte la pista. Marcos, siempre jovial y alegre. Gracias por las charlas y compartir tus experiencias conmigo. Ana, volviste al laboratorio con muchas pilas y ciencia ¡Qué bueno compartir mi último tramo con vos! Zeque, más allá de los roces, aprendí mucho de nuestra convivencia. Lean, el "teórico" del labo, fue genial compartir DNL y la intriga que nos resultaba saber qué irían a cantar los "pájaros fríos". Gracias por esos buenos momentos. Yoni, me encantó compartir esta etapa de mi vida, nuestra etapa futbolera, y tu buen humor de siempre. Flor, explosiva, trabajadora, la cuota femenina del labo. Gracias por ser una excelente compañera de "oficina". Gogui, tenés todas las de ganar. Biólogo en tierra de físicos, un ejemplo a seguir. Gracias por haberme recibido tan bien en el labo. Nico, gracias por los consejos y tu ayuda en mis primeros pasos. Emi, me encantó haber compartido mi primer verano trabajando. Pato, fue un placer haber podido guiarte en tus primeros pasos en un laboratorio. Germán, siempre alegre y ordenado. Gracias por el café y por el buen ambiente que generás. Santi, el futuro del laboratorio. Estoy muy contento que puedas formar parte de esta familia. María, de talento inigualable en el trabajo con animales. Sin vos no hubiera podido llevar adelante el experimento. Gracias por tu ayuda y nuestras charlas.

Gracias a la UBA que me dio un lugar de trabajo y gracias al CONICET que financió todo mi trabajo durante todos estos años. Me doy cuenta después de haber recorrido todo el proceso doctoral, que no es menor. Nada de esto hubiera sido posible sin un país que apueste en la ciencia y que crea que el futuro debe ir por este camino.

A mis amigos de la facu, compañeros de mateadas y largas charlas. Ana, Edy y Ale. A los chicos de la OMF, Marie, Pablo, Rodri, Quimy, Turia. Gracias por compartir todos estos años de arduo trabajo y satisfacción organizando las olimpiadas. Estoy muy orgulloso del grupo que se armó y el crecimiento que tuvimos. Este proyecto seguirá vivo más allá de nosotros y lo veremos crecer más allá de los límites imaginables... Nancy, te adoro. Mi primera profesora de física. ¿Suena increíble no?, que después de todo este tiempo hayamos construido una relación tan linda. De vos aprendí un montón, de tu forma de llevar adelante los proyectos, con cariño y perseverancia, contra viento y marea. Estoy encantado de haber podido compartir toda esta etapa contando siempre con tu apoyo. Te merecés el lugar en que estás y te agradezco infinitamente todo lo que hacés por mí.

A los chicos de olimpiadas. Vivi, Fede, Lu, Joaco. Estoy muy orgulloso de ustedes. Fue un placer haber podido enseñarles algo, y que ustedes me enseñen a mí. Gracias por haber compartido la pasión por la física y por enseñarla. Me encanta que hayan encontrado sus propios caminos, en Bariloche, en los números, en la matemática. Joaco, vos sos el futuro, la frescura que vendrá.

A todos mis compañeros de fútbol 11 de exactas, que me recibieron con los brazos abiertos en el equipo, siempre firmes. A todos los chicos de los fútboles de los sábados, de Gonza y de los domingos, de Pablo. A todos mis compañeros de biodanza, con los que danzo muy feliz hace ya casi dos años. A Runa por la guía que me brindás. A todos mis compañeros de Miledi, con los que descubrí que comparto muchísimo de la vida, más allá de las fronteras. En especial a Omar, Diego, Nacho y Vero.

A todos mis familiares. A mi papá y mi mamá. Ellos siempre están, siempre me apoyan. Gracias papá, por las infinitas charlas, siempre sabiendo qué es lo que me pasa antes que yo. Gracias mamá, por el cariño ilimitado, por estar siempre apoyándome y ayudándome cuando lo necesito. A mi hermano, Nico. Gracias por haberte acercado en este último tiempo. Porque de ahora en más nos llevemos cada vez mejor. Maura, Fernando, Yann, ya somos familia hace tiempo. Gracias por quererme como lo hacen. Por más té/cenas, asados-dutch y partidos de fútbol. A todos mis abuelos. Tita, Felisa, Lelito y Abraham. Infinita felicidad tengo cada vez que me encuentro con ustedes. Gracias por tanto afecto y tantos mimos. Los adoro a todos, genios indiscutidos. A mis tíos Moni, Dani y Ber, y a mi prima Gaby. A mi nueva familia, Male, Felipe y Oli. Gracias por aceptarme e invitarme a su casa y a compartir los viajes más locos. Y a todos mis familiares que lejos o cerca siempre están.

A mis amigos, Bruno ídolo, qué bueno que seguimos por acá en Argentina, siempre pude contar con vos. Pablo, gracias por el aliento que me das siempre, por las series, las pelis y las comidas. Paula, te extraño, ya hace varios años te fuiste, ¡qué bueno fue compartir un tiempo en la facultad con vos!

Sofi, mi amor. Gracias. Siempre estuviste cuando te necesité. En los peores y los mejores momentos, siempre incondicional. No hubiera podido lograr todo lo que conseguí sin vos a mi lado. Siempre cariñosa, amorosa, y molestadora profesional. Te amo con todo mi corazón.

> Matías Alejandro Goldin Buenos Aires, 2013

# Índice general

1.	Intr	oducción	1								
	1.1.	Las aves canoras como modelo animal	1								
	1.2. El rol de la física $\ldots$										
	1.3.	Neurociencia y sistemas dinámicos en el canto de aves	4								
	1.4.	El plan de acción: modelo $\rightarrow$ experimento $\rightarrow$ modelo $\rightarrow$	6								
	1.5.	Organización de esta tesis	8								
2.	Peri	feria biomecánica	11								
	Características acústicas del canto	12									
	2.2.	La anatomía involucrada en el canto $\hfill \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	14								
	2.3.	Un modelo de baja dimensión $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$	19								
		2.3.1. Dinámica de la siringe	19								
		2.3.2. El filtrado del tracto vocal	23								
		2.3.3. Cantos de alto contenido espectral	25								
		2.3.4. Validación e implicancias del modelo	27								
	2.4.	Resumen	31								
3.	Patrones de presión										
	3.1.	. Diversidad de patrones respiratorios									
		3.1.1. Gestos de presión en canarios	36								
	3.2.	Un modelo de baja dimensión $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$	37								
		3.2.1. Matemática del modelo	38								
	3.3.	Adaptando el modelo a la biología	42								
		3.3.1. Neuroanatomía: la ruta motora $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	43								
		3.3.2. El modelo "feedforward"	45								

		3.3.3. Nuestro modelo "interactivo"	48
	3.4.	Predicciones para un experimento de enfriamiento	54
	3.5.	Extensiones de nuestro modelo	57
	3.6.	Resumen	59
4.	El e	experimento de enfriamiento	61
	4.1.	El dispositivo enfriador	62
	4.2.	Sujetos experimentales e instalación de dispositivos $\ . \ . \ .$	67
	4.3.	Calibración de temperaturas	69
	4.4.	Medición del canto y patrones de presión	71
	4.5.	Resumen	73
5.	$\operatorname{Esti}$	ramiento y rompimiento de sílabas	75
	5.1.	Descripción del fenómeno	76
	5.2.	Rompimiento de sílabas $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	77
	5.3.	Evolución del rompimiento	79
	5.4.	Resumen	83
6.	Aná	ilisis de los patrones de presión	85
	6.1.	Clasificación de sílabas	86
	6.2.	Estadística de duración de sílabas	87
	6.3.	Estadística de sílabas individuales	94
	6.4.	Resumen	97
7.	Dia	grama de bifurcaciones	99
	7.1.	Construcción de un mapa de enganchado entrada-salida	99
	7.2.	Rompimientos en el diagrama	102
	7.3.	Resumen	105
8.	Evic	dencia y control de bifurcaciones que ocurren naturalme	nte107
	8.1.	Bifurcación en amplitud $\ldots$	108
	8.2.	Bifurcación en frecuencia	111
	8.3.	Manipulación de la bifurcación	112
	8.4.	Diagrama de bifurcaciones	114

	8.5.	Resumen	 	 	 	 	 	 	. 116
9.	Con	clusiones							119
Bi	bliog	grafía							123

## Capítulo 1

# Introducción

### 1.1. Las aves canoras como modelo animal

El placer que experimentamos cuando escuchamos el canto de las aves nos deslumbra debido a su belleza. No deja de llamarnos la atención su estructura, diversidad y sutileza en la concatenación de sonidos. Ha sido fuente de inspiración para poetas e incluso compositores han creado obras musicales basadas en el canto de los pájaros. Sin embargo, sus características estéticas no son las razones por las cuales se ha convertido en un problema de estudio muy interesante para la comunidad científica. La razón principal es que de las aproximadamente 10.000 especies que se conocen, unas 4000 comparten con nosotros, los seres humanos, una característica notable: que la adquisición de las vocalizaciones requiere un cierto grado de exposición con un tutor. Los aprendices vocales son las llamadas aves "oscinas" (llamadas también aves "canoras"), junto con los loros (orden Psittaciformes) y colibríes (familia Trochillidae) [Williams, 2004]. Resulta interesante porque es uno de los únicos modelos en el reino animal para estudiar el aprendizaje vocal en los humanos [Doupe and Kuhl, 1999]. Dentro de los mamíferos el aprendizaje vocal está muy poco extendido. Sólo los humanos, los cetáceos (ballenas y delfines), pocas especies de murciélagos y los elefantes son capaces de aprender sus vocalizaciones [Poole et al., 2005]. El objetivo del estudio a través de este modelo animal es tratar de entender cuáles son y cómo funcionan los

mecanismos involucrados en la adquisición de un comportamiento complejo a través del aprendizaje. La meta o sueño es dilucidar cómo es que los seres humanos aprenden el habla.

La forma de abordar el problema ha traspasado los límites de la biología, y tanto físicos como computadores científicos y neurocientíficos entre otros se han involucrado en lo que se ha convertido en un campo muy fértil para la investigación. Ésta es actualmente un área interdisciplinaria en donde los esfuerzos de la comunidad científica se suman para la difícil tarea de comprender este comportamiento complejo. Los estudios de los científicos se centraron en diferentes aspectos que van desde las funciones hormonales, la genética y la experiencia en la configuración de la arquitectura neuronal necesaria para ejecutar la compleja tarea del canto. Cientos de trabajos se abocaron en localizar, dentro de los cerebros de los pájaros, las regiones involucradas en el aprendizaje y la producción del canto [Catchpole and Slater, 1995, Zeigler and Marler, 2008].

### 1.2. El rol de la física

Utilizando una mirada Física sobre este problema, ya hace más de 10 años se viene desarrollando un programa científico que trata de comprender los mecanismos más básicos en la generación del canto. Una arquitectura neuronal compleja ha sido descripta como responsable de la generación de los patrones de actividad cerebrales, que son traducidos en comandos fisiológicos específicos que controlan el sistema periférico vocal [Zeigler and Marler, 2008]. La Física ha participado en este esfuerzo colectivo integrando un gran cuerpo de trabajo experimental con los procesos mecánicos básicos que intervienen en la producción del canto de los pájaros. Modelos físicos han sido desarrollados que dan cuenta de muchos de los fenómenos acústicos del canto [Mindlin and Laje, 2005]. A través de este enfoque integrador una imagen más completa comenzó a surgir sobre las funciones y las sinergias de diferentes músculos utilizados por un pájaro cantor. La física y, por lo tanto, los modelos han ayudado a poner en perspectiva el papel de diferentes músculos en la generación de ritmos específicos y melodías características del canto. El programa ha sido particularmente exitoso en la comprensión de la producción del canto tonal en algunos oscinos, como por ejemplo, los cardenales y canarios [Gardner et al., 2001, Mindlin et al., 2003] y más recientemente en pájaros con canto de contenido espectral mucho más rico [Sitt et al., 2008, Perl et al., 2011, Amador et al., 2013]. Para estos casos, el trabajo experimental y teórico han puesto de relieve el papel fisiológico desempeñado por diferentes patrones motores. Como consecuencia de estos estudios, se ha podido producir canto sintético en la computadora y en chips programables, los cuales son controlados por variables fisiológicas que responden principalmente a la actividad respiratoria y a la de los músculos de la siringe, el órgano fonador de las aves. Esto pudo ser realizado "off line", o luego de la medición [Sitt et al., 2010], tanto como "on line", es decir comandado por los gestos motores medidos en tiempo real [Arneodo et al., 2012]. El reconocimiento de estas variables fisiológicas relevantes llevó naturalmente a concentrar muchos esfuerzos en el estudio de las mismas.

En este sentido, muchos trabajos se han abocado en tratar de entender el origen dinámico de los patrones respiratorios utilizados durante el canto. Ha sido posible identificar que la diversidad de patrones encontrados en canarios (*Serinus canaria*) pueden ser generados a partir de un modelo dinámico de baja dimensión utilizando sólo dos parámetros dependientes del tiempo. El análisis topológico de las señales temporales [Trevisan et al., 2006] y el reconocimiento de los ingredientes dinámicos necesarios para desarrollar este modelo [Alonso et al., 2009, Alliende et al., 2010], han dado un fuerte indicio sobre la posible arquitectura neuronal involucrada su generación.

Siguiendo esta línea de trabajo, esta tesis se centra en el estudio de los mecanismos dinámicos a nivel neuronal que están en juego en la producción del canto de los pájaros. Las preguntas fundamentales que queremos responder son ¿cuál es el origen dinámico de las instrucciones motoras en el canto de aves?, ¿cómo es la arquitectura neuronal responsable de su generación?

# 1.3. Neurociencia y sistemas dinámicos en el canto de aves

Las zonas del cerebro involucradas en la generación de las actividades motoras responsables de la producción del canto fueron identificadas a partir de lesiones y la observación de la conducta [Nottebohm, 1976]. El canto de los pájaros es un comportamiento complejo aprendido que se genera por una red bien descripta de núcleos neuronales del cerebro anterior que generan los patrones motores coordinados de los músculos que controlan la respiración y las estructuras de órganos del tracto vocal y superior [Zeigler and Marler, 2008]. La "ruta motora" tiene dos núcleos muy estudiados, llamados HVC (utilizado como nombre propio) y RA (núcleo robustus del archistriatum). HVC envía instrucciones al RA, que a su vez envía instrucciones a varios núcleos motores: uno que inerva los músculos de la siringe, el nXIIts, y un conjunto de núcleos respiratorios involucrados en la respiración (retroambigualis RAm y parambigualis PAm) (ver figura 1.1). El circuito es más complejo e incluye conexiones con otros núcleos, así como con una ruta relacionada con el aprendizaje. Esto será estudiado con más detalle en la sección 3.3.1.

Lesiones en HVC y RA conducen a la supresión del canto, de lo que se concluye que son necesarios para su producción. La función específica de cada núcleo es más difícil de dilucidar, pero se pensó durante un tiempo en una posible organización jerárquica en el cerebro. Esto es debido a que microestimulaciones en HVC producen la interrupción del canto y el reinicio del mismo, mientras que microestimulaciones de RA interrumpen sólo la sílaba que está siendo cantada [Yu and Margoliash, 1996, Fee et al., 2004]. Sin embargo, ha sido objeto de debate en qué medida este programa motor telencefálico contiene instrucciones directas para los patrones detallados del canto, como para generar sus diversas escalas de tiempo en el comportamiento resultante [Hahnloser et al., 2002, Fee et al., 2004, Long and Fee, 2008]. En otros sistemas de control motor, como los "whiskers" y el sistema visual, también se cuestiona el rol del telencéfalo y su interacción con otras estructuras [Smotherman et al., 2006, Ahrens and Kleinfeld, 2004, Berg and Kleinfeld, 2003,



**Figura 1.1:** Esquema simplificado de la ruta motora del canto en el cerebro de aves "canoras". Las áreas oscuras con letras blancas son necesarias para la producción del canto en adultos. Las flechas muestran la ruta motora. HVC, utilizado como nombre propio, RA, núcleo robusto del arcopallium; nXIIts, parte del núcleo traqueosiríngeo hipoglosal; núcleo premotor espiratorio RAm, núcleo retroambigualis; núcleo premotor inspiratorio PAm, núcleo parambigualis

Kakei et al., 1999, Friedman et al., 2006, Cramer and Keller, 2006].

Un modelo propuesto para el rol de las estructuras corticales en el control motor del canto es el de la interacción con la red no lineal de la respiración [Méndez et al., 2012,Friedman et al., 2011,Trevisan et al., 2006]. En canarios (*Serinus canaria*), este modelo puede dar cuenta de todos los patrones respiratorios subyacentes del canto e interpreta los diversos patrones respiratorios de los diferentes tipos de sílabas como el resultado de una interacción no lineal entre la entrada del telencéfalo (HVC, RA) y la dinámica interna de las vías respiratorias generadoras de patrones. Se ha encontrado que los patrones de presión de los sacos aéreos durante el canto son consistentes con las formas y los ritmos de las soluciones subarmónicas de un sistema no lineal forzado [Trevisan et al., 2006, Alonso et al., 2009, Alliende et al., 2010] similar a los sistemas utilizados por los ingenieros y físicos para explorar el comportamiento complejo y el caos [van der Pol and van der Mark, 1927, Strogatz, 2001]. Este modelo "interactivo" se encuentra en clara contradicción con una propuesta de control más directo ejercido por el núcleo telencefálico HVC en el pájaro zebra finch (*Taeniopygia guttata*), que propone que todas las escalas temporales presentes en el canto surgen directamente de la señal de salida de este núcleo. La escasa evidencia que respalda este modelo fue derivada a partir de observaciones de codificación de baja tasa de disparo ("sparse") de neuronas proyectoras en HVC [Hahnloser et al., 2002,Fee et al., 2004], así como de experimentos en los que el canto fue estirado por el enfriamiento de HVC [Long and Fee, 2008, Andalman et al., 2011].

Si, por el contrario, el sistema encargado de producir el canto integra escalas de tiempo generadas en diferentes regiones de la vía motora, el estiramiento del canto junto con el de los patrones respiratorios que trae aparejados sólo debería producirse en un rango de temperaturas en donde el régimen de enganchado ("lockeo") entre la actividad telencefálica y el patrón respiratorio generado por esta red ocurre naturalmente. Por ejemplo, si las instrucciones periódicas de HVC (forzante) están enganchadas con el patrón respiratorio del canto en una relación de 2:1 (es decir, la frecuencia respiratoria es un subarmónico de la frecuencia del forzante), se espera que el enfriamiento cambie la frecuencia del forzante, y en consecuencia se predice un cambio en este enganchado si se imponen los cambios de frecuencia más allá de un cierto valor.

## 1.4. El plan de acción: modelo $\rightarrow$ experimento $\rightarrow$ modelo $\rightarrow$ ...

Para explorar si un mecanismo general puede dar cuenta de estos resultados contradictorios, utilizamos en esta tesis el "modelo interactivo" para predecir los efectos del enfriamiento en los patrones respiratorios del canto. Realizamos simulaciones en donde podemos reproducir la diversidad de patrones de presión utilizados por los canarios para el canto, y evaluamos la modificación de un parámetro que está relacionado con el enfriamiento de HVC. Encontramos que luego de una etapa inicial de estiramiento, se espera una reestructuración de los patrones de presión utilizados para el canto.

Conociendo los resultados del modelado, probamos sus predicciones experimentalmente a través del enfriamiento bilateral del HVC en canarios. Construimos para tal fin un dispositivo enfriador a partir de una celda Peltier comercial, el cual fue instalado exitosamente en las aves. Realizamos mediciones simultáneas del canto y de los patrones de presión en los sacos aéreos, mientras el núcleo cerebral HVC era enfriado a distintas temperaturas.

Luego de obtener los resultados, en donde el canto se desestructura en lo que llamamos "rompimientos", regresamos al modelo para un estudio más detallado. Fuimos capaces de explicar los diferentes tipos de "rompimientos" encontrados a partir de la construcción de un diagrama de bifurcaciones del sistema.

Finalmente, los resultados del modelado abren otras preguntas que podrían ser contestadas experimentalmente y/o teóricamente: ¿las bifurcaciones inducidas mediante enfriamiento pueden ocurrir naturalmente?; ¿qué pasaría si enfriamos unilateralmente el HVC?; ¿se puede medir la actividad promedio de las neuronas del núcleo HVC?; ¿cómo puede extenderse el modelo para tener en cuenta mecanismos de "feedback"?, ¿podría no ser el HVC una estructura premotora?. Una de estas preguntas, la primera, se intenta contestar en esta tesis, mientras que las otras quedan abiertas para realizar futuros trabajos de investigación. Discutiremos algunos de estos interrogantes a lo largo de esta tesis, tratando de poner en perspectiva los resultados obtenidos con los descubrimientos más recientes del área.

### 1.5. Organización de esta tesis

Esta tesis está organizada de la siguiente manera: Este primer capítulo contiene una breve introducción al modelo animal elegido. En un primer apartado, describimos cómo un enfoque físico puede ser aplicado a un problema biológico, sin perder de vista los objetivos que el campo de la biología y el sistema en particular pretenden estudiar. Finalmente, hicimos una breve descripción de las preguntas que motivan esta tesis, junto con el el plan de acción para tratar de contestarlas.

En los siguientes dos capítulos describiremos dos áreas muy desarrolladas dentro del estudio del canto de las aves, utilizando herramientas de la física y de los sistemas dinámicos. En el capítulo 2 mostraremos los modelos que en los últimos años estuvieron dedicados a explicar el funcionamiento del órgano fonador de las aves: la siringe. Veremos cómo es posible realizar síntesis de sonido a través del modelado físico y compararemos las variaciones existentes para diferentes tipos de aves canoras, las que producen sonidos tonales (canarios por ejemplo) y las que tienen canto de alto contenido espectral (zebra finch). Este capítulo está destinado mostrar la relevancia y a motivar el estudio de los patrones de presión en los sacos aéreos utilizados por las aves para el canto.

En el capítulo 3 estudiaremos los modelos de generación de los gestos motores respiratorios, los cuales son elementos fundamentales entendidos como variables de control en la actividad de la siringe. Comenzaremos por la descripción de un modelo dinámico abstracto de baja dimensión. Luego, a partir de estos estudios y en contraste con el modelo de control motor más difundido hasta ahora en el área, mostraremos un modelo alternativo que da cuenta de la posible arquitectura neuronal subyacente. Finalmente, para testear esta propuesta, propondremos un experimento en el que uno de los parámetros del modelo es modificado de forma controlada y mostraremos las predicciones asociadas con cambios medibles en las variables fisiológicas involucradas del canto. El capítulo 4 contiene la descripción del desarrollo experimental utilizado en esta tesis. En primera instancia describiremos la construcción de un dispositivo de enfriamiento, para luego repasar los protocolos experimentales utilizados para su instalación en las aves. Este dispositivo permite realizar un enfriamiento local y controlado de una región específica del cerebro de canarios que está asociada con el control motor del canto: el núcleo telencefálico HVC. Finalmente, describiremos el esquema de medición y mostraremos los resultados de la calibración del dispositivo.

Los siguientes tres capítulos están destinados al análisis de los resultados principales obtenidos en el experimento de enfriamiento. En el capítulo 5 mostraremos los cambios obtenidos en el canto a partir del enfriamiento de HVC. Describiremos el estiramiento, y en segunda instancia los rompimientos de los elementos constituyentes del canto (sílabas) que se generan a partir de disminuciones progresivas de la temperatura en HVC. Veremos que hay distintos tipos de rompimientos, que no todas las sílabas se rompen, y que esto ocurre a distintas temperaturas según el tipo de sílaba.

El capítulo 6 versará sobre los análisis masivos de los patrones de presión realizados con el fin de cuantificar los fenómenos de estiramiento y rompimiento. Mostraremos el desarrollo de un método de clasificación de sílabas de acuerdo a su morfología y longitud, a través del cual nos será posible entender el fenómeno del estiramiento y rompimiento con una mirada global.

En el último capítulo de esta trilogía, el 7, retornaremos al modelado, pero esta vez con los resultados obtenidos. Presentaremos un diagrama de bifurcaciones del modelo donde se pueden asociar ciertos caminos en el espacio de parámetros con el enfriamiento de HVC. Las bifurcaciones que se presentan son de distintos tipos, y veremos cómo es posible encontrar relaciones precisas entre éstas y los distintos tipos de rompimientos medidos experimentalmente.

En el capítulo 8 mostraremos resultados que refuerzan nuestro modelo in-

teractivo de control motor. Analizaremos evidencias de la existencia de bifurcaciones que ocurren naturalmente en el canto de aves, para dos parámetros distintos en nuestro modelo que describen la actividad en HVC. Además, con enfriamiento, veremos cómo es posible manipular una de estas bifurcaciones, y las ubicaremos en un diagrama de bifurcaciones.

Finalmente habrá un último capítulo con la síntesis y conclusiones del trabajo. A los efectos de facilitar la lectura, cada capítulo comenzará con una breve introducción y tendrá un resumen al final para resaltar los contenidos más importantes del mismo.

# Capítulo 2

# Periferia biomecánica

En este capítulo describiremos las características del canto de las aves, centrándonos primero en un análisis acústico. Estudiaremos el órgano fonador de las aves canoras, la siringe, abocándonos en particular al caso de los oscinos que poseen una estructura bilateral de fuentes de sonido. Luego de estudiar la anatomía involucrada, pasaremos a describir los mecanismos biomecánicos mediante los cuales se producen las vocalizaciones.

Repasaremos una línea de trabajo que utiliza un modelado de baja dimensión para la generación de vocalizaciones sintéticas en las aves. El modelo posee dos parámetros con mayor relevancia que se relacionan con dos gestos fisiológicos concretos, la tensión de los músculos de la siringe y los patrones de presión respiratorios. El estudio de este último será tratado en detalle en el próximo capítulo, y forma parte esencial en el desarrollo de esta tesis. Veremos luego los efectos que el tracto vocal produce en el sonido generado hasta su llegada al exterior del ave a través del pico. Este funciona como un filtro, que le otorga características acústicas particulares.

Finalmente, veremos cómo este modelo, con el agregado dos términos no lineales, puede reproducir tanto cantos espectralmente ricos como cantos tonales. Variaciones suaves de los dos parámetros, los cuales pueden ser medidos, permiten realizar síntesis computacionales realistas de vocalizaciones a través de las ecuaciones del modelo. Discutiremos las validaciones e implicancias del mismo.

### 2.1. Características acústicas del canto

Para el estudio del sonido se utilizan los llamados sonogramas (o espectrogramas, como se muestra en la figura 2.1), que son la representación en tiempo y frecuencia del sonido. El eje X representa al tiempo y el eje Y la frecuencia. Los sonidos de baja frecuencia están cerca de la base y los de alta frecuencia en el sector superior. La información de la amplitud se indica mediante la intensidad en escala de grises, donde trazas mas oscuras indican amplitudes mayores. Matemáticamente, para obtener el sonograma, una vez medida la señal de presión acústica mediante un micrófono, se mira una pequeña fracción de tiempo, una ventana centrada en un tiempo t, en la cual se puede analizar el espectro contenido de este pequeño fragmento a partir de la transformada de Fourier. Se calcula el módulo al cuadrado de la transformada y se dibujan en escala logarítmica de grises los valores correspondientes a cada frecuencia en el tiempo t. La fórmula utilizada para la transformada de Fourier discreta en una ventana que contiene  $N_F$  puntos es la siguiente:

$$X[f] = \sum_{n=0}^{N_{F-1}} X[n] e^{-j2\pi (fn/N_F)}$$
(2.1)

donde X[f] es la componente de Fourier en la frecuencia f, que corresponde al eje Y del sonograma. X[n] es el valor de presión acústica del dato n-ésimo de la ventana. Se pueden utilizar ventanas con distintos pesos, realizando una multiplicación de los términos anteriores por una función ventana w[n-m], con referencia al dato central m en la misma. Estas funciones son en general simétricas y la más utilizada es de tipo gaussiana, ajustándose el ancho de la ventana en función del sonido a analizar. Una ventana ancha brinda más precisión en el espacio de las frecuencias, pero lo pierde en el espacio del tiempo, siendo la situación inversa cuando la ventana es angosta. De esta manera, dibujando un punto para la frecuencia fundamental en una ventana centrada en el tiempo t, y procediendo de la misma forma para tiempos sucesivos, se puede trazar un diagrama de la frecuencia fundamental como una función del tiempo. Lo que se obtiene con este procedimiento es una curva suave que describe la evolución en el tiempo de la frecuencia fundamental vocalizada. Luego, si algún componente armónico de la señal posee algún peso considerable, puede dibujárselo con un peso correspondiente a un nivel de gris en escala logarítmica. Este método de analizar pequeños fragmentos de un canto es un procedimiento útil para los sonidos que cambian rápidamente en frecuencia, y está disponible como parte de casi cualquier paquete de análisis de sonido para la computadora. A lo largo de esta tesis utilizamos el software libre Praat [Boersma and Weenink, 2013].

Para el caso de los canarios, en general el mayor peso espectral del sonido se encuentra en la frecuencia fundamental de la vocalización. Utilizando el sonograma, es muy sencillo identificar en su canto trazas continuas de sonido, separadas por espacios de silencio. Estos segmentos sonoros se identifican en general con el nombre de *sílabas*. En el canto que se muestra en la figura 2.1, se pueden distinguir tres tipos de sílabas según la evolución de su frecuencia fundamental. Hay sílabas que aumentan la frecuencia, que son llamadas "upsweeps", otras que disminuyen la frecuencia, llamadas "downsweeps", y sílabas "tonales", que mantienen la frecuencia constante. Por otro lado, puede ocurrir que haya sílabas compuestas por dos sonidos discontinuos en el espacio de frecuencias, como sucede en la que etiquetamos como de frecuencia "tonal", en la cual hay un sonido corto de alta frecuencia seguido de otro de larga duración, de frecuencia constante y más baja. En el ejemplo mostrado modemos reconocer seis tipos distintos de sílabas.

En la siguiente sección veremos cómo se generan estos sonidos de alta frecuencia a partir de la anatomía del órgano fonador del ave, la siringe.



**Figura 2.1:** Canto de un canario. Arriba se muestra la traza temporal u oscilograma sobre el cual se calcula el sonograma de abajo. En las abscisas está el tiempo, y en el eje vertical se utilizan niveles de gris para marcar los distintos pesos de las componentes de Fourier de la señal temporal del canto. En este ejemplo seis sílabas distintas de un canto tonal de un canario son repetidas hasta decenas de veces. Hasta los 3s hay sílabas que disminuyen la frecuencia ("downsweeps") con tasas de repetición de 33 a 22Hz, de los 3s a los 4s hay "upsweeps" a 20Hz, y de los 4s a los 5.5s son de frecuencia constante ("tonales") a 3Hz. El último tipo de sílaba de más alta frecuencia es un "downsweep" también, a 35Hz.

### 2.2. La anatomía involucrada en el canto

Una sección ventral de una siringe típica de un ave oscina se muestra en la figura 2.2. Esta ilustración se basa en una especie en particular, el brown thrasher (*Toxostoma rufum*) [Goller and Suthers, 1996a]. En contraste con el órgano productor de sonido en los seres humanos (la laringe), la siringe en los oscinos es una estructura doble situada en la unión entre los bronquios y la tráquea. A lo largo de estos tubos se se pueden observar unos anillos cartilaginosos traqueales y bronquiales modificados, algunos rodeados por músculos y membranas [Goller and Suthers, 1996a]. Las válvulas vocales en oscinos están conformadas por algunas de las membranas que se encuentran en la siringe. Estas membranas se llaman labios (ML medial y LL lateral). Los labios son masas de tejido conectivo membranoso capaces de crear, en condiciones apropiadas, oscilaciones de una manera análoga a los pliegues vocales en humanos [Goller and Larsen, 1997]. La válvula se conforma por una constricción de la luz bronquial cuando los labios se juntan por la acción de los músculos aductores. El labio lateral es un tejido grueso en la parte lateral anterior de la pared bronquial, y se une al tercer anillo bronquial. La parte medial de la válvula es una membrana unida a un medio tórico: un lado de la membrana es la luz bronquial, y el otro el espacio interbronquial que se abre al saco aéreo interclavicular (ver sección 3.1 para la anatomía de sacos aéreos). Esta membrana se puede dividir en una parte gruesa conocida como labio medial y una parte muy delgada llamada membrana timpaniforme medial (MTM) [Fee, 2002]. Se han reportado también otros dos tipos de siringe: la siringe traqueal, con una sola fuente de sonido, y la siringe bronquial, en la que las dos fuentes de sonido están situadas asimétricamente en cada bronquio.



**Figura 2.2:** Sección ventral de la siringe traqueobronquial con dos fuentes de sonido, particularmente común en oscinos (brown thrasher, *Toxostoma rufum*). Las dos válvulas vocales se forman a partir de la aducción de los labios laterales y los labios medios en cada lado. LL, ML, labios laterales y medios; MTM, membrana media timpaniforme; T1, primer anillo traqueal; B3 y B4, anillos bronquiales tercero y cuarto; P, pessulus oscificado; SY, músculo siríngeo. Adaptado de [Larsen and Goller, 2002].

La identificación de las fuentes de sonido es un primer paso muy importante en la comprensión de los mecanismos que conducen a la producción vocal. Es entonces importante entender cómo este órgano es impulsado con el fin de generar sonidos que se pueden caracterizar por su mayor o menor tiempo, así como por sus propiedades espectrales. Esto se logra mediante el control de un conjunto de músculos que alteran la configuración de la siringe.

El estudio de la actividad muscular durante una vocalización es una tarea aún más difícil de determinar que las fuentes de sonido, debido a que se requiere la medición electrofisiológica directa de los músculos que controlan la siringe. Un programa de investigación en este sentido fue llevado a cabo en varias especies (en brown thrasher y cardenal, ver [Goller and Suthers, 1996a, R.A.Suthers et al., 1999]). Las mediciones consisten en la inserción de cables delicados que detectan la tensión del tejido. El voltaje medido de esta manera es una medida del grado de actividad del músculo. Con el registro de estos valores para varios músculos simultáneamente y con el flujo de aire y el sonido, fue posible determinar el papel desempeñado por los diferentes músculos en el control de la siringe.

La figura 2.3 muestra un esquema distinto de la siringe, esta vez mostrando los principales músculos que se le atribuyen. A partir de los estudios descriptos anteriormente, se concluyó que algunos músculos están asociados con la apertura o cierre activo del espacio interlabial. En otras palabras, el ave puede empujar un labio contra el otro, cerrando activamente el paso del aire. También puede abrir el paso a partir de la separación de los labios y mantenerlos separados en la medida de lo posible. En ambas situaciones, los labios no vibran. Entre estas dos situaciones extremas, con estos músculos relajados, se pueden establecer condiciones de manera que el flujo de aire provoque la vibración de los labios.

En estudios realizados con brown thrashers [Goller and Suthers, 1996b], se observó que la separación activa de los labios es controlada por el músculo ventral traqueobronquialis ventralis (vTB) y el músculo traqueoloateralis (TL), mientras que el cierre activo es controlado principalmente por los músculos dorsales llamados siringealis dorsalis (dS) y la traqueobronquial



**Figura 2.3:** Esquema con vista ventro-lateral de la siringe de un pájaro canor, que muestra los principales músculos involucrados en la producción del canto en aves. Los músculos (o grupos de músculos) tienen tareas bien definidas, por ejemplo el control de la frecuencia de la vocalización y el "gating" activo del lumen de la siringe. vS, músculo syringealis ventralis; dS, músculo syringealis dorsalis; TL, músculo traqueolateralis, dTB, músculo traqueobronquialis dorsalis; T, la tráquea, ST m. sternotraquealis, vTB, m. traqueobronquialis ventralis, B, bronquios. Adaptado de [Goller and Suthers, 1996b]

dorsal (dTB). Esto se determinó mediante la observación de que la actividad del primer par de músculos aumenta considerablemente mientras que el pájaro está realizando mini-inspiraciones o "minibreaths" (identificados por caídas de la presión a valores por debajo de la presión atmosférica, acompañadas de flujo de aire entrante), mientras que la actividad del segundo par aumenta simultáneamente con la caída en el flujo de aire. De esta manera, el ave debe al menos coordinar los músculos que participan en la apertura y el cierre del lumen de la siringe con los involucrados en la respiración, ya que los pulsos de aire regulados por la apertura y cierre de la siringe se producen por la compresión de los sacos aéreos posteriores (ver sección 3.1).

Por otro lado, una importante diferencia entre una vocalización humana y
una sílaba cantada por las aves (incluso una producida por una única fuente, es decir, por un par de labios oscilantes) es la amplia gama de frecuencias de vibración. El mismo conjunto de mediciones que se utiliza para identificar los músculos que regulan la apertura activa de los labios también hizo posible reconocer la existencia de una correlación entre la actividad de un músculo ventral (siringealis ventralis, vS) y la frecuencia de la vocalización. Se vio que la actividad de este músculo aumenta con la frecuencia y sería éste el que controla la tensión de los labios por medio de la separación de los anillos cartilaginosos sobre los que se apoyan. El papel desempeñado por estos músculos parece ser generalizado entre las aves oscinas [Suthers, 2001], y hay trabajos que muestran evidencia de que vS también desempeña un papel importante en los sonidos producidos por los zebra finch [Goller and Suthers, 1996b, Vicario, 1991, Amador and Margoliash, 2013, Sitt et al., 2008].

Sin embargo, análisis recientes de mediciones en el músculo vS en canarios, podrían poner bajo la lupa esta sencilla correlación entre la actividad de este músculo y la frecuencia de las vocalizaciones ([Alonso and Andreani, 2013], datos no publicados). Aparentemente, la actividad muscular podría estar confinada principalmente a instancias puntuales y relevantes de los gestos motores, las cuales fueron modeladas y medidas para el canto del zebra finch [Amador et al., 2013] (ver sección 3.3.2 para la descripción de estas instancias). Queda aún mucho por entender del funcionamiento en detalle de los músculos de la siringe, y una de las limitantes es el tipo de medición que se realiza. Además de la dificultad experimental en su colocación, los microelectrodos que se insertan en el músculo, luego de atravesar el saco aéreo interclavicular, son capaces de detectar la actividad de sólo algunas de las fibras musculares. Estas observaciones llevan a conjeturar posibles alternativas, en donde la frecuencia del canto esté dada por la sinergia de varios músculos, o por la integración de varias fibras musculares de un mismo músculo (hasta ahora sólo se midió de a un electrodo a la vez insertado en el músculo, sin distinguir el número de fibras detectadas). Esperamos que esta incógnita sea develada en el futuro próximo con la ayuda del análisis dinámico de modelos y más mediciones experimentales.

# 2.3. Un modelo de baja dimensión

#### 2.3.1. Dinámica de la siringe

Uno de los modelos más simples que captura el principio físico de la transferencia de energía desde el flujo de aire a las membranas de tejido de los pliegues vocales o labios, se introdujo originalmente en 1988 por Titze [Titze, 1998], y posteriormente fue observado utilizando videografías en la siringe [Larsen and Goller, 2002]. El modelo está basado en la observación de ondas superficiales que viajan hacia arriba a través de los pliegues durante un ciclo oscilatorio. La siringe presenta un perfil convergente cuando los labios se alejan el uno del otro y un perfil divergente en el semiciclo de cierre. Este modelo se llama de aleteo o "flapping" y consiste en la superposición de los dos modos de oscilación que se ven en la figura 2.4.



**Figura 2.4:** En el modelo de "flapping", los labios se mueven de acuerdo a la coordinación dinámica de dos modos globales. El primer modo es un desplazamiento lateral (a), mientras que el segundo modo es una onda propagante ascendente (b). Adaptado de [Gardner et al., 2001].

Si los labios están desplazados una distancia el uno del otro y tienen un perfil convergente, o son desplazados uno hacia el otro y tienen un perfil divergente, hay una ganancia de energía en los labios debido al flujo de aire en cada ciclo. La razón es que cuando tienen un perfil convergente, la presión media entre los labios está más cerca de la presión bronquial, mientras que la presión interlabial está más cerca de la presión atmosférica para un perfil divergente. Esto resulta en una fuerza en la misma dirección que la velocidad de desplazamiento de los labios, que puede superar la disipación y que permite la existencia de oscilaciones sostenidas (figura 2.5).



**Figura 2.5:** Un ciclo de oscilación de los labios de la siringe. Si los dos modos globales de la figura 2.4 se encuentran activos con la fase correcta, los labios ganan energía del flujo de aire. Esta serie de instantáneas (a)-(e) ilustra el movimiento final de los labios en esta situación. En (f) se muestra el diagrama en términos de los parámetros del modelo, donde se dibujó sólo uno de los dos labios simétricos. Adaptado de [Gardner et al., 2001].

Tomando líneas rectas para simplificar la geometría de las membranas (figura 2.5), las posiciones del borde superior a e inferior b del labio se pueden escribir como  $a = a_0 + x + \tau \dot{x}$  y  $b = b_0 + x - \tau \dot{x}$ . La constante fenomenológica  $\tau$ , como se describe en [Gardner et al., 2001], corresponde al período de la onda estacionaria resultante. Sustituyendo estas ecuaciones en una ecuación de Newton del movimiento propuesto en [Titze, 1998] para la presión promedio sobre la siringe  $p_a = p_{sub}(1 - a/b)$  en en términos de la presión sublabial  $p_{sub}$ ,

la dinámica de los labios resulta ser:

$$\ddot{x} = -kx - \beta \dot{x} + a_{lab} p_{sub} \frac{\Delta + 2\tau \dot{x}}{b_0 + x + \tau \dot{y}} - f_0 \tag{2.2}$$

donde  $\Delta = a_0 - b_0$  es la diferencia del perfil de la siringe en reposo, k es la rigidez del tejido del labio y  $\beta$  una constante que caracteriza la disipación del tejido. El término de fuerza constante  $f_0$  controla la posición estacionaria de los labios (los tres parámetros por unidad de masa). El núcleo de este modelo de "flapping" puede ser investigado a través de un sistema extremadamente simplificado que conserva el mecanismo básico de oscilaciones autosostenidas:

$$\ddot{x} = -kx - (\beta_1 + \beta_2 x^2 - p_0)\dot{x} - f_0 \tag{2.3}$$

La función no lineal de primer orden  $\beta_1 + \beta_2 x^2$  preserva la simetría de la disipación, es decir, es una función impar de la velocidad y una función par del espacio. En particular, el término no lineal  $\beta_2$  impide que el sistema llegue a oscilaciones de gran amplitud, lo que representa el efecto de la colisión entre los labios mayores. Desde un punto de vista dinámico, este sistema es una ligera variación de un oscilador de van der Pol: en un punto inestable, nacen oscilaciones de relajación en una bifurcación de Hopf sin contenido espectral y se hacen más ricas espectralmente a medida que crecen en amplitud.

Con el fin de generar canto, se supone que el ave produce un conjunto de gestos básicos que se identifican con los parámetros del modelo: el término de elasticidad k se asocia con la actividad de los músculos que controlan la rigidez de los labios de la siringe (vS se correlaciona con la frecuencia de la vocalización y no con el flujo de aire [Goller and Suthers, 1996a] ), el parámetro  $p_0$  con la presión del saco aéreo y  $f_0$  con la apertura y cierre activo del flujo de aire controlado por los músculos dS y vTB [Laje et al., 2002]. Como se muestra en el cuadro inferior de la figura 2.6, el diagrama de bifurcaciones del sistema muestra un valor crítico de presión  $p_0$  por sobre el cual las oscilaciones son inducidas a través de una bifurcación de Hopf (región sombreada).



**Figura 2.6:** Dos sonogramas del canto grabado de un chingolo y la simulación numérica usando las ecuaciones de la siringe (2.3) junto con (2.4) para el tracto. El cuadro inferior muestra con elipses los gestos en el espacio de parámetros  $(p_0, k)$  que generan las sílabas. La fonación se interrumpe siempre que  $f_0 > 0$  (línea punteada) y se produce cuando el músculo está inactivo ( $f_0 = 0$ ). La zona sombreada es donde las soluciones presentan oscilaciones sostenidas. La numeración corresponde a sílabas sucesivas, la última (número 4) se repite siete veces. Esta figura es una adaptación de [Laje et al., 2002], donde se especifican los valores de los parámetros.

Teniendo en cuenta que las escalas de tiempo asociadas con la duración y la frecuencia fundamental de las sílabas están bien separadas, la evolución temporal de k trazará esencialmente la evolución temporal de la frecuencia fundamental. Por lo tanto, cada tipo de sílaba se puede expresar como trayectorias elípticas en el espacio de parámetros  $(p_0, k)$  como se ve superpuesto en el diagrama de bifurcaciones de la figura 2.6 (cuadro inferior). El inicio y la terminación de la fonación es controlado por  $f_0$ , evitando la fonación cuando se excede un umbral [Laje et al., 2002]. El canto que resulta de controlar la siringe y el modelo de tracto vocal (ver siguiente sección) a través de las trayectorias elípticas se muestra en el sonograma del panel derecho superior de la figura 2.6, que se puede comparar con el sonograma del canto original del chingolo, en la parte superior izquierda. Los "minibreaths" entre sílabas se explican fácilmente a partir de esta descripción: corresponden a la pequeña porción de la excursión en el espacio de parámetros que pasa por fuera de la región de oscilación, con valores de presión negativos.

### 2.3.2. El filtrado del tracto vocal

A pesar de las diferencias entre oscinos y suboscinos, los mecanismos físicos que conducen a la producción de sonido tienen estrechas similitudes en todas las aves. Una vez que se alcanzan las oscilaciones en la siringe, la perturbación del aire viaja hacia arriba a través del tracto formado por la tráquea, la cavidad oroesofaríngea y el pico (ver figura 2.7). Este pasaje a través de una región confinada afecta a la señal acústica final. Lo más importante es que se lleva a cabo un efecto de filtrado [Riede et al., 2006]. Desde un punto de vista físico, el problema de la tráquea es la de un tubo excitado por una fuente de sonido en un extremo y abierto en el otro. El procesamiento de la señal acústica puede ser descripto de la siguiente manera: las ondas de sonido viajan ida y vuelta en el tubo, rebotando en los extremos e interfiriendo con ellas mismas. Aproximando este tracto vocal por un tubo de longitud L, que se caracteriza por una impedancia con respecto a la presión atmosférica, es decir un coeficiente de reflexión r, la onda de sonido en la entrada del tubo  $P_{in}(t)$  se puede calcular como el resultado de las reflexiones en el tubo

$$P_{in}(t) = v(t)x(t) - rP_{in}\left(t - \frac{2L}{v}\right)$$
(2.4)

donde v(t)x(t) representa las fluctuaciones de presión que se inyectan en el tracto debido a las modulaciones de flujo de aire, con v(t) proporcional a la velocidad media del flujo. La interferencia aumenta las denominadas frecuencias de resonancia fn y deprime las otras. Para un tubo de extremo abierto

de longitud L y sin pérdidas , fn = (2n - 1)c/4L, con c la velocidad del sonido. Cuando se filtra la señal de la fuente, el espectro de sonido original es modulado por el espectro de las vías superiores.



**Figura 2.7:** Esquema del modelo de producción vocal. A la izquierda se ve el esquema de la siringe con el tracto vocal y a la derecha la señal modelada. En la siringe se obtiene el movimiento oscilatorio de los labios x(t) que produce una presión de entrada en el tracto vocal  $P_{in}(t)$ , que luego de ser filtrada por la tráquea (modelada como un tubo) y la OEC (modelada como un resonador de Helmholtz), se obtiene la presión sonora final  $P_{out}(t)$ . Adaptado de [Amador et al., 2013].

El filtrado recién mencionado, se completa con la incorporación de la cavidad oroesofaríngea (OEC). Esta actúa como un resonador de Helmholtz. La fluctuación de la presión transmitida desde la salida del tubo es

$$P_{tr}(t) = (1-r)P_{in}\left(t - \frac{L}{v}\right)$$
(2.5)

la cual fuerza al aire en la glotis, que se aproxima por el cuello de un resonador de Helmholtz (utilizado para modelar la OEC [Perl et al., 2011]), es decir, un gran recipiente con un agujero, de tal manera que el aire en sus proximidades oscila debido a la elasticidad del aire en la cavidad. Un conjunto lineal de tres ecuaciones diferenciales ordinarias representan la dinámica del flujo de aire y la presión en este dispositivo acústico lineal, lo que resulta en la presión final de salida  $P_{out}$ , como se ve en la figura 2.7.

### 2.3.3. Cantos de alto contenido espectral

Para las especies de aves que producen sílabas casi tonales, como los canarios, chingolos y cardenales, el modelo descripto arriba permanece igual. Sin embargo, otras especies producen una amplia variedad de sílabas con contenido espectral variable (figura 2.8). En particular, los zebra finch presentan una fuerte dependencia entre la frecuencia fundamental y el contenido espectral en cada sílaba. En la figura 2.8, se muestran sílabas que se caracterizaron por el trazado de su  $f_{aff}$  frecuencia fundamental promedio como función de su índice de contenido o centroide espectral,  $SCI = \sum_i \frac{f_i \epsilon_i}{Ef_{aff}}$ , donde E es la energía espectral total y  $\epsilon_i$  la energía espectral que corresponde a la frecuencia  $f_i$ . Una gran cantidad de datos experimentales fueron analizados y se encontró que se agrupan en una región delimitada del espacio de parámetros (panel inferior, figura 2.8).

Una explicación para este comportamiento se encuentra con el modelo descripto en las ecuaciones (2.3), con la expansión del primer orden no lineal en la restitución  $k(x) = k_1 + k_2 x^2$  y la disipación  $\beta(x, y) = \beta_1 + \beta_2 x^2 + \beta_3 y^2$ .

El diagrama de bifurcaciones para este sistema se muestra en la figura 2.9, en el espacio de parámetros naturales  $(p_{sub}, k_1)$  [Amador et al., 2008]. La línea roja corresponde a un punto fijo que pierde la estabilidad en una bifurcación de Hopf, que ya identificamos en el modelado como un mecanismo oscilatorio básico de la siringe. Otras soluciones aparecen en este modelo completamente desarrollado. Cuando se abandona la región 5 para alcanzar la región 2, un punto fijo nodo silla ("saddle node") y un atractor chocan en una bifurcación de nodo-silla ("saddle node bifurcation"). Pero como la variedad inestable del nodo silla es parte de la variedad estable del atractor, nace una oscilación cuando los puntos fijos chocan. Se dice que la oscilación nace de una bifurcación nodo-silla en un ciclo límite (SNLC, "saddle node in a limit cycle"), y presenta una amplitud finita y frecuencia cero, por lo que



**Figura 2.8:** Sonograma del canto de un Zebra finch, *Taeniopy*gia guttata (panel superior) y el esquema de clasificación de sílabas  $(f_{aff}, SCI)$  (panel inferior). Adaptado de [Sitt et al., 2008].

posee un rico contenido espectral. La diferencia con una bifurcación de Hopf es que en esta última la oscilación nace con amplitud cero y una frecuencia finita.

La línea correspondiente a la bifurcación SNLC puede ser atravesada solamente a partir de cambios de presión sublabiales  $p_{sub}$ , y la frecuencia de las oscilaciones depende en gran medida de la distancia de la presión al punto de bifurcación. Por lo tanto, el modelo sugiere que es posible controlar la frecuencia fundamental de las vocalizaciones con las modulaciones de la presión de los sacos aéreos. De esta manera, si los parámetros se encuentran en las proximidades de la bifurcación y se clasifican los sonidos simulados en el espacio SCI como una función de la presión, se obtiene una curva que se ajusta muy bien a los puntos experimentales (línea de puntos de la figura 2.8) para las sílabas de baja frecuencia. Esta predicción del modelo es consistente con las observaciones experimentales de ausencia de actividad en



**Figura 2.9:** Diagrama de bifurcaciones en el espacio de parámetros  $(p_0, k)$ . El recorrido A pasa a través de una bifurcación SNLC y el (B) a través de una bifurcación de Hopf. Adaptado de [Amador et al., 2008].

los músculos ventrales de la siringe para sonidos de baja frecuencia en los zebra finch [Vicario, 1991]. Una interpretación plausible en el marco de este modelo es que las vocalizaciones se originan en las bifurcaciones SNLC y la frecuencia fundamental sólo se controla mediante la presión en los sacos aéreos [Amador et al., 2008].

## 2.3.4. Validación e implicancias del modelo

El modelo descripto arriba pudo ser probado y validado utilizando datos experimentales medidos sobre las instrucciones fisiológicas utilizadas por las aves durante el canto. En cantos de cardenales (Cardinalis cardinalis), se registraron grabaciones simultáneas de las actividades musculares vS y dTB junto con la presión de los sacos aéreos [Mindlin et al., 2003] y se encontraron asociaciones entre estas actividades específicas con un "gating" y una tensión de los músculos que tensan los labios respectivamente, se vio que estas instrucciones estaban asociadas a los parámetros del modelo  $f_0$  y k. La actividad muscular se registró a través de electromiogramas (EMG), medidos con electrodos implantados en los músculos de la siringe. Los registros de EMG consisten en señales con picos que necesitan ser suavizadas y rectificadas con el fin de obtener curvas de la envolvente que se pueden utilizar como entrada para las ecuaciones del modelo (2.3). Por otro lado, los patrones de presión fueron medidos a través de una cánula insertada en el saco aéreo torácico anterior y conectado a un transductor piezoeléctrico (más detalles en el capítulo 4). Estos patrones se asociaron al parámetro  $p_0$ . Se supone que existen relaciones lineales entre las actividades musculares suavizadas vS y dS, y la presión de los sacos aéreos, y los correspondientes parámetros del modelo. La figura 2.10 muestra cantos experimentales y sintetizados generados con el modelo de siringe alimentado con los parámetros fisiológicos [Mindlin et al., 2003]. El modelo predice que para upsweeps, un valor de  $f_0$  que impide la fonación en el comienzo de la sílaba debe ser menor que el valor de  $f_0$  en su extremo, predicción que fue observada para todos los datos experimentales analizados.

Por otro lado, ha sido posible realizar este mismo tipo de síntesis con datos experimentales de zebra finch (figura 2.11) [Sitt et al., 2010], y hasta comandar un chip programable (cuyo nombre se ha designado como "siringe electrónica"), que pudo sintetizar el canto en tiempo real a partir de instrucciones fisiológicas medidas en un pájaro enmudecido [Arneodo et al., 2012]. De esta manera, la signatura dinámica revelada por el contenido espectral frente a la frecuencia fundamental en los zebra finch permite una explicación biológica simple en términos del modelo: un órgano vocal "sintonizado" en la vecindad de una bifurcación SNILC puede producir una variedad de sonidos espectralmente ricos por la acción de la presión de los sacos aéreos o una simple combinación de esta presión y de los músculos dorsales. Esto fue corroborado utilizando una despresurización activa durante las vocalizaciones en zebra finch [Amador and Margoliash, 2013]. El resultado fue una modificación de la frecuencia de vocalización en consonancia con la esperada por el modelo.



**Figura 2.10:** Soporte experimental para el modelo de producción de canto alimentado con las instrucciones fisiológicas (panel de la izquierda) de la presión de sacos aéreos, y actividades musculares vS y dTB. Las trazas temporales suavizadas se asocian con los parámetros  $p_0$ ,  $k \ y \ f_0$ , respectivamente. Los sonogramas de las sílabas grabadas y sintéticas resultantes se muestran en los paneles superior e inferior de la derecha. Esta figura fue adaptada de [Mindlin et al., 2003].



**Figura 2.11:** Síntesis del canto de zebra finch. Arriba está el canto natural, y abajo el sintetizado a partir de alimentar el modelo con instrucciones fisiológicas experimentales de presión en los sacos aéreos y actividad en el músculo vS de la siringe. Adaptado de [Sitt et al., 2010].

Más allá de la similitud entre los sonogramas experimentales y sintéticos y la posibilidad de controlar el modelo con mediciones fisiológicas reales, resta saber si las simplificaciones realizadas representan de manera adecuada los mecanismos del canto. Es decir, ¿son las variables fisiológicas reconocidas a partir del modelo suficientes para explicar el control del órgano no lineal del canto, la siringe?; ; se necesitan más detalles en el modelado para poder representar adecuadamente la anatomía y dinámica de la siringe? La respuesta a esta incógnita ha sido develada como resultado de un experimento muy reciente en el área. Se sabe que un grupo específico de neuronas en el cerebro de los pájaros que responden (es decir, generan una serie de señales de potencial de acción que se pueden medir con un electrodo) específicamente al canto propio y no a ningún otro tipo de sonido [Yu and Margoliash, 1996], cuando el pájaro está durmiendo. A partir de cantos originales de varias aves, se llevó a cabo una reconstrucción inversa de los gestos fisiológicos de presión y tensión y se realizó el experimento de hacer escuchar distintos estímulos auditivos a pájaros dormidos. El resultado fue que el grupo de neuronas medidas en los zebra finch respondieron únicamente al canto propio original y al reconstruido con el modelo [Amador et al., 2013]. La última mejora al modelado que pudo ser contrastada con estos experimentos, fue la suma de ruido blanco a la instrucción fisiológica de la tensión de los músculos de la siringe, lo cual mejoró su calidad tímbrica [Perl et al., 2011] y la respuesta neuronal.

La importancia para esta tesis de la descripción de los mecanismos de generación del canto se encuentra en el reconocimiento de las variables fisiológicas relevantes en el control del órgano no lineal periférico encargado de producir las vocalizaciones. Estas variables o instrucciones provienen del sistema nervioso central de las aves, y entre ellas se encuentran los patrones de presión utilizados por las aves durante el canto. Nos abocaremos a su estudio en el siguiente capítulo.

## 2.4. Resumen

En este capítulo se describieron las características principales del canto en aves, identificando los elementos que lo componen: las sílabas. Se introdujo el sonograma, una herramienta fundamental para el estudio de señales acústicas en aves. Estas sílabas pueden ser identificadas por su contenido espectral y la evolución de su frecuencia fundamental.

Hicimos una descripción de la anatomía involucrada en el canto de las aves, reconociendo un órgano periférico no lineal, la siringe. Vimos la forma en que las oscilaciones de la estructura de labios que allí se encuentran produce las fluctuaciones del flujo de aire, que finalmente se traducen en el sonido que escuchamos. Describimos la musculatura que rodea la siringe y la función específica de los músculos más importantes.

Mostramos el modelo utilizado para dar cuenta de la generación de sonido en la periferia del ave. Este modelo tiene en cuenta la dinámica newtoniana de los labios de la siringe y el filtrado pasivo del tracto vocal. Distintas modificaciones del mismo permitieron generar cantos tonales como espectralmente ricos para diferentes tipos de aves.

Finalmente, repasamos distintas validaciones experimentales del modelo. Este pudo ser controlado a partir de variables fisiológicas medidas experimentalmente y además pudo ser pudo ser "reconocido" a través de la actividad de un grupo de neuronas en el cerebro de las aves.

# Capítulo 3

# Patrones de presión

En este capítulo abordaremos el problema de simular patrones fisiológicos a partir de un modelado. Vimos en el capítulo anterior que son de suma importancia para el control de las vocalizaciones en aves dos gestos fisiológicos. Uno de ellos es el correspondiente a la actividad muscular que tensa los labios que oscilan en el órgano fonador, la siringe, y el otro son los patrones respiratorios con los que se genera la presión subsiríngea que les otorga la energía necesaria para oscilar. Experimentalmente, ambos gestos motores pueden ser medidos en el laboratorio. Sin embargo, el último es mucho más sencillo de adquirir y es a partir del cual en los últimos años se han propuesto modelos que tratan de describir los mecanismos dinámicos intervinientes en su generación.

Repasaremos primero la diversidad de gestos motores respiratorios medidos en el canto de canarios. Luego estableceremos los ingredientes que contiene un sistema dinámico que los reproduce cualitativa y cuantitativamente y finalmente analizaremos los parámetros del modelo que se pueden variar para obtener la enorme diversidad de gestos motores respiratorios en los canarios.

Basados en la neuroanatomía de las aves, propondremos un posible mecanismo neuronal de baja dimensión como generador de los gestos motores de presión, y lo compararemos con otros modelos y resultados experimentales. Luego, analizaremos los cambios que se producen al variar continuamente uno de los parámetros y propondremos una intervención experimental que permite su manipulación. Discutimos finalmente posibles extensiones del modelo.

# 3.1. Diversidad de patrones respiratorios

Con el fin de lograr un adecuado intercambio gaseoso en los pulmones y proporcionar a su vez el flujo de aire necesario para las vocalizaciones, la producción del canto requiere patrones respiratorios muy precisos. Para lograrlo, las aves poseen un sistema respiratorio que es único en cuanto a su estructura y eficiencia. Los pulmones de las aves son pequeños y relativamente rígidos (con un volumen casi fijo), y no se mueven libremente [Hildebrand, 1995]. Su ventilación se lleva a cabo por un conjunto de sacos aéreos que son estructuras de pared delgada que se conectan a la tráquea y los pulmones de una manera compleja. La estructura típica consta de un par de sacos abdominales (donde terminan los bronquios primarios), un par de sacos torácicos posteriores, un par de sacos torácicos anteriores, un par de sacos cervicales y un único saco aéreo interclavicular. Un esquema de esta anatomía puede verse en la figura 3.1.

El movimiento de estos sacos se debe a la acción de músculos inspiratorios y espiratorios. A partir del movimiento del esternón ventral con los músculos inspiratorios se produce una disminución de la presión y se expanden los sacos aéreos. El movimiento se invierte por los músculos espiratorios que comprimen los sacos aéreos, aumentando la presión. Es durante la espiración que se consiguen la mayoría de las vocalizaciones. La presión durante el canto puede ser de un orden de magnitud más a la mayor encontrada durante el funcionamiento normal, la respiración silenciosa, alcanzando valores de hasta 30 cm  $H_2O$  en algunas sílabas cantadas por un canario [Hartley and Suthers, 1989].

A pesar de la amplia variedad de características anatómicas que se encuentran en los órganos del aparato vocal aviar, es interesante que algunos patrones motores se encuentran repetidos entre diferentes grupos de aves. Por ejemplo, en el caso de oscinos y no oscinos, la producción de sílabas



**Figura 3.1:** Esquema anatómico de las aves, donde se muestra el sistema respiratorio y fonador. En (A) se ve un esquema frontal y en (B) la disposición dentro del ave. Se pueden ver 2 pulmones rígidos y 4 pares de sacos aéreos, más uno interclavicular, que rodea en la parte posterior a la siringe, el órgano fonador. Todos se comunican con los pulmones, que a su vez se unen a través de dos bronquios a la tráquea, que se comunica a su vez con el pico y fosas nasales.

repetidas a una velocidad moderada implica una breve inspiración, o "minibreath" [Calder, 1970], que permite la sustitución del aire utilizado para la vocalización. Debemos notar que las instrucciones neuronales para controlar la actividad de los músculos inspiratorios y espiratorios interactúan con la mecánica del cuerpo durante el proceso. Por un lado, receptores de estiramiento modularán la actividad de las neuronas que controlan la inspiración, y por otro, ambos músculos inspiratorios y espiratorios estarán operando en conjunto con las fuerzas de retroceso elástico torácicas: para volúmenes pequeños de sacos aéreos, el retroceso ayudará a los músculos respiratorios, mientras que para volúmenes de sacos aéreos más grandes que el valor de equilibrio, el retroceso elástico ayudará a la espiración [Suthers et al., 2004].

Un segundo patrón respiratorio utilizado con frecuencia en todos los grupos de aves es la sílaba llamada "pulsátil", que se utiliza a una velocidad de repetición muy alta. En este patrón, no hay "minibreaths" y la espiración se mantiene a través de un cierto nivel de actividad en los músculos espiratorios. La tasa de repetición crítica en la que un pájaro comienza a utilizar un régimen respiratorio pulsátil depende de su tamaño corporal, probablemente debido a la frecuencia natural de las piezas mecánicas del cuerpo que participan en la respiración. Esta hipótesis fue probada por pájaros imitadores (*Mimus polyglottos* o "mockingbird") tutoreados con canarios cantando con "minibreaths" [Zollinger and Suthers, 2004]. El resultado del experimento fue que los imitadores pudieron copiar la alta velocidad de repetición de sílabas, pero con un gesto respiratorio pulsátil. Este es un bello ejemplo que da cuenta de la sutil interacción entre el sistema nervioso y el sistema biomecánico periférico.

#### 3.1.1. Gestos de presión en canarios

El canto del canario en particular se encuentra jerárquicamente estructurado: sílabas cortas, tonales y estereotipadas son repetidas hasta docenas de veces para formar "frases". Estas se combinan de forma variable para construir el canto. Las distintas frases consisten en sílabas que se repiten típicamente a una frecuencia silábica característica. En términos de los sacos aéreos, diferentes tipos silábicos son ejecutados a diferentes tasas de repetición. Por ejemplo, las repeticiones más rápidas de entre 30 y 60 Hz corresponden a los pulsos espiratorios sostenidos con pequeñas fluctuaciones, sílabas "pulsátiles". Repeticiones más lentas, de hasta 30 Hz, son típicamente generadas con pulsos de presión espiratorios cortos que alternan con los "minibreaths", y pueden llegar hasta los 2Hz aproximadamente. Estas las distinguimos en tres grupos según estén en el orden de los 2Hz, 10Hz o 20Hz. Las sílabas más largas, en donde se produce una espiración sostenida con pocas fluctuaciones las nombraremos como "p0", las que se encuentran en el orden de los 10Hz y poseen en general una fluctuación interna las llamaremos "p2", mientras que las más rápidas ( $\sim 20Hz$ ) que son similares a oscilaciones armónicas la denotaremos por "p1". En la figura 3.2 podemos apreciar un ejemplo conteniendo los distintos tipos de patrones respiratorios utilizados



por los canarios para realizar el canto.

**Figura 3.2:** Diversidad de gestos respiratorios en el canto de canarios. Se muestra arriba el sonograma correspondiente al ejemplo de la figura 2.1, junto con los patrones respiratorios utilizados para su generación. Distinguimos cuatro tipos distintos de sílabas o gestos. La "pulsátil", "p2", "p1" y "p0", que en general son realizadas a distintas frecuencias silábicas.

Los canarios poseen un repertorio de aproximadamente 30 sílabas distintas, que repiten hasta decenas de veces para conformar el canto, el cuál puede variar entre distintas rendiciones y puede llegar a durar minutos. En cambio, los zebra finch poseen una sucesión de sílabas estereotipadas, propias de cada individuo, pero que se repiten siempre del mismo modo una vez que el pájaro adquirió el canto adulto. La duración de estas es de a lo sumo un par de segundos.

# 3.2. Un modelo de baja dimensión

En este apartado explicaremos cómo es posible simular las diferentes formas de los patrones respiratorios del canto de canarios aproximándolos por las soluciones subarmónicas forzadas un sistema de ecuaciones en su forma normal. Así como los ritmos silábicos son estereotipados a través de diferentes individuos, los patrones de presión correspondientes a diferentes sílabas presentan características similares que se encuentran en individuos distintos. Como vimos arriba, generalmente los siguientes patrones se encuentran: oscilaciones sencillas casi armónicas de alta frecuencia, fluctuaciones en torno a un nivel de expiración constante y pulsos de presión de larga duración [Alonso et al., 2009, Alliende et al., 2010]. Por otra parte, las aves sometidas a diferentes aprendizajes poseen patrones de presión con formas similares. Una hipótesis parsimoniosa es que la diversidad respiratoria de gestos motores emerge de un sistema igualmente diverso y complejo. Alternativamente, la diversidad puede ser explicada por las diferentes soluciones no lineales que un único sistema puede presentar para distintos parámetros. Para este último caso, el conjunto de soluciones es limitado severamente por los mecanismos que intervienen en su generación. Un modelo sencillo se construyó a partir de la identificación de los elementos dinámicos que permiten reproducir la forma del patrón de presión correspondiente a un tipo sílaba, la "p0" [Alonso et al., 2009]. Lo interesante del modelo, es que su estudio para otros valores de sus parámetros permitió recuperar los diferentes patrones de presión utilizados durante el canto. Este sistema dinámico es, en cierto sentido, mínimo: es la forma normal forzada de una singularidad lineal.

## 3.2.1. Matemática del modelo

Del estudio de una sílaba tipo p0, se conjeturó que el cambio desde el régimen "apagado" denotado por 1 en la figura 3.3 al "prendido" denotado por 2, ocurre al atravesar una bifurcación tipo "cusp". Las oscilaciones presentes en el régimen "prendido" se explican con la presencia de una bifurcación de Hopf. El sistema dinámico buscado debe ser por lo menos de dos dimensiones, y debe poseer el atractor del estado "prendido" cerca de una bifurcación de Hopf. En un espacio de parámetros bidimensional, la línea de la bifurcación de Hopf y las curvas de bifurcación de nodo-silla ("cusp") deben coexistir. Se eligieron los parámetros para que las curvas de estas bifurcaciones se encuentren, quedando la forma normal de esta singularidad lineal de la siguiente manera:

$$\dot{x} = y$$
  
 $\dot{y} = x^2 - xy - x^3 - x^2 y$  (3.1)

que es la forma normal para la bifurcación de Takens-Bogdanov. Esta presenta tres puntos fijos, dos de ellos estables, y una bifurcación de Hopf supercrítica. Los diferentes estados mostrados por este sistema se obtienen según se varían los parámetros del mismo.

Esta bifurcación desarrollada con parámetros dependientes del tiempo, a modo de forzante, conduce a:

$$\dot{x} = y$$
  
 $\dot{y} = \alpha(t) + \beta(t)x + x^2 - xy - x^3 - x^2y$  (3.2)

En la figura 3.3.b, se muestra la integración numérica del modelo dinámico con los parámetros moviéndose a lo largo de la trayectoria que se muestra en la figura 3.3.c. Los patrones observados de presión son p(t) = 2 - x(t)donde x(t) es una solución de la ecuación 3.2. Diferentes patrones de presión pueden ser modelados de esta forma usando una forma particular para  $\alpha(t)$ y  $\beta(t)$ :

$$\alpha(t) = \alpha_0 + A\cos(\theta)\cos(\omega t)$$
  

$$\beta(t) = \beta_0 + A\sin(\theta)\cos(\omega t)$$
(3.3)

El parámetro A representa la amplitud del forzante,  $\omega$  es la frecuencia, y  $\theta$  es la dirección del forzante en el plano ( $\alpha, \beta$ ) como se muestra en la figura 3.3.c. Para sintetizar varias repeticiones de los patrones de presión se repite el forzante en sucesivos periodos. Sin embargo, como el modelo es no lineal, la gama de frecuencias para las que el sistema muestra este comportamiento simple es acotado. Para mayores frecuencias, el sistema puede mostrar solu-



Figura 3.3: . Modelado de los patrones de presión a partir de un patrón tipo p0. (a) Patrón de presión experimental. (b) Patrón de presión simulado. (c) Diagrama en el espacio de parámetros del modelo autónomo de la ecuación 3.2. Este tiene dos curvas convergentes en una bifurcación tipo cúspide ("cusp"), que está formada por curvas de bifurcación nodo de silla ("saddle node"). Entre las dos curvas hay dos atractores separados por un punto fijo tipo "saddle". La tercera curva es una bifurcación de Hopf. Las flechas indican el camino seguido en el espacio de parámetros con el fin de generar el patrón experimental en (a) Integrando el modelo con parámetros dependientes del tiempo representados por las flechas en la parte (c), permite sintetizar la serie de tiempo que se muestra en (b). En un momento dado, representado por 1, los parámetros del modelo se cambiaron, y el sistema evoluciona a un atractor diferente, el estado "prendido", representado por 2. Después de un tiempo, los parámetros del modelo cambian de nuevo a sus valores originales en 3. Adaptado de [Alonso et al., 2009]

ciones subarmónicas.

Cambiando los parámetros del forzante se pudo probar la hipótesis de que todos los patrones de presión encontrados en la generación de canto del canario son compatibles con este modelo sencillo. Por lo tanto, las formas distintivas de los patrones de presión utilizados para generar diferentes sílabas no son arbitrarias: las sílabas con una tasa de repetición dada deben presentar formas particulares. En la figura 3.4 se puede ver la comparación entre el patrón medido y el simulado con este modelo. Cada sílaba se encuentra como el mejor ajuste de parámetros en el modelo [Alonso et al., 2009].



**Figura 3.4:** Ejemplo de la integración del modelo a través de su forma normal. Se pueden obtener los patrones de presión del canto de un canario en toda su diversidad modificando sólo dos parámetros. Arriba está el patrón experimental y abajo el mejor ajuste de parámetros encontrado. Adaptado de [Alonso et al., 2009]

Interpretando la diversidad de los gestos fisiológicos como soluciones subarmónicas de un sistema no lineal sencillo permite dar cuenta simultáneamente de sus características morfológicas así como de la sincronización silábica, y sugiere una estrategia para la generación de patrones motores complejos.

# 3.3. Adaptando el modelo a la biología

Con el fin de generar los patrones de presión necesarios para producir el canto, un ave oscina utiliza una compleja arquitectura neuronal. La "ruta motora" del canto es un conjunto de núcleos neuronales interconectados, cada uno compuesto de unos pocos miles de neuronas que son indispensables para la generación del canto en aves. El patrón de actividad eléctrica que emerge de este sustrato físico eventualmente se transduce a la actividad de los músculos apropiados que controlan los gestos respiratorios. Se han hecho intentos de aplicar modelos para estos sistemas neurales [Hoppensteadt and Izhikevich, 1997, Abarbanel et al., 2004], sin embargo el gran número de unidades neuronales implicadas y la complejidad de su conectividad dificultan la exploración experimental.

Cuando describimos los procesos físicos que intervienen en la generación del canto de aves en el capítulo anterior mostramos modelos basados en los principios básicos de la física. En una segunda instancia, podemos intentar modelar la actividad de un cerebro cuando se está controlando el canto. El modelado puede apoyar a modelos conceptuales desarrollados a partir de experimentos directos en una o unas pocas neuronas y puede ayudar a traducirlos en recetas matemáticas con dependencias explícitas sobre los parámetros, permitiendo convertir conjeturas en teorías comprobables. Por otro lado, los modelados de cerebros o de núcleos cerebrales siguen siendo un gran reto en la actualidad. No es sólo que las computadoras son lentas para la tarea, sino que tampoco existe una teoría cualitativa de sistemas no lineales extensos que nos permitan interpretar la información simulada. Sin embargo, lo visto en la sección anterior, motiva la búsqueda dentro del cerebro de las aves canoras de los mecanismos, arquitecturas o actividades que pueden ser compatibles con un modelado sencillo de baja dimensión.

En esta sección haremos una breve descripción de la neuroanatomía de las aves canoras. Veremos que existen varios núcleos diferenciados con interconexiones específicas que conforman la ruta generadora de los patrones motores. Describiremos un paradigma actual y muy cuestionado en el campo, sobre cómo se cree se generan los gestos motores en el cerebro de los pájaros. Este propone una complejidad en el cerebro comparable con la complejidad y diversidad encontrada en las características acústicas del canto. Luego describiremos nuestro modelo alternativo, en donde la diversidad de gestos motores está dada por la arquitectura neuronal comandada a partir de instrucciones sencillas.

#### 3.3.1. Neuroanatomía: la ruta motora

Recordando lo mencionado en el capítulo 1, fue a través de lesiones y la observación de la conducta que fueron identificados los núcleos involucrados en la generación de las actividades motoras responsables de la producción del canto [Nottebohm, 1976]. La "ruta motora" posee dos núcleos muy estudiados, llamados HVC (utilizado como nombre propio) y RA (núcleo robustus del archistriatum). HVC envía instrucciones al RA, que a su vez envía instrucciones a varios núcleos: el traqueosiríngeo nXIIts, un núcleo motor que inerva los músculos de la siringe, y un conjunto de núcleos respiratorios (entre los que se encuentra el núcleo premotor espiratorio retroambigualis RAm y el parambigualis PAm), que inervan los músculos involucrados en la respiración (ver figura 3.5). HVC y RA son necesarios para la producción del canto, ya que lesiones en ellos conducen a su supresión. La función específica de cada núcleo es más difícil de develar, sin embargo durante un tiempo se creyó en una posible organización jerárquica en el cerebro. La evidencia se basó en que microestimulaciones en HVC son seguidas por la interrupción del canto y el reinicio del mismo, mientras que microestimulaciones de RA interrumpen sólo la sílaba que está siendo cantada [Yu and Margoliash, 1996, Fee et al., 2004]. Actualmente se recogió nueva evidencia que muestra que también hay mecanismos de retroalimentación o "feedback" [Ashmore, 2008] y que el HVC no sería la estructura premotora en donde se inicia la actividad [Amador et al., 2013]. El circuito se cierra con una conexión desde el sistema de núcleos en el tallo encefálico, que incluye

al núcleo DM (núcleo intercolicular dorsomedial) en el mesencéfalo, hacia el telencéfalo a través de un núcleo llamado UVa (núcleo uvaeformis).



**Figura 3.5:** Esquema simplificado de la ruta motora del canto. Las áreas oscuras con letras blancas son necesarias para la producción del canto en adultos, mientras que las claras con letras negras son necesarias para el desarrollo del canto normal, pero no la producción de canto adulto. Las flechas continuas muestran la ruta motora, y las flechas discontinuas la ruta anterior del prosencéfalo, o AFP. HVC, utilizado como nombre propio, RA, núcleo robusto del arcopallium; nXIIts, parte del núcleo traqueosiríngeo hipoglosal; núcleo premotor espiratorio RAm, núcleo retroambigualis; núcleo premotor inspiratorio PAm, núcleo dorsolateral medio del tálamo; LMAN, núcleo magnocelular anterior del nidopallium; UVa, núcleo uvaeformis; DM, núcleo intercolicular dorsomedial.

Observada desde el sistema periférico, la ruta motora tiene que generar instrucciones cíclicas para comandar la siringe y el sistema respiratorio. Por otra parte, con el fin de producir la diversidad de las sílabas del canto tiene que ser capaz de generar una diversidad de diferencias de fase entre estas oscilaciones, como vimos en el capítulo anterior. Para lograr esto, en primer lugar, RAm y nXIIts, las estructuras del tallo cerebral más directamente involucradas en la fonación, reciben proyecciones de neuronas desde diferentes regiones de RA [Spiro et al., 1999]. Desde RAm también se proyecta hacia nXIIts. El núcleo RA está inervado por neuronas excitatorias que proyectan desde el núcleo HVC. Al igual que el RA está estrechamente vinculado con el sistema motor periférico, se supone que el HVC tiene conexiones con zonas del sistema nervioso de más alto nivel [Yu and Margoliash, 1996, Suthers and Margoliash, 2002].

Un segundo conjunto de núcleos interconectados es la ruta anterior del prosencéfalo (AFP), que también se muestra en la figura 3.5 y se conecta indirectamente a los núcleos HVC y RA. En contraste con la ruta motora, la AFP contribuye sólo mínimamente en la producción del canto en adultos Brainard and Doupe, 2002. Sin embargo, se ha demostrado que lesiones en estos núcleos durante el aprendizaje alteran profundamente la capacidad de las aves para el desarrollo del canto normal Scharff and Nottebohm, 1991, Bottjer et al., 1984]. Tres núcleos son parte del AFP: el área X, el núcleo medio dorsolateral del tálamo (DLM) y el núcleo lateral magnocelular del neostratum anterior (LMAN). No se conoce aun la forma en que este sistema opera durante el aprendizaje. La ruta motora y el AFP no están aislados. Algunas neuronas en RA reciben señales tanto de HVC como de LMAN. LMAN envía al RA (parte de la ruta motora) o bien una señal de corrección de errores o una señal de refuerzo durante el aprendizaje que eventualmente con el tiempo contribuyen a la reconfiguración de las conexiones dentro de la ruta motora.

#### 3.3.2. El modelo "feedforward"

El modelo que describimos en este apartado fue el propuesto por Michale Fee y colaboradores a partir de los trabajos realizados en zebra finch [Hahnloser et al., 2002] y [Fee et al., 2004]. Estos trabajos han demostrado que durante las vocalizaciones, una neurona HVC(RA), llamadas así por ser las proyectoras desde HVC hasta RA, se activa sólo durante una pequeña ventana temporal de aproximadamente 10 ms, y produce alrededor de 5 disparos. Si un motivo (una sucesión estereotipada de sílabas) se repite, cada neurona de HVC repetirá sus disparos en la misma ventana de tiempo. Por otra parte, las neuronas de RA generan secuencias altamente estereotipadas de disparos de potenciales de acción, por lo general de unos pocos disparos de aproximadamente 10 ms de duración por motivo, muy bien coordinados con las sílabas [Chi and Margoliash, 2001]. El cuadro que surge de estos experimentos es que durante cada ventana de tiempo en la secuencia del RA, las neuronas son activadas por una subpoblación de neuronas proyectoras de HVC, que sólo son activas durante la ventana de tiempo [Hahnloser et al., 2002, Fee et al., 2004].

En este paradigma, el modelo propone que la secuencia de "disparos" de las neuronas es la que se puede apreciar en la figura 3.6. Las neuronas HVC(RA) se encuentran activas sólo en un momento particular en el motivo del canto. Además, cada uno de estos momentos particulares, se asocia con una única población coactiva de neuronas HVC(RA). El conjunto de las neuronas activadas se determina por el patrón de las conexiones sinápticas del HVC a RA. En este modelo, el efecto del RA en salida vocal es de corta duración y es producido por la convergencia de las neuronas de RA, con un conjunto de pesos sinápticos fijos, en una sola neurona que representa la salida motora.Uno podría pensar a esta salida motora como el control de una vocalización particular, en parámetros tales como la frecuencia del sonido. Las secuencias de configuraciones motoras, o musculares, son generadas en cada paso de tiempo por la actividad en las neuronas HVC(RA), donde tanto la actividad de las neuronas HVC(RA) y sus efectos en los subsiguientes núcleos a los que conecta ("río abajo" o "downstream" en inglés) están muy localizados en el tiempo.

En este modelo, el patrón de actividad en RA, y por lo tanto la salida vocal, están determinados por el patrón de sinapsis HVC(RA)-RA. Desde este punto de vista, el aprendizaje vocal es controlado por la plasticidad sináptica en estas sinapsis. El aprendizaje del canto sería entonces el proceso de la modulación de la conectividad efectiva de neuronas en HVC escasamente activas a las neuronas motoras a las que conecta ("río abajo" o "downstream" en inglés) de tal manera que, en cada momento, se produce la salida



**Figura 3.6:** Modelo feedforward. En cada momento en la secuencia, un conjunto de neuronas de HVC activa a otro conjunto de neuronas en RA, con las que están sinápticamente conectadas. La hipótesis de la generación de la secuencia vocal en el canto del zebra finch es que (A) las neuronas HVC(RA) disparan una sola vez en el motivo del canto. En cada momento del canto, una población coactiva de aproximadamente 200 neuronas HVC(RA) activarían al 10% de las neuronas de RA, que a su vez convergen (a través de las neuronas motoras) para producir una señal de control del motor (por ejemplo, la activación del músculo). (B) Representación de la tasa de disparo de cada población de neuronas durante una breve secuencia (duración de 70 ms, lo que corresponde más o menos a una sílaba corta del canto). Adaptado de [Hahnloser et al., 2002].

motora correcta: RA sirve como un cuadro en el que neuronas HVC(RA) se conectan para producir la salida motora correcta.

El análisis del modelo recientemente presentado indica que las neuronas disparan secuencialmente y en cadena cada 10 ms, ocupando todo el espacio temporal. Se sugiere que en cada paso temporal las actividades y conexiones que hay en el sistema son específicas para que el comportamiento acústico sea el observado. Cabe remarcar que este modelo está inspirado por el preciso enganchado ("lockeo") temporal entre el contenido vocal y el disparo de las neuronas, pero carece de datos suficientes para respaldarlo inequívocamente. Refutando esta idea, la de codificación densa en HVC, se encuentran las mediciones recientes de actividad precisamente lockeada a gestos motores reconstruidos con el modelo físico explicado en el capítulo anterior. En este nuevo paradigma, las neuronas disparan en instancias motoras significativas y no continuamente cada 10ms [Amador et al., 2013].

Por otro lado, el modelo "feedforward" propone la existencia de una única escala temporal, localizada en HVC, e ignora la posibilidad de la interacción con el circuito encargado de controlar la respiración, que es previo evolutivamente, siendo el telencéfalo el que toma el control de toda la actividad de los subsiguiente núcleos a los que se conecta en la ruta motora ("río abajo" o "downstream"). Se lo llama modelo "feedforward" por esta razón: consiste en una serie de etapas lineales en donde las instrucciones se van transmitiendo sin ninguna retroalimentación o "feedback" El único respaldo experimental que presenta este modelo es el realizado en el trabajo [Long and Fee, 2008]. Este consiste en la manipulación bilateral de la temperatura del núcleo telencefálico HVC mientras el ave canta. Para lograrlo, diseñaron un dispositivo, basado en el efecto Peltier, que es capaz del rápido enfriamiento de HVC de manera espacialmente restringida. Como resultado, obtuvieron que los tiempos del canto fueron fuertemente afectados por los cambios en la temperatura de HVC. A temperaturas más frías, los motivos del canto fueron más lentos que los motivos de control (figura 3.7). Las aves de ese experimento mostraron un significativo aumento de la duración del motivo durante el enfriamiento (que van de 17 a 45%;). El cambio fraccional en la duración del motivo (dilatación) se encontró que varía aproximadamente de forma lineal con la temperatura. En particular, los autores reportan que los cambios de temperatura en HVC tenían efectos mínimos o despreciables sobre la estructura acústica del canto

## 3.3.3. Nuestro modelo "interactivo"

En este apartado mostramos cómo se puede generar un modelo que posea la misma dinámica que el sistema fenomenológico descripto en la sección



**Figura 3.7:** Sonograma de un zebra finch sometido al enfriamiento bilateral de HVC. Se ve que los tiempos del canto se alargan o estiran sin modificar apreciablemente la señal acústica. En este sonograma los colores más cálidos representan una mayor intensidad en la frecuencia en el eje vertical (1-9 kHz). Debajo de los motivos del canto enfriado se muestra el canto de control estirado artificialmente. Adaptado de [Long and Fee, 2008].

anterior (sección 3.2), siendo consistente con la neuroanatomía de las aves, y en disonancia con el modelo controversial explicado en el apartado anterior. Además trabajamos con actividades promedio de los conjuntos de neuronas en los núcleos. Esto se debe principalmente a que el modelo que reproduce todos los patrones de presión en canarios, los cuales provienen de instrucciones de actividad en el cerebro, es de baja dimensión.

Para construirlo, suponemos que dos escalas no lineales de tiempo se encuentran interactuando. Comenzaremos describiendo la primera, relacionada con la actividad de HVC. Aunque se espera una variedad de escalas de tiempo presentes en la salida de HVC, nos concentramos en la escala de tiempo asociada con la repetición de sílabas, ya que el caso que queremos estudiar es el de los canarios. Para gorriones coronirrufos pantaneros (*Melospiza Georgiana*), se encontró que las neuronas que proyectan desde HVC repiten su patrón de disparos cuando una sílaba se repite [Prather et al., 2008]. Aunque esto ha sido reportado para las neuronas que proyectan hacia el área X, es probable que las neuronas que proyectan a RA desde HVC también tengan una escala de tiempo larga, asociada con la tasa de repetición silábica, lo que reflejaría la activación estereotipada en HVC cuando hay repetición de sílabas.

Por estas razones, la entrada del modelo en el telencéfalo es modelada como un simple patrón periódico (ver parte superior de la figura 3.8). Este patrón simplificado corresponde entonces a la frecuencia más baja presente en el desarrollo de Fourier de la señal que representa la actividad en HVC cuando se repiten sílabas. Modelamos las instrucciones poblacionales en promedio presentes en HVC, con un período rítmico T. La razón principal, como mencionamos antes, es debido a que el canto del canario está formado por frases en las que las sílabas se repiten hasta decenas de veces. Cada período de la instrucción del forzante periódico se define como sigue en  $t \in [-T/2, T/2]$ :

$$F(t) = A\cos\left(2\pi ft\right) N(\nu, \sigma, t) \tag{3.4}$$

donde A es la amplitud, f = 1/T es la frecuencia de la instrucción y  $N(\nu, \sigma, t)$  es la distribución normal, centrada en  $\nu = 0$ , con un ancho  $\sigma$  de 9,5% del período T.

Para modelar la segunda escala temporal, a continuación introducimos dos poblaciones de neuronas, una excitatoria y una inhibitoria, que se encuentran en los núcleos subsiguientes a los que conecta ("downstream") de HVC en los circuitos neuronales de la vía motora. Estos constituyen una arquitectura neuronal minimal capaz de generar la segunda escala de tiempo de nuestro modelo, la cuál es impulsada (forzada) por la actividad en HVC. Además, esta es la mínima cantidad de poblaciones neuronales necesarias para la existencia de un comportamiento oscilatorio: 2 [Guckenheimer and Holmes, 1997]. Una representación esquemática de este circuito se muestra en la figura 3.8. Las ecuaciones para la actividad promedio neuronal de la población excitatoria



**Figura 3.8:** Esquema de la conectividad propuesta para los componentes del circuito motor. En la parte superior, la actividad media de HVC (u.a.) se modela como una simple instrucción periódica que inerva poblaciones de neuronas en los núcleos subsiguientes a los que conecta ("downstream"), una excitatoria y una inhibitoria. La actividad de la población excitatoria se propone proporcional a la instrucción motora que genera los gestos de presión en los sacos aéreos. Para este ejemplo, con la frecuencia de entrada presente en HVC (frecuencia forzante) de 16 Hz, la salida es una frecuencia de 8 Hz, subarmónica. El rango de unidades de presión en los sacos aéreos modelada es de 0-1 en unidades arbitrarias.

x, e inhibitoria y, son las siguientes:

$$\tau \dot{x} = -x + S(\rho_x + 10x - 10y + F(t/\tau))$$
  
$$\tau \dot{x} = -x + S(\rho_y + 10x + 2y)$$
(3.5)

donde S(x) = 1/(1 + exp(-x)) es una función tipo escalón suave cuyos argumentos en las ecuaciones representan la actividad de entrada para cada población de neuronas. El parámetro  $\rho$  representa la actividad basal de entrada y  $\tau$  es una constante de escala. Los valores numéricos en la ecuación son los mismos que en [Guckenheimer and Holmes, 1997]. Los valores para  $\rho_x$  y  $\rho_y$ fueron seleccionados para que el sistema esté cerca de una bifurcación de Takens Bogdanov (como vimos en la sección previa) y tenga patrones similares a los encontrados en los canarios:  $\rho_x = -2.8$  y  $\rho_y = -10.7$  [Alonso et al., 2009]. El parámetro  $\tau = 0.0088$  fue seleccionado para que coincidan las frecuencias de nuestros patrones simulados con los medidos en los canarios.

En la figura 3.9 podemos ver un esquema del diagrama de bifurcaciones del modelo en ausencia del forzante periódico. Se encuentra el mismo tipo de esquema que en el caso del modelo abstracto en su forma normal de la sección anterior (figura 3.3). Se tiene una bifurcación tipo "cusp" correspondiente a dos curvas de bifurcación de nodo silla ("saddle node") que convergen en una cúspide. A su vez, se tiene una curva de bifurcación de Hopf. Si analizamos estáticamente al forzante periódico, lo que hace en este modelo es modificar la posición en el espacio de parámetros ( $\rho_x, \rho_y$ ) de actividad basal de entrada al núcleo excitatorio  $\rho_x$ . El sistema cambia de una zona donde hay tres puntos fijos a una donde sólo hay uno.

Con este modelo minimal podemos explorar el efecto que produce el cambio de sólo dos parámetros: la frecuencia y la amplitud del forzante (es decir, la actividad de HVC). Por ejemplo, con la frecuencia de forzante de HVC de 16 Hz (figura 3.8) la salida de nuestro modelo indica una frecuencia respiratoria de 8 Hz, que es una solución subarmónica (la mitad de la frecuencia de la señal del forzante). La aparición de soluciones subarmónicas es una signatura clara del procesamiento no lineal de la señal de entrada por la red respiratoria. Esto resulta en una escala de tiempo diferente en la salida comportamental, pero relacionada subarmónicamente debido al procesamiento interactivo.

Para finalizar esta sección, mostramos en la figura 3.10, el esquema de nuestro modelo propuesto sobre la ruta motora descendente, con tres regiones separadas, en forma análoga a la figura 3.6 del modelo "feedforward". En nuestro caso, la diversidad de patrones respiratorios no surge del orden



**Figura 3.9:** Diagrama de bifurcaciones del modelo de actividad promedio en poblaciones neuronales de las ecuaciones (3.5). Los diferentes sitios en el espacio de parámetros ( $\rho_x$ ,  $\rho_y$ ) dan cuenta de distintos comportamientos cualitativos. Las zonas numeradas muestran los distintos comportamientos en el espacio de fases (x, y) correspondientes a la actividad promedio de las poblaciones excitatoria e inhibitoria. En la zona 4 coexisten 3 puntos fijos (dos estables y uno inestable) y en la zona 5 sólo está el que consideramos como "prendido". Bifurcaciones: BT, de Takens; SNLC, saddle node en ciclo límite; SN, saddle node; H, Hopf; SSL, separatriz de lazo saddle; DAH, Andronov Hopf degenerada; NS, saddle neutro. F(t) representa la actividad forzante de HVC sobre este sistema.

detallado en las cadenas de neuronas proyectoras en HVC que disparan cada 10 ms, sino a partir de la interacción de instrucciones sencillas provenientes de HVC con la arquitectura neuronal a la que conecta a continuación ("río abajo" o "downstream") en la ruta motora. No postulamos en este trabajo


**Figura 3.10:** Posible ubicación de los distintos componentes del modelo en la ruta motora, correspondientes a las distintas escalas temporales. La actividad promedio modelada del HVC corresponde al sombreado superior y posee una escala temporal propia. El sombreado en el medio, que contiene la segunda escala temporal, se encontraría en alguno de los núcleos río abajo del HVC, o en su conectividad. El sombreado inferior corresponde al gesto fisiológico resultante de la interacción de las otras zonas. La colocación del dispositivo enfriador responde a una posible intervención en el sistema, que es ralentizar la actividad de HVC, lo cual implica una reducción de la frecuencia del forzante de nuestro modelo. El lado frío del dispositivo de enfriamiento se coloca directamente contra la duramadre sobre HVC.

una ubicación precisa de este circuito, pero sabemos que puede ser compatible con la escala de un núcleo solamente (por ejemplo el núcleo RA), o de otras arquitecturas, como la propuesta en [Trevisan et al., 2006], o el circuito integrador que describe la interacción entre los núcleos del cerebro anterior y el tronco cerebral que se describe en [Ashmore et al., 2005].

### 3.4. Predicciones para un experimento de enfriamiento

Como consecuencia de los modelos discutidos arriba, mostraremos una predicción específica que puede realizarse sobre la modificación de los patrones respiratorios de los canarios durante el canto. Habiendo repasado la forma de generar los patrones respiratorios de forma sintética y haber analizado las posibles arquitecturas neuronales que pueden dar cuenta de este sistema, resulta necesaria la realización de un experimento para decidir si la arquitectura neuronal propuesta es viable.

Proponemos realizar enfriamientos controlados del núcleo HVC (ver ubicación del dispositivo enfriador arriba a la izquierda en la figura 3.10). Un enfriamiento leve de este núcleo probablemente modifique su actividad provocando, según nuestro modelo, una disminución de su frecuencia forzante. Mientras que la respiración siga a la frecuencia del forzante en una relación de enganchado ("lockeo") 2:1 (o 1:1), la disminución de frecuencia en el forzante resultará en un simple estiramiento de los de patrones respiratorios, como se puede apreciar en la figura 3.11. Sin embargo, cuando los cambios en la frecuencia del forzante sean mayores, presumiblemente como resultado de un enfriamiento adicional, la frecuencia de la salida respiratoria cambiará dramáticamente y de forma predecible. Ocurre una bifurcación del sistema y se manifiesta en un enganchado diferente entre la frecuencia del forzante y la frecuencia de salida respiratoria. A los efectos de estas bifurcaciones sobre las sílabas los llamamos "rompimientos" [Goldin et al., 2013].

Nuestro modelo dinámico minimal predice que durante un enfriamiento inicial debe ocurrir un estiramiento de sílabas, pero que un enfriamiento adicional provoca el rompimiento de ciertos patrones respiratorios. La exploración del espacio de parámetros (f, A) para el modelo de las ecuaciones 3.4 y 3.5 muestra el comportamiento de estiramiento y rompimiento (transición de bifurcación), con una similitud morfológica y de frecuencia silábica muy marcada entre las mediciones experimentales y los patrones de presión simulados. Esto se puede apreciar en la figura 3.11.

Por lo tanto, estas simulaciones muestran que el estiramiento de sílabas y los gestos respiratorias subyacentes son consistentes con un modelo interactivo y, por lo tanto, no indican de forma inequívoca que la ac-



**Figura 3.11:** Simulaciones de gestos de presión que primero se estiran y luego se rompen. Paneles conjuntos tienen el gesto de presión simulado y la actividad forzante propuesta de HVC, reescaleada para ilustrar el comportamiento de enganchado y subarmonicidad. (A) Sílabas simuladas a 25 Hz, 20 Hz y 14 Hz de frecuencia de instrucción del forzante (con un cambio de amplitud de 3.1, 3.0 y 2.9 para mejor concordancia con los patrones experimentales). Las dos primeras columnas muestran un enganchado a la mitad de la frecuencia de la instrucción (2:1), mientras que la última muestra un enganchado 1:1. (B) Las sílabas simuladas se encuentran a 34 Hz, 31 Hz y 27 Hz de frecuencia de instrucción del forzante (amplitud de 2.44). Las dos primeras columnas se enganchan 1:1 y la última 2:1. La sola variación de la frecuencia del forzante puede explicar ambos efectos de estiramiento y "rompimiento". La línea punteada corresponde a una transición de bifurcación en el sistema.

tividad forzante telencefálica dicte todas las escalas temporales del canto [Long and Fee, 2008, Hahnloser et al., 2002]. Además, el modelo hace una fuerte predicción, en el cual un enfriamiento adicional se traducirá en una reestructuración predecible de los ritmos respiratorios. En concreto, debería ocurrir un "rompimiento" de sílabas y ser visible en la fragmentación de sílabas complejas y sus patrones respiratorios subyacentes.

### **3.5.** Extensiones de nuestro modelo

Los modelos que vimos hasta ahora, el "feedforward" y el "interactivo", tienen una diferencia marcada, y es que uno de ellos propone una sola escala temporal que comanda todo el control motor, y el otro posee dos escalas temporales separadas interactuando no linealmente. Sin embargo, comparten una característica común: proponen que la actividad motora tiene una primera etapa en HVC. Esto resulta incompatible con resultados que muestran que la actividad de neuronas individuales en HVC es prácticamente simultánea con instancias motoras relevantes que se denominan "tiempos extremos en los gestos" (GTEs) [Amador et al., 2013]. Estas instancias particulares se obtuvieron a partir de una reconstrucción de los gestos motores necesarios para producir canto a partir de la señal acústica del canto (como vimos en la sección 2.3).

Una explicación plausible que sea compatible con nuestro "modelo interactivo" posee un escenario más complejo, en donde la actividad en HVC podría ser una copia aferente de la actividad motora, en un paradigma en donde el inicio u origen de las instrucciones motoras se encuentre en otro núcleo neuronal. Un esquema más completo de la neuroanatomía del sistema motor del canto, que muestra interconexiones que retornan desde el tallo encefálico hacia el telencéfalo se puede apreciar en la figura 3.12 [Schmidt and Ashmore, 2008]. En este esquema cíclico, en donde también se distinguen los dos hemisferios cerebrales, no resulta evidente cuál es el lugar donde da comienzo la actividad neuronal que en última instancia se transformará en una actividad muscular. Resulta evidente que para tener una descripción completa de este sistema, será necesaria la incorporación de más núcleos y conectividades a los modelos descriptos anteriormente. Sin embargo, en un sistema en donde el HVC no funcione como forzante, sino como copia aferente de la actividad motora, a modo de estación de evaluación de retroalimentación o "feedback" desde el tallo encefálico, sería compatible con que modificaciones en la actividad en HVC repercutan en la actividad motora. Las variaciones de temperatura puede ser que modifiquen el nivel

de actividad del núcleo HVC, y no su frecuencia temporal. En un escenario con retroalimentación, esta disminución del nivel de activación podría traducirse en un retraso sobre las instrucciones motoras efectoras del sistema, que debe ser analizado globalmente debido a la mayor complejidad en su interconectividad.



**Figura 3.12:** Esquema del sistema del canto destacando su organización bilateral y las proyecciones bilaterales desde y hacia el telencéfalo. Se hace hincapié en dos vías que cruzan de una mitad del cerebro a la otra. La primera es la conexión de RA a través de la red respiratoria (DM y PAm) y UVa (azul). La segunda es la vía de RA hacia DMP hacia el MMAN contralateral (verde). Ambas vías convergen en el HVC contralateral. No se muestran los núcleos de la vía del cerebro anterior que son necesarios para el aprendizaje del canto y el mantenimiento. NIF Nucleus interfacialis del nidopallium. Adaptado de [Schmidt and Ashmore, 2008]

Esperamos en un futuro poder ampliar la descripción de este modelo, incluyendo el mecanismo de "feedback". Queremos remarcar que el modelo presentado con HVC como forzante, y el experimento propuesto de enfriamiento sirvieron para decidir sobre la siguiente pregunta: ¿Hay una sola escala de tiempo en el problema de generación de gestos motores en el canto de aves? Veremos la respuesta a esta pregunta luego de analizar el experimento de enfriamiento en los siguientes capítulos.

### 3.6. Resumen

En esta sección describimos en detalle cómo son los patrones respiratorios de las aves durante el canto, junto con la anatomía involucrada para la generación de los mismos. En particular nos referimos al tipo de sílabas que posee un canario dentro de su repertorio. Vimos que son de morfologías muy distintas y que poseen tasas de repetición que abarcan un rango desde los 2 hasta los 60Hz.

A continuación, describimos un modelo minimal fenomenológico que puede dar cuenta de la diversidad de gestos motores encontrados en los patrones respiratorios de los canarios. Mostramos la forma normal de un sistema con los ingredientes necesarios para reproducir el amplio repertorio del canto de los canarios. Esta forma normal requiere el cruce en el espacio de parámetros de una bifurcación de Hopf y una bifurcación "cusp". Este sistema, es el correspondiente a la bifurcación de Takens Bogdanov, la cual perturbada linealmente a través de dos parámetros dependientes del tiempo, da como resultado la síntesis de la diversidad de patrones respiratorios encontrados en los canarios.

Se explicó cómo este modelo puede hacerse compatible con la neuroanatomía de las aves. Mostramos un sistema de ecuaciones de poblaciones neuronales, cuyo comportamiento dinámico es el mismo que el sistema abstracto mencionado anteriormente. Este sistema nos permite identificar en el cerebro del ave, las posibles configuraciones de núcleos y conectividades minimales necesarias para producir las instrucciones motoras que generen los patrones respiratorios durante el canto.

Finalmente, reconocimos en el modelo un forzante periódico, que puede ser relacionado con la actividad de un núcleo específico en la ruta motora de las aves, el HVC. Dentro del modelo paradigmático "feedforward" de control motor, se cree que este núcleo comanda todos los tiempos involucrados en la generación del canto en las aves a nivel cerebral. Para contrastar la hipótesis de la generación de patrones motores con un mecanismo de baja dimensión, estudiamos el efecto que tendría la modificación de uno de los parámetros del modelo, relacionado con la frecuencia de actividad promedio del HVC. Obtuvimos una predicción específica, que corresponde al efecto de estirar los tiempos del canto, para luego "romper" las sílabas a través de bifurcaciones del sistema dinámico propuesto. Esta predicción es la que da pie al experimento principal de esta tesis, el enfriamiento del HVC en canarios durante el canto, y cuya implementación experimental será relatada en el siguiente capítulo.

### Capítulo 4

### El experimento de enfriamiento

Hasta aquí hemos repasado los aspectos más relevantes para la comprensión y la motivación de esta tesis, a partir de modelos de actividad neuronal y trabajos experimentales. Hemos mostrado las predicciones que generó nuestro modelo teórico, junto con la evidencia experimental que muestra la plausibilidad de la existencia de subarmonicidades en la generación de gestos motores en el canto de los canarios. En esta etapa, es donde se manifiesta la necesidad de hacer un desarrollo tecnológico que nos permita realizar intervenciones específicas sobre nuestro sistema experimental.

En esta sección mostramos el desarrollo realizado para la construcción de un dispositivo de enfriamiento localizado para el cerebro de canarios. Detallaremos los pasos necesarios para su construcción y colocación en las aves. Describiremos los protocolos de cirugías, entrenamientos al peso y las conexiones del dispositivo. Veremos también los métodos experimentales involucrados en la adquisición de datos del canto y de los patrones fisiológicos de presión. Finalmente describiremos el montaje experimental.

### 4.1. El dispositivo enfriador

A partir del desarrollo realizado por [Long and Fee, 2008], vislumbramos la posibilidad de utilizar un dispositivo de enfriamiento. El dispositivo completo ha sido construido para esta tesis utilizando materiales similares, pero con un nuevo diseño. Esta adaptación lo adecúa al ave experimental elegida: el canario [Goldin et al., 2013].

El funcionamiento del dispositivo enfriador está basado en el efecto termoeléctrico. Este consiste en la conversión directa de la diferencia de temperatura a voltaje eléctrico y viceversa. Un dispositivo termoeléctrico crea un voltaje cuando hay una diferencia de temperatura a cada lado del mismo. Por el contrario cuando se le aplica un voltaje, crea una diferencia de temperatura, fenómeno conocido como efecto Peltier. A escala microscópica, un gradiente de temperatura aplicado sobre un dispositivo termoeléctrico provoca que los portadores cargados en el material, sean electrones o huecos, difundan desde el lado caliente al lado frío. Por consiguiente, hay una corriente inducida termalmente. En el caso de la aplicación de corriente, los portadores de carga de diferente signo en los materiales semiconductores generan un flujo neto de calor desde una cara del dispositivo a la otra. En la figura 4.1 se puede ver un esquema del funcionamiento de una celda Peltier. Es suficiente para nuestro desarrollo, conocer a partir de la hoja de datos, que para una dada temperatura en la cara caliente de una celda Peltier y una corriente constante, hay una diferencia de temperaturas que se mantiene constante entre la cara caliente y la fría [Kraftmakher, 2005].

Una celda Peltier comercial, como la utilizada en este trabajo (TEC1-12706, HB corporation), posee 128 pares de elementos semiconductores y un tamaño de 4 cm x 4 cm. La idea de su funcionamiento se basa en el intercalado de elementos semiconductores de distinto tipo, N y P, que poseen diferentes portadores libres de carga, negativos para los N y positivos para los P. Con una sierra de diamante en una cortadora de baja velocidad, se extrajo una sección de la misma, conservando 4 elementos semiconductores,



**Figura 4.1:** Esquema del funcionamiento de una celda Peltier. Dos elementos semiconductores de tipo P y N son unidos en serie de manera que el flujo de cargas libres tiene el mismo sentido, de la cara fría a la caliente. Se genera un flujo neto de calor que se traduce en una diferencia de temperatura constante para una dada corriente y temperatura fija en el lado caliente.



**Figura 4.2:** Vista superior (arriba) y lateral (abajo) de un corte de una celda Peltier comercial. Sus dimensiones son 1cm x 1cm con 4mm de altura (0,7 g). Sólo cuatro elementos semiconductores se conservaron y una pequeña región de cerámico para el lado frío. Para el suministro de corriente se soldaron cables delgados (0,2 g).

2 N y 2 P, de manera tal de poseer un peso y tamaño adecuados para su colocación sobre la cabeza de un canario. La porción extraída, junto con los cables soldados (Alpha Wire Company, multicolor 4 cables AWG 32) para la circulación de corriente se puede apreciar en la figura 4.2.



**Figura 4.3:** Cámara de extracción para el exceso de calor. Arriba a la izquierda: cámara de agua hecha con adhesivo plástico fundido, vertido en un molde con tubos y una base de aluminio (1,0 g). Abajo a la izquierda: vista superior de la cámara en la que quedan dos aberturas para los tubos de silicona de 6 cm y 0,3 g (Dow Corning, Tubing Laboratorio Silastic NO 508-005). Arriba a la derecha: cámara con tubos y sin base. Un sellador se utiliza para prevenir fugas de agua (Akapol SA, Fastix). Abajo a la derecha: la base de la cámara es una pieza de aluminio cortada de componentes electrónicos refrigerantes comunes de tamaño de 1cm x 1 cm, altura 1,7 mm y 0,4 g de peso.

Debido al permanente flujo de calor hacia la cara caliente de la celda Peltier, el exceso del mismo debe ser extraído para evitar el cambio de temperatura de esa cara. De esta manera, para una corriente suministrada constante se garantiza una diferencia de temperatura constante con respecto a la cara fría. Para ello se construyó una cámara de extracción del calor excedente como muestra la figura 4.3. La cámara y la celda Peltier se unen mediante un pegamento epoxy (Cytec, Easypoxy K20) que es buen conductor térmico. En los extremos de los cables se sueldan conectores y en los extremos de los tubos se pegan conectores. Estos se adhieren a su vez a un trozo de velcro que sirve para sujetar todo a una mochila que tienen las aves. Allí se coloca también el sensor de presión (figura 4.4) que sirve para medir el gesto respiratorio del ave. Finalmente en la cara fría de la celda Peltier se pega un implante de bronce, niquelado y bañado en oro (figura 4.5), que se apoya directamente sobre la duramadre del animal. Su base es de 1,5mm x 6,8mm y las superficies de contacto inclinadas  $25^{\circ}$  cubren un área de 1,5mm x 2mm con una separación de 2,8mm, específicamente diseñado para apoyar bilateralmente sobre HVC en el cerebro de canarios. Un dispositivo terminado, junto con el sensor de presión se puede apreciar en la figura 4.6. En la figura 4.7 podemos apreciar un canario con el dispositivo colocado.



**Figura 4.4:** Sensor medidor de presión piezorresistivo Fujikura, modelo FHM-02PG.



**Figura 4.5:** Implante metálico bañado en oro. A la izquierda se ve una foto del implante y a la derecha sus dimensiones. Las superficies planas en diagonal se apoyan bilateralmente sobre ambos HVC. La base se pega a la cara fría de la celda Peltier.



**Figura 4.6:** Dispositivo completo (3,7 g). En el extremo de los cables soldamos un conector miniatura (0,3 g). Conectores de acuario están pegados al final de los tubos (0,4 g). El sensor de presión (Fujikura; 0,7 g) que se encuentra en la mochila tiene dos pares de conectores para la señal de presión y su alimentación. Un implante bañado en oro se une al lado frío de Peltier (0,2 g). El velcro sirve para sujetar el dispositivo a la mochila que tiene el animal.



**Figura 4.7:** Canario con el dispositivo de enfriamiento instalado. La mochila permite mayor libertad de movimiento.

# 4.2. Sujetos experimentales e instalación de dispositivos

Una vez desarrollado el dispositivo enfriador, procedimos a su colocación en los canarios. En este apartado, explicaremos el protocolo desarrollado para conseguirlo y los procedimientos realizados con las aves. Utilizamos canarios machos y adultos adquiridos de un criador local, y sólo las aves que cantaban más vigorosamente se sometieron a la implantación del dispositivo de enfriamiento y al protocolo de registro de datos como se describe a continuación. Para un total 7 aves, se recogieron un conjunto de datos completo a distintas temperaturas de HVC. Para las cirugías, las aves fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina y midazolam, y privadas de comida 40 minutos antes de cada cirugía.

Primero, pegamos un "casco" para el entrenamiento gradual al peso y la fijación futura del dispositivo de refrigeración. Se expuso el cráneo de las aves mediante una incisión de la piel, y un "casco" de cerámica (0,3 g) se pegó con cemento dental (Dentsply, TYLOK Plus), y se marcó la bifurcación medio sagital o punto cero sobre el cráneo. Las aves fueron acostumbradas a diferentes pesos, mediante el aumento de la masa del casco en 0,5 g cada dos días, hasta que se alcanzó una masa final de 2,0 g. Se colocó en la parte posterior del ave una mochila de entrenamiento (2,0 g) con los mismos conectores como los que se encuentran en el dispositivo de enfriamiento. Después de alcanzar el peso final de 2,0 g en la cabeza, las aves fueron entrenadas durante 4 horas durante al menos 2 días con tubos gruesos de silicona conectados a la mochila, procedentes de la parte superior de la jaula.

A continuación, luego de hacer dos aberturas en el cráneo (1,5 mm x 2,0 mm) en las regiones sobre HVC, se colocó el dispositivo de enfriamiento. Se ubicó el implante de oro apoyándolo directamente sobre la duramadre, y el dispositivo de refrigeración se pegó en el casco del pájaro con adhesivo plástico y adhesivo de contacto. Un dispositivo de enfriamiento completo puede verse en la figura 4.6, y el dispositivo montado en un pájaro en la figura 4.7. La distribución de masa aproximada del dispositivo es de 1,7 g en la cabeza, y 2,0 g en la mochila.

Finalmente, en una cirugía posterior, se insertó una cánula (Dow Corning, Silastic Tubing Laboratorio NO. 508-005) en el saco aéreo torácico anterior para medir la presión subsiríngea [Goller and Suthers, 1996a]. Este procedimiento consiste, explicado brevemente en la realización de una incisión en el abdomen del ave, perforando el saco aéreo e insertando luego la cánula que se sujeta a la costilla inferior mediante dos puntos con hilo de sutura. Esto se lleva a cabo por lo menos tres días después de la fijación del dispositivo de enfriamiento y después de que los pájaros retoman el canto. El extremo libre de la cánula se conecta a un transductor de presión piezorresistivo (Fujikura modelo FPM-02PG) que se monta en la mochila del ave.

### 4.3. Calibración de temperaturas

Seis dispositivos de enfriamiento diferentes se utilizaron en este experimento. Como mencionamos en la sección 4.1, un módulo Peltier funciona proporcionando una diferencia de temperatura entre sus caras, cuando se la alimentan con una corriente. Si el lado caliente se mantiene a una temperatura constante, el lado frío varía su temperatura en una relación casi lineal con la corriente aplicada, como se muestra en la figura 4.8.



**Figura 4.8:** La calibración del dispositivo de enfriamiento muestra el cambio de temperatura del cerebro como una función de la corriente aplicada al dispositivo. Las mediciones de temperatura a diferentes profundidades por debajo de HVC muestran que el enfriamiento es en gran medida local (n = 2).

Una reducción de casi  $10^{\circ}C$  prácticamente local en la temperatura para el lado frío se logra con aproximadamente 2A. La temperatura del lado



**Figura 4.9:** Calibraciones de la temperatura en la dura para los seis dispositivos de refrigeración de nuestro experimento, realizadas directamente luego de su implantación. Están incluidas calibraciones previas con los mismos dispositivos en sujetos que no cantaron. Las calibraciones se dividieron en dos grupos: los dispositivos que fueron utilizados por las aves que rompieron sílabas (N = 12) y los utilizados por las aves que sólo alargaron el canto (N = 10). Los puntos son la media y las barras de error son la desviación estándar. Se muestran ajustes lineales para cada grupo.

caliente del dispositivo se mantuvo a temperatura ambiente. Las mediciones de temperatura se realizaron utilizando una termocupla tipo J con la punta diseñada a medida, que permite medir temperaturas localmente en zonas muy pequeñas. Las calibraciones se hicieron inmediatamente después de que se colocó el dispositivo para tener en cuenta las diferencias entre los diferentes dispositivos de refrigeración, como muestra la figura 4.11. Existe una diferencia en la pendiente de descenso de la temperatura para los dos grupos de enfriadores:  $(-5,5 \pm 0,8)$  °C/A y  $(-4,4 \pm 1,1)$  °C/A. Las calibraciones se realizaron a media escala (1 A) para una mejor recuperación de las aves después de la cirugía. La instalación del dispositivo reduce la temperatura del cerebro en aproximadamente. 1 °C a 0 A, como se indica en [Long and Fee, 2008, Andalman et al., 2011], debido a la temperatura ambiente del reservorio de agua. Las temperaturas más bajas que reportamos en los siguientes capítulos se obtienen por extrapolación de cada calibración en cada animal, sin tomar en cuenta esta primera variación de la temperatura.

### 4.4. Medición del canto y patrones de presión

Las aves se introdujeron en jaulas de 21 cm x 34 cm de base y 36 cm de altura en una cámara acústica y se conectaron para la circulación de agua, el suministro de corriente y la adquisición de la señal de presión. Los canarios conectados para la medición se pueden apreciar en la figura 4.10.



**Figura 4.10:** Canarios conectados. A la izquierda se ve un canario conectado para circulación de agua, suministro de corriente y medición de patrones de presión, con la cánula insertada en el saco aéreo, y al sensor de presión en su otro extremo. A la derecha el esquema es el mismo, pero sin el sensor de presión ni la cánula.

Un micrófono (TAK-STAR SGC 568) se colocó frente de la jaula. El esquema experimental se encuentra en la figura 4.11. Las señales de sonido y presión se registraron utilizando una tarjeta de sonido multicanal (MAYA 1010, frecuencia de muestreo de 44,1 kHz) y se registró directamente en la computadora con un software personalizado programado en MATLAB. La señal de presión se pre-amplificó y moduló (multiplicación por una sinusoidal a una frecuencia constante alrededor de 2 kHz) para adaptarse a los requisitos de la tarjeta de sonido. Las grabaciones simultáneas de señales de audio y la presión se realizaron automáticamente con un software personalizado hecho en MATLAB. Sus duraciones varían entre 2 segundos y 2 minutos.



**Figura 4.11:** Esquema experimental de medición. Los canarios son conectados para flujo de agua, suministro de corriente y medición de los patrones de presión. La corriente controlada se consigue con un conversor voltaje-corriente y un generador de tensión. El gesto de preión se amplifica y adecúa para la adquisición, y junto con el canto, medido con un micrófono frente a la jaula, se ingresan a través de una placa de sonido a la PC.

Para el análisis, la señal de presión fue demodulada y muestreada a 882 Hz, es decir que la envolvente de la señal grabada, que es el patrón de presión real, se obtuvo con un filtro digital de fase cero y a continuación se retuvieron 1 de cada 50 datos de la señal. Primero se midió el canto y la presión sin enfriamiento, y luego bajamos la temperatura en 1°C cada dos minutos hasta que se alcanzó la temperatura deseada. Luego de mantener la corriente constante durante al menos dos minutos para garantizar la estabilización de la temperatura, se inició la grabación. Una vez que a una temperatura dada se recogieron datos suficientes, se procedió con un enfriamiento adicional. Puesto que el canto espontáneo de un canario es variable en su cantidad durante un experimento, grabamos el canto para entre 1 y 4 temperaturas diferentes por día. Después de cada episodio de enfriamiento, se registraron datos de control a la temperatura corporal, sin enfriamiento.

### 4.5. Resumen

En este capítulo explicamos cómo se efectúa el enfriamiento controlado de una región limitada del cerebro y la medición simultánea del canto en canarios. A partir de la adaptación de una celda peltier comercial se construyó un dispositivo enfriador de peso aproximado de 3.7 g, que pudo ser colocado exitosamente en canarios, luego de un entrenamiento previo del ave al peso. Se calibraron todos los dispositivos inmediatamente luego de colocados los enfriadores y se constató que la temperatura obtenida en la superficie del cerebro es constante y localizada, para una corriente constante de alimentación. Finalmente presentamos el montaje experimental, en donde se pueden medir simultáneamente los patrones respiratorios de las aves y el canto mientras se proporciona un enfriamiento controlado y local del núcleo bilateral HVC.

Queda así completa la descripción de nuestro experimento. Con todas estas herramientas estamos en condiciones de presentar los resultados obtenidos, donde veremos que el canto de canarios, como predice nuestro modelo interactivo en el capítulo 3, se ve modificado en características que van más allá de un simple estiramiento.

### Capítulo 5

## Estiramiento y rompimiento de sílabas

En el presente capítulo mostraremos los resultados obtenidos en el experimento de enfriamiento controlado. Los patrones de presión registrados en los canarios sufrieron modificaciones debido al enfriamiento. En una primera instancia, los tiempos del canto se alargaron, provocando un estiramiento. Sin embargo, al disminuir aún más la temperatura, algunas sílabas comenzaron a modificarse. Esta reestructuración, que llamamos "rompimiento", se vio en general en todos los pájaros a los que la temperatura de HVC fue suficientemente disminuida.

En lo que sigue describiremos algunos de los ejemplos más notorios del rompimiento de sílabas. Esto incluye sílabas que pudieron ser reconocidas a través de las distintas temperaturas medidas, y para las cuales hay información suficiente para hacer un seguimiento en función del enfriamiento. Cabe remarcar que modificaciones más sutiles, que también asociamos a rompimiento se pueden encontrar en los datos. Un fenómeno muy interesante encontrado, es que no todas las sílabas se rompen, y que no todos los rompimientos ocurren a la misma temperatura.

### 5.1. Descripción del fenómeno

Para probar las predicciones explicadas en el capítulo 3, enfriamos bilateralmente el HVC izquierdo y derecho en canarios con un dispositivo de enfriamiento como el que describimos en el capítulo 4. En 7 canarios machos adultos se registraron simultáneamente la presión subsiríngea en los sacos aéreos, y el canto a varias temperaturas de HVC. El enfriamiento dio lugar a un estiramiento de todos los patrones de presión y las sílabas de los cantos para una disminución de la temperatura de hasta 5 °C ( $\Delta T = -5$  °C). Sin embargo, si enfriamos aún más HVC, muchos patrones de presión asociados a sílabas complejas se "rompen" en segmentos más cortos.



**Figura 5.1:** Estiramiento del canto en los canarios. (A) Canto del canario #10 a temperatura normal y a (B) -4.5 °C de enfriamiento. Este canario presenta una repetición de 11 sílabas tonales, de frecuencia constante.

Un primer fenómeno esperado, fue el estiramiento de los tiempos del canto. En concordancia con los resultados encontrados en el canto de los zebra finch [Long and Fee, 2008, Andalman et al., 2011], una primera instancia de nuestro experimento presentó un estiramiento homogéneo de las longitudes de las sílabas. En la figura 5.1 mostramos los sonogramas en el caso de una sílaba "tonal", para un canario en donde no se midieron los patrones de presión. A simple vista, se puede apreciar el efecto del enfriamiento, siendo el tiempo de duración de todas las sílabas cantadas mucho mayor para la temperatura más baja.

### 5.2. Rompimiento de sílabas

Las sílabas que se muestran en la figura 5.2 ilustran cómo, con el aumento del enfriamiento, los pulsos de presión medidos en el saco aéreo y las sílabas del canto se dividen en fragmentos más cortos. Esta modificación de las sílabas es a lo que denominamos "rompimiento". En la figura 5.2.A, el segmento del canto se compone de dos sílabas largas (marcadas con x, \*) seguidas de notas "upsweep" (barrido de frecuencia ascendente) repetidas. Al disminuir la temperatura, los patrones de presión y las sílabas de este último tipo se estiran primero (segundo panel) y luego comienzan a generarse patrones más cortos. El rompimiento de diferentes sílabas ocurrió a diferentes temperaturas. Por ejemplo, la primera sílaba (x) del segmento del canto (figura 5.2.A) se "rompió" en dos mitades a una temperatura más baja que las notas upsweep, mientras que la segunda sílaba en el segmento (\*) no "rompió" dentro del rango de temperaturas explorado. Las duraciones de la sílaba sombreada son  $c_0 = 320$  ms,  $c_1 = 334$  ms,  $c_2 = 428$  ms y  $c_3 = 353$  ms. Las frecuencias silábicas van desde 3 Hz en el primer panel a 12 Hz en el último panel.

Un segundo ejemplo de un individuo diferente (figura 5.2.B) ilustra los mismos efectos para diferentes tipos de sílabas. Sílabas repetidas, cada una resultante de un pulso de presión respiratorio distinto, son seguidas por una serie de sílabas generadas por un pulso de presión respiratorio sostenido con una modulación de presión a la tasa silábica (sílaba "pulsátil"). Una vez más, después del estiramiento inicial de los pulsos de presión del saco aéreo, la sílaba pulsátil comienza a "romperse", lo que se manifiesta inicialmente como un cambio en la modulación de señal respiratoria y, a continuación, en la aparición de pulsos respiratorios individuales separados por inspiraciones cortas. Las duraciones de la sílaba sombreada son  $d_0 = 807$  ms,  $d_1 = 870$  ms,  $d_2 = 896$  ms y  $d_3 = 793$  ms. Las frecuencias de las fluctuaciones de presión,



Cap.5 Estiramiento y rompimiento de sílabas

**Figura 5.2:** Rompimientos de sílabas. Las sílabas sombreadas primero se estiran y luego se rompen (A) Reestructuraciones de sílabas observadas en el ave #31. Las temperaturas de HVC, de arriba hacia abajo son: normal, -2,6 °C, -4,7 °C y -7,5 °C. (B) Reestructuraciones silábicas observadas en el ave #37. Las temperaturas de HVC correspondientes son, de arriba hacia abajo: normal, -3,4 °C, -4,8 °C y -5,5 °C. La duración total de los segmentos del canto indican claramente el estiramiento de todos los patrones en la primera variación de temperatura (segunda fila en (A) y (B)). Diferentes sílabas se "rompen" a diferentes temperaturas (filas tercera y cuarta), y la duración total de los segmentos de canto disminuye después de producirse el rompimiento. Los paneles conjuntos en cada fila muestran el espectrograma en la parte superior y la medición de la presión subsiríngea en la parte inferior.

o silábicas, durante la espiración son 34 Hz, 31 Hz y 28 Hz para las primeras tres filas. En la cuarta fila no se ve claramente ningún patrón sostenido, pero en los segmentos con sílabas, se ve que estas se producen a 27 Hz. El segmento de canto no sombreado primero se estira y luego se rompe en la cuarta fila.

### 5.3. Evolución del rompimiento

En la figura 5.3 mostramos la reestructuración de una sílaba diferente del canario #31. A medida que disminuye la temperatura, partiendo de una temperatura normal, se atraviesa una etapa de transición y, finalmente, se obtiene un nuevo patrón "roto" regular. Este nuevo patrón se estira aún más con la disminución de la temperatura. En la temperatura de transición, donde se produce la aparición del "rompimiento", hay una mezcla de sílabas "rotas" y estiradas. Esta convivencia entre sílabas "rotas" y estiradas "intactas" se puede apreciar en el panel 4 de la figura 5.3. La duración de la primera es aproximadamente la mitad que la de las sílabas estiradas. Las sílabas "rotas" se estiran con un enfriamiento adicional (paneles 5 y 6). La duración de las sílabas sombreadas es:  $a_0 = 98 \text{ ms} (49 \text{ x} 2), a_1 = 104 \text{ ms} (52 \text{ ms} - 100 \text{ m$ x 2),  $a_2 = 112$  ms (56 x 2),  $a_3 = 187$  ms (62 x 3),  $a_4 = 136$  ms (68 x 2),  $a_5 = 140 \text{ ms} (70 \text{ x} 2)$ . Para las duraciones  $a_i$  de las sílabas, encontramos incrementos que dan lugar a la siguiente sucesión: 49-52-56-62-68-70 ms. Estas duraciones corresponden a la mitad de la duración de la sílaba para i = 0, 1y 2, un tercio de la combinación de la coexistencia sílaba larga y corta para i = 3, y una sílaba completa para i = 4 y 5. Estas duraciones representan el período de la supuesta instrucción periódica procedente de HVC (véase la función F(t) periódica en el modelo de la sección 3.3.3). Si los colocamos juntos en una regresión lineal, los resultados muestran que el estiramiento más grande es de  $45 \pm 10\%$ , y que el inicio del rompimiento se produce a  $33 \pm$ 7% de estiramiento, con respecto a la duración control a temperatura normal.

En este ejemplo, las sílabas se estiran y a continuación se rompen, pero se muestra también un rompimiento que deriva en un nuevo patrón regular, cuya escala de tiempo es coherente con un nuevo régimen de enganchado ("lockeo") luego de una etapa de transición. La comparación con los patrones de la figura 5.2 muestra que este "rompimiento" conduce a un nuevo



**Figura 5.3:** El enfriamiento induce estiramiento, deformación, y luego "rompimiento" de sílabas. Ejemplo de canto del canario #31, con las siguientes temperaturas de HVC: normal, -2,6 °C, -4,7 °C, -5,4 °C, -6,6 °C y -7,5 °C. El estiramiento se produce en los tres paneles superiores conjuntos y está acompañado por un cambio gradual en la morfología de los pulsos de presión y el sonido asociado. Los paneles conjuntos muestran el espectrograma y la presión subsiríngea en la parte inferior. La línea punteada en el cuarto panel se encuentra a las dos terceras partes de la duración de la zona sombreada. La duración total de las sílabas sombreadas  $a_i$  se indica a la derecha de cada panel conjunto, con *i* de 0 a 5. El número entre paréntesis multiplicado por 2 o 3 indica el periodo de la instrucción que posiblemente proviene de HVC.

patrón regular luego de un enfriamiento adicional. Mientras que las sílabas que se muestran en la figura 5.2 no salieron de este régimen de transición, aquí sí se llegó a una duración silábica nueva y estable. Esta duración de las nuevas sílabas es de aproximadamente la mitad de la sílaba inicial. Esto es compatible con la propuesta de enganchado ("lockeo") en una relación de tipo 2:1 entre las instrucciones provenientes de HVC y la dinámica del resto de la ruta motora. En particular, este tipo de rompimientos corresponde al pasaje de enganchado 2:1 al 1:1 a través de una bifurcación del sistema.



**Figura 5.4:** Sílaba que se rompe en mitad y cuartos de la longitud original, que es identificada con una "x" en la figura 5.2. Los paneles conjuntos muestran el sonograma (arriba, 1-7 kHz) y los gestos de presión (abajo, 0-1 u.a.). En la parte superior se presenta la sílaba a la temperatura normal y por debajo, la sílaba encontrada a -4,7 °C.

Luego del análisis en todos los pájaros del experimento, se observaron "rompimientos" de sílabas en 4 de los 7 canarios con grabaciones simultáneas de presión y sonido. Esta nueva estructura en el canto desapareció, retornando el canto normal cuando la temperatura del HVC fue devuelta a la temperatura corporal. Los 7 individuos mostraron estiramientos de sílabas de su canto. Curiosamente, en aquellos individuos en los que no se observó "rompimiento", el HVC no se enfrió más de 5°C.



**Figura 5.5:** Sílabas que se rompen en mitades y cuartos, que son las identificadas con "y" en la figura 5.2. Paneles conjuntos muestran el sonograma (arriba, 1-7 kHz) y el correspondiente gesto de presión (abajo, 0-1 u.a.). En la parte superior se muestran sílabas a temperatura normal, en el medio a -4,7 °C y en la parte inferior a -7,5 °C.

Siguiendo la descripción con otros "rompimientos" encontrados, en la figura 5.4 se muestra una sílaba comúnmente cantada por el canario #31, la misma que se encuentra marcada con una "x", según se indica en la figura 5.2. Esta sílaba presenta un patrón que pudo ser reconocido a través de las distintas temperaturas aplicadas en HVC. El rompimiento sucede al partirse la sílaba en una mitad, y la otra mitad en dos (cuartas partes de la original), y posee un ligero aumento de la longitud total.

En la figura 5.5 se muestra el rompimiento de las sílabas etiquetadas con "y" como en la figura 5.2. Estas sílabas, que se encuentran frecuentemente en el canto del canario #31 presentan un patrón que también pudo ser seguido a través de las distintas temperaturas de enfriamiento. A pesar de que pueden ser clasificadas en dos tipos (la sílaba sombreada y la previa en la figura 5.2.A son ligeramente distintas con respecto a las siguientes tres sílabas en ese canto), esta clasificación no siempre fue posible de identificar cuando se rompieron los patrones. El rompimiento es en mitades y luego en cuartos de la longitud silábica.

#### 5.4. Resumen

En este capítulo presentamos las modificaciones sufridas por el canto que encontramos en el experimento de enfriamiento. Como predijimos en la sección 3.4, y siendo compatible con lo medido en zebra finch, encontramos una primera etapa en donde el canto de los canarios solamente se estira, aumentando las duraciones de las sílabas del canto. Sin embargo, para enfriamientos mayores, encontramos "rompimientos" de algunas de las sílabas. Vimos que no todas las sílabas se rompen, y que lo hacen a distintas temperaturas.

Repasamos distintos tipos de rompimiento, de sílabas largas, pulsátiles y otras más cortas. Los tiempos de los rompimientos se relacionan con las bifurcaciones de nuestro modelo de interacción de escalas temporales. Presentamos 3 ejemplos de rompimientos en donde las duraciones de las sílabas se reducen a mitades y a cuartos de longitud. Esto es compatible con la propuesta de existencia de subarmonicidades entre las instrucciones provenientes de HVC y la dinámica del resto de la ruta motora, para la generación de los patrones de presión en canarios.

Queda mostrado de este modo, que debe existir al menos un efecto extra al simple estiramiento de todas las escalas del canto al enfriar localmente HVC. En los próximos capítulos haremos un análisis estadístico de los patrones de presión para cuantificar estos fenómenos, y volveremos al modelo para ver cómo se pueden explicar los distintos tipos de rompimiento.

### Capítulo 6

# Análisis de los patrones de presión

En este capítulo mostraremos el análisis realizado sobre los gestos de presión medidos en el experimento de enfriamiento. Como mencionamos en el capítulo 3, el canto de los canarios posee un repertorio muy variado, conteniendo aproximadamente entre 20 y 30 tipos de sílabas distintas. Sumado a esto, se encuentra la diferente forma en que los canarios concatenan y repiten estas sílabas. Basados en estudios previos, desarrollamos una clasificación sencilla de las sílabas del canto para mostrar que la reestructuración encontrada en los patrones puede ser explicada, en cierta medida, en términos de la duración y la morfología de los gestos de presión.

Primero presentamos la clasificación elegida, para luego realizar histogramas de las distribuciones de longitudes de sílabas a través de las diferentes temperaturas para todos los canarios del experimento. Luego, veremos cómo se modifican individualmente las distribuciones para el caso particular de un canario. Finalmente, presentaremos dos casos en donde las sílabas pudieron ser identificadas en todas las temperaturas medidas, correspondientes a las presentadas en la última sección del capítulo anterior.

### 6.1. Clasificación de sílabas

Como vimos en el capítulo 3, la diversidad de patrones de presión de un canario pueden ser generados a partir de la variación de dos parámetros en un modelo de baja dimensión. En particular, para nuestro modelo de dinámica neuronal, esos dos parámetros modifican únicamente la actividad que se encuentra en promedio a la salida del núcleo HVC. Las soluciones de nuestro modelo presentan distintos tipos de morfologías en las soluciones. Hay sílabas más cortas, muy similares a oscilaciones armónicas, sílabas de duración intermedia, que poseen algunas fluctuaciones en el medio de las mismas. Y finalmente, sílabas más largas, dentro de las cuales consideramos también a las pulsátiles. Notablemente, estas distintas morfologías, que también se encuentran en el canto medido de los canarios corresponden a distintos regímenes de enganchado entre el forzante en HVC y el resultado obtenido a la salida de las simulaciones. Recordando lo visto en la figura 3.11, podemos identificar estos grupos con los distintos tipos de enganchado.

Con el fin de evaluar si las observaciones cualitativas representan con precisión los efectos del enfriamiento, se cuantificaron las duraciones de sílabas para todos los cantos grabados de cada ave. Escribimos para este fin un programa en código C, que fue utilizado para reconocer sílabas individuales del canto a partir de los registros de presión. No hay hoy en día un software de reconocimiento automático de patrones de presión, aunque sí lo hay para el análisis de las series temporales acústicas. Debemos recordar, como vimos en el capítulo 2, que la información que se obtiene acústicamente no es la misma que la de las instrucciones fisiológicas, debido a la complejidad que le agrega el órgano vocal no lineal, que es la siringe.

Para reconocer las sílabas, analizamos los archivos con los datos de presión, cuya duración va de los 2 segundos a los 2 minutos. Para cada uno de los archivos medidos con canto, se calculó la media (prom), el máximo (max) y el mínimo (min) valor de la presión en cada archivo. Se encontraron todos los mínimos locales, y los que tuvieron valores superiores a un umbral de prom - 0,04(max - min), correspondieron a mínimos locales dentro de las sílabas. La respiración normal fue descartada con éxito con los siguientes dos criterios: 1) que la presión máxima entre dos mínimos consecutivos fuese inferior a 0.5prom + 0.29(max - min), 2) el total de puntos entre dos mínimos consecutivos tenga al menos el 32% o más puntos de datos por encima de la media del archivo. Por último, calculamos el área debajo de cada sílaba candidata y descartamos las que se ubicaban por debajo de un umbral, siendo que correspondían a fluctuaciones cortas debido al ruido. Los mínimos consecutivos restantes denotan el principio y el final de las sílabas. Finalmente, a partir de estos mínimos hallados, se calcularon las duraciones de cada sílaba.

Una vez encontradas todas las sílabas, se clasificaron en tres grupos usando la forma de los patrones de presión. Esta clasificación se basa en el número de mínimos locales que se encuentra entre dos inspiraciones consecutivas, que definen el inicio y el final de cada sílaba y se muestra en la figura 6.1. El primer grupo corresponde a los patrones sin mínimos locales, en color rojo, el segundo grupo a sílabas con uno o dos mínimos locales, en color verde, y el tercer grupo contiene los patrones con tres o más mínimos locales, en color azul.

#### 6.2. Estadística de duración de sílabas

Con este esquema, construimos histogramas con las duraciones de cada categoría de sílaba para evaluar la reestructuración de sus distribuciones estadísticas. En la figura 6.2 vemos la distribución de sílabas para un individuo. El estiramiento de sílabas se espera que esté asociado a desplazamientos a la derecha (mayor duración) de las distribuciones de duraciones silábicas, y que estas distribuciones no cambien de forma. Los cambios encontrados en la forma de las distribuciones pueden ser causados por la aparición de distintos tipos de sílabas, o por el "rompimiento" de los pulsos de presión, y consecuentemente las sílabas, en segmentos más cortos que son clasificados



**Figura 6.1:** Clasificación de las sílabas de los canarios en tres grupos, dependiendo del número de mínimos locales entre dos inspiraciones consecutivas, denotadas por i". En rojo se definen las sílabas que recuerdan a oscilaciones armónicas, sin mínimos. En este ejemplo hay seis sílabas separadas por cinco inspiraciones. Las sílabas que tienen uno o dos mínimos locales (círculos verdes) se distinguen de las que tienen tres o más mínimos locales (círculos azules). Tres y dos sílabas se muestran, respectivamente.

de manera diferente. Todos estos efectos se encuentran en nuestros datos, apoyando a nuestras observaciones cualitativas.

La figura figura 6.3 muestra la distribución de duraciones silábicas de cada grupo individualmente, cuando HVC es enfriado desde  $\Delta T = 0$  a  $-7, 5^{\circ}C$ . En este caso, las distribuciones de las duraciones silábicas del primer grupo (rojo) y el segundo grupo (verde) son bimodales. En estadística entendemos a estas como distribuciones de probabilidad continua con dos modos diferentes. Estos modos aparecen como picos distintos en la función de densidad de probabilidad. A medida que la temperatura disminuye, el primer modo se mueve a la derecha. El mismo efecto se observó para el segundo modo del segundo grupo (verde). Por el contrario, las sílabas que forman el segundo modo de la primera categoría (rojo) y toda la distribución de la tercera categoría (azul) aumentan la frecuencia con el aumento del enfriamiento y surgen nuevos modos con sílabas de duración más corta.

Para cuantificar estos efectos, se calculó la media y la desviación estándar de la muestra (SSD) para los rangos de longitudes silábicas fijos encontrados



**Figura 6.2:** Histogramas de duración de cada sílaba registrada para el ave #31 para diferentes temperaturas en HVC. El tamaño del intervalo ("bin") es de 2,27 ms para las sílabas rojas, 4,54 ms para las sílabas verdes y 9,07 ms para las sílabas azules. La temperatura del HVC disminuye de arriba hacia abajo El número total de sílabas analizadas para este pájaro es 27471 (15040 rojas, 5830 verdes y 6601 azules).

para cada valor de enfriamiento. Estos intervalos se seleccionaron en base al análisis de las distribuciones obtenidas sin enfriamiento. Separamos a las distribuciones bimodales de color rojo y verde por su "bin" intermedio de frecuencia más baja (línea de trazos en la figura 6.3), y para los límites de rango restantes se seleccionó una región centrada alrededor de la media con un ancho de tres SSD a cada lado. Estos valores medios presentan cambios en todo el rango de enfriamiento. Pendientes negativas indican un efecto de estiramiento y, como era de esperar, algunos rangos de duración de las sílabas


**Figura 6.3:** Histogramas individuales normalizados de diferentes tipos de sílabas. Las líneas discontinuas verticales separan regiones para el cálculo de valores estadísticos. Las distribuciones bimodales roja y verde se separan por su bin intermedio de frecuencia más baja, y para los límites restantes del rango se seleccionó una región centrada alrededor de la media con tres anchos SSD a cada lado, para el control. Las distribuciones no sólo se mueven hacia la derecha como se espera de un fenómeno de estiramiento, sino que las frecuencias relativas también cambian drásticamente debido al rompimiento de sílabas y cambios en la estructura del canto. Los círculos y cuadrados de colores se utilizan para etiquetar cada región

muestran la respuesta de estiramiento con la disminución de la temperatura (figura 6.4). Dos poblaciones de sílabas, correspondientes a dos rangos de duración silábica, presentan valores medios que aumentan a medida que disminuye la temperatura, lo que sugiere un segundo efecto debido al enfriamiento. Los porcentajes de estiramiento son subestimados por estos cálculos porque las regiones son fijas y contienen diferentes sílabas de un mismo grupo. El estiramiento no puede explicar las pendientes positivas, y éstas indican una reestructuración de algunas sílabas, de acuerdo con los "rompimientos".



**Figura 6.4:** Variaciones con la temperatura de la duración media de las distribuciones silábicas en las distintas regiones de la figura 6.3 (barras de error son ssd). Una roja (cuadrados) y una distribución en azul presentan una pendiente opuesta a la esperada por estiramiento. Las pendientes de las regresiones lineales son las siguientes en ms/°C: círculos rojos -0,86 ± 0,34, cuadrados rojos 0,3 ± 1,4, círculos verdes -0,71 ± 0,25, plazas verdes -2.1 ± 1.1 y círculos azules 7,4 ± 1.0.

En la figura 6.5 se pueden ver los histogramas de sílabas individuales de las otras tres aves que rompieron sílabas en el experimento. La mayoría de las distribuciones sólo se desplaza hacia la derecha ya que las sílabas aumentan su duración a medida que disminuye la temperatura.

En la figura 6.6 se pueden ver los histogramas de sílabas individuales de las otras tres aves que no rompieron sílabas. En este caso las distribuciones sólo se desplazan hacia la derecha ya que las sílabas aumentan su duración a medida que disminuye la temperatura.



**Figura 6.5:** Histogramas de duración de sílabas a diferentes temperaturas de HVC para tres canarios que mostraron sílabas rotas. El código de colores es el correspondiente a la figura 6.1. (A) En el canario #32 la parte derecha de la distribución verde primero se desplaza a la derecha y se vacía luego con más enfriamiento. El total de sílabas analizadas son 24760 rojo, verde 9148 y 7327 azul. (B) El canario #37 muestra una distribución bimodal azul que primero se desplaza a la derecha y luego se vacía. El total de sílabas es 3280 rojas, 1175 verdes y azules 1053. (C) En el canario #49 la parte derecha de la distribución verde primero se desplaza a la derecha y luego se vacía con un enfriamiento adicional. El total de sílabas que es 2486 rojas, verdes 2563 y 2306 azules.



100 200 300 400 500

150

Ave #50 Frecuencia normalizada 0.0°C normalizada 0.0°C normalizada 0.0<sup>0</sup>C -1.5°C Frecuencia 3.9°0 uencia 4.6°C Frect 100 125 150 17 Longitud silábica (ms) 600 100 140 40 80 120 200 400 500 700 75 175 100 200 300 Longitud silábica (ms) Longitud silábica (ms)

75 100 125 Longitud silábica (ms)

60 80 Longitud silábica (ms) 100 50

**Figura 6.6:** Histogramas de duración de sílabas a diferentes temperaturas de HVC para tres canarios que no mostraron sílabas rotas. Las distribuciones sólo se desplazan hacia la derecha ya que las sílabas sólo se hacen más largas a medida que disminuye la temperatura. (A) Canario #28. El total de sílabas que se analizan son 4161 rojas, 1033 verdes y 835 azules. (B) Canario #29. El total de sílabas analizadas son 38439 rojas, 20387 verdes y 7464 azules. El segundo modo de la distribución verde en -3, 2°C se desplaza debido a la mayor incidencia de sílabas por debajo de 125 ms. (C) Canario #50. El total de las sílabas que se analizan son 4293 rojas, 5006 verdes y azules 3906. El grupo rojo en -3, 9°C carece del primer modo de la distribución, ya que los cantos grabados no contenían sílabas de alrededor de 50 ms de longitud a esta temperatura.

600

Longitud silábica (ms)

700

### 6.3. Estadística de sílabas individuales

El estudio de los motivos de las sílabas rotas a lo largo de diferentes temperaturas de enfriamiento mostró un cambio drástico en la morfología y la duración silábica. Para su adecuado reconocimiento, cada secuencia del canto de los canarios estudiados fue etiquetada por inspección, y las diferentes sílabas se reconocieron a partir de sus frecuencias de vocalización y su posición en frases de secuencias de sílabas similares, ya que, en general, muchas sílabas sólo se estiran. Encontramos casos particulares, en los cuales pudimos reconocer las sílabas a lo largo de diferentes temperaturas y además tuvimos suficientes repeticiones para poder realizar un estudio estadístico. Estas presentaron estiramientos y rompimientos, y debido a la gran cantidad de repeticiones realizadas a distintas temperaturas, pudimos cuantificar la incidencia y características del fenómeno.

En la figura 6.7.B, se muestra un ejemplo en el que se ve que la duración de la sílaba no es constante a temperatura normal, pero que tiene una distribución centrada alrededor de 600 ms con un rango de 500 ms a 700 ms. A una variación de la temperatura de HVC de  $-4.7^{\circ}C$ , se rompe la distribución, y las sílabas clasificadas como azules tienen un nuevo modo centrado en torno a la mitad de la longitud de la original. Las sílabas clasificadas como verdes aparecen a la mitad de la duración de este nuevo modo. Las sílabas de larga duración se presentan con menos frecuencia: no encontramos sílabas superiores a 710ms para  $-4, 7^{\circ}C$ , y por encima de 300 ms para el nuevo modo de  $-7, 5^{\circ}C$ . En cuanto a la incidencia, en la figura 6.7.C se ve que el rompimiento a  $-4,7^{\circ}C$  afecta a sólo la mitad de las sílabas, y en  $-7,5^{\circ}C$ , afecta a un 83% de ellas. Además, las sílabas rotas en cuartos de longitud de la original tienen más incidencia a temperaturas más bajas, llegando a un 33 %. En la figura 6.7.D se ve que a  $-4,7^{\circ}C$  las distribuciones en cian y verde tienen un valor medio que es aproximadamente la mitad y una cuarta parte de la media presentada por la distribución azul. A  $-7.5^{\circ}C$ , sólo hay tres sílabas que se encuentran por encima de 400 ms y no se calcularon los valores estadísticos. La media de la distribución cian disminuye debido a que las sílabas con longitudes inferiores a 300 ms se producen con menor frecuencia.



**Figura 6.7:** Estadísticas sobre el rompimiento de la sílaba "x", según el patrón de la figura 5.2. (A) Paneles conjuntos son sonograma (arriba, 1-7 kHz) y gestos de presión (abajo, 0-1 u.a.). En la parte superior se presenta la sílaba a la temperatura normal y por debajo, la sílaba encontrada en  $-4, 7^{o}C$ . (B) Los histogramas muestran la evolución de la clasificación y la duración de la sílaba para distintas temperaturas, donde hubo suficiente información para calcular los estadísticos (ver código de colores en la figura 6.1). (C) Las columnas apiladas muestran el porcentaje de tipos de sílabas a las temperaturas correspondientes. En cian denotamos sílabas clasificadas como azul, pero por debajo de 400 ms de longitud. (D) Cuantificación de las medias de las distribuciones y la desviación estándar a partir de (B).

En la figura 6.8 se muestra otro conjunto de sílabas cantadas con frecuencia que presentan un patrón que pudo ser seguido a través de distintas temperaturas de HVC. A pesar de que podrían ser clasificadas en dos tipos



**Figura 6.8:** Estadísticas individuales de sílabas rotas etiquetadas con "y" como en la figura 5.2. (A) Paneles conjuntos son sonograma (arriba, 1-7 kHz) y gestos de presión (abajo, 0-1 u.a.). En la parte superior se presentan sílabas a temperatura normal, en el medio a  $-4, 7^{\circ}C$  y en la parte inferior a  $-7, 5^{\circ}C$ . (B) Histogramas que muestran la evolución de la clasificación de este sílaba y su longitud a través distintas temperaturas (véase la figura 6.1 para el código de color). (C) Las columnas apiladas muestran el porcentaje de tipos de sílabas a las temperaturas correspondientes. (D) Cuantificación de las medias de las distribuciones y la desviación estándar a partir de (B).

distintos (la sílaba sombreada y la anterior en la figura 5.2 son ligeramente diferentes con respecto a las siguientes tres sílabas), esta clasificación no siempre fue posible cuando se rompieron los patrones, y todos ellos fueron considerados para la cuantificación. En la figura 6.8.B se ve que la longitud de la sílaba no es constante a temperatura normal, pero que tiene una distribución centrada en torno a 310ms con un ancho que va hasta los 400 ms y 250 ms. A  $-4.7^{\circ}C$ , la distribución de las sílabas clasificadas como azules comienza a romperse y un nuevo modo verde aparece centrado en torno a la mitad de la longitud de las azules. Las sílabas clasificadas como rojas aparecen repartidas en la mitad de la longitud de esta nueva población verde. En la figura 6.8.C se aprecia que el rompimiento afecta a un porcentaje cada vez mayor de sílabas al disminuir la temperatura y que la clasificación en estos grupos cambia cuando se rompen. En la figura 6.8.D se encuentran los valores de las medias de las distribuciones con sus desviaciones estándar. La línea de puntos corresponde a un ajuste lineal de las medias de las sílabas azules antes que ocurra el rompimiento. Más allá de los  $-4,7^{o}C$  se realizó una extrapolación lineal, cuyos valores están marcados con círculos, para mostrar el valor esperado de la media del tipo azul si las sílabas no se hubieran roto. Las distribuciones roja y la verde tienen un valor medio que es aproximadamente la mitad y una cuarta parte de los valores extrapolados. Los valores computados de la media de la de distribución azul disminuyen debido a la disminución de sílabas con duraciones por encima de 310ms.

### 6.4. Resumen

En este capítulo realizamos un análisis estadístico de las duraciones de las sílabas de los canarios del experimento de enfriamiento. Definimos una clasificación sencilla de las sílabas teniendo en cuenta el número de mínimos locales internos en las mismas. Esta clasificación no es sencilla únicamente, sino que se basa en varios años de estudios de los gestos de presión en los canarios y, como se vió en la sección 3.3.3 y como se verá en el capítulo siguiente, se corresponden en gran parte al modo de enganchado en nuestro modelo entre las escalas de tiempo en HVC y el resto del circuito motor.

Encontramos que para los distintos tipos de sílabas, en una primera etapa de enfriamiento, las distribuciones de duración silábicas únicamente se desplazan a valores más grandes. Este fenómeno era el esperado debido al estiramiento. Sin embargo, a temperaturas más bajas, algunas distribuciones se vacían, y otras se llenan en sitios distintos, generando un desplazamiento opuesto. Esto da cuenta de que un fenómeno extra ocurre además del estiramiento.

Finalmente, mostramos los estudios para casos particulares de sílabas individuales en donde vimos que las distribuciones silábicas poseen un rango de duraciones, se vacían y aparecen nuevos modos en tiempos de aproximadamente la mitad y un cuarto de la duración de estas, al variar la temperatura de HVC. En el siguiente capítulo, retornaremos al modelo interactivo introducido en la sección 3.3.3, para ver cómo se enmarcan los fenómenos encontrados y analizados en este capítulo y el anterior.

## Capítulo 7

## Diagrama de bifurcaciones

En este capítulo retornaremos al modelo modelo propuesto en la sección 3.3.3 para realizar un análisis. Contamos ahora con los resultados experimentales del rompimiento de sílabas en el canto de los canarios. Primero presentaremos la construcción de un diagrama de bifurcaciones, en donde se representa el comportamiento de la salida del modelo (los patrones de presión), con respecto a los parámetros de entrada. Estos parámetros son los que determinan la forma de la actividad forzante propuesta para HVC. Veremos cómo interpretar este mapa en términos de la diversidad de patrones encontrados en el modelo, y cómo son las las posibles bifurcaciones que se pueden encontrar al recorrerlo, es decir, variando los parámetros. Por último relacionaremos los detalles de los resultados experimentales y modelados con las distintas características que presentaron los patrones de presión, con rompimientos en nuestro experimento y bifurcaciones en nuestras simulaciones.

## 7.1. Construcción de un mapa de enganchado entrada-salida

Como vimos en el capítulo anterior, los cambios en las distribuciones de duración silábica fueron consistentes con nuestro modelo dinámico en el que se exhiben tanto las predicciones de estiramiento de algunas sílabas y los "rompimientos" que se asocian con la reestructuración más compleja de otras. Por otra parte, los detalles identificados en los cambios de sílabas específicas que pueden seguirse a través del enfriamiento, fueron consistentes con las predicciones del modelo. Para realizar un análisis más completo, construimos un diagrama de bifurcaciones.

Para una coordenada dada (f, A) de la frecuencia de la actividad forzante de HVC del modelo (ecuaciones (3.4) y (3.5)), realizamos simulaciones de los patrones de presión para un conjunto de 121 condiciones iniciales en el rango [0:1] para x e y, y se dejó evolucionar el sistema hasta llegar a una solución estacionaria después de aproximadamente 10 períodos T. Entonces, se computó un mapa de Poincaré en diferentes múltiplos de T para encontrar los regímenes de enganchado [Guckenheimer and Holmes, 1997]. Los regímenes pulsátiles fueron identificados cuando una solución se encontraba en promedio por encima de un valor de 0,8. Para completar el diagrama, se realizaron pasos de 0,01 en A y 0, 1 en f. Se exploró una amplio rango de valores de los parámetros en donde hemos encontrado diversidad de morfologías y frecuencias en los patrones de presión simulados, que coinciden con los medidos en el experimento.

La figura 7.1 muestra una representación de la predicción de la reestructuración/bifurcación en las sílabas como una función de los cambios de frecuencia y amplitud del forzante. En nuestro modelo, la frecuencia de excitación elegida corresponde a una componente baja en el desarrollo de Fourier de la actividad de la señal del forzante, que esperamos esté presente en los casos en los que se producen sílabas repetidas. Suponemos que el patrón de presión más simple, que se ve como una señal armónica, es el resultado de un enganchado 1:1 entre las escalas de tiempo forzante y forzadas. Por lo tanto, el punto de partida de nuestro análisis asume una frecuencia del forzante igual a la tasa silábica medida (figura 7.3 a la izquierda). Para los diferentes valores de los parámetros de forzante (frecuencia y amplitud), se esperan diferentes regímenes dinámicos. En la figura 7.1, las regiones de color se llaman "lenguas de Arnold" en el lenguaje de la teoría de sistemas



#### 7.1 Construcción de un mapa de enganchado entrada-salida

**Figura 7.1:** El diagrama de bifurcaciones del modelo predice diferentes tipos de rompimientos. Cada coordenada del mapa corresponde a un par de parámetros (f, A). Estos representan la frecuencia y la amplitud del forzante en nuestro modelo. Las regiones coloreadas (y numeradas) corresponden a diferentes regímenes de enganchado entre la frecuencia del forzante y la salida del modelo. Regiones con etiquetas "p" (pulsátil) corresponden a los patrones de salida con oscilaciones montadas sobre un valor constante (espiración larga). El signo "+" se utiliza para denotar la coexistencia de soluciones. El código de colores (numeración), puede verse esquemáticamente en la figura 7.2. El enfriamiento se asocia con flechas horizontales A-C apuntando hacia la izquierda (disminución de la frecuencia), y el rompimiento de las sílabas se interpreta como bifurcaciones en el paso entre las diferentes regiones. Los ejemplos de rompimiento relacionados con las flechas se pueden ver en la figura 7.3, la figura 7.4 y la figura 7.5.

dinámicos [Guckenheimer and Holmes, 1997]. Dentro de estas "lenguas" las soluciones preservan su estructura topológica. En este paradigma, el enfriamiento del HVC corresponde a la disminución de la frecuencia del forzante, es decir, un desplazamiento horizontal hacia la izquierda en el espacio de parámetros. Esto se representa en el diagrama de bifurcaciones por medio de flechas. Hemos encontrado que los cambios inducidos por enfriamiento en la estructura de las sílabas/patrones respiratorios coinciden con las predicciones de este modelo. El código de colores (numeración) para los distintos enganchados entre el forzante modelado en HVC y el patrón respiratorio obtenido de las simulaciones se puede apreciar en la figura 7.2.



**Figura 7.2:** Código de colores correspondiente al a figura 7.1: rojo (1) corresponde a un enganchado 1:1 entre el forzante y la salida del modelo. Con verde (2) se denota un enganchado 2:1, esto significa que el patrón de salida se repite después de un tiempo igual a dos veces el período del forzante. Azul (3) indica un enganchado 3:1 (es decir, la salida se repite después de un tiempo igual a tres veces el período de forzante). Naranja representa soluciones pulsátiles (1p), que están enganchadas 1:1 con el forzante. La región de color rojo claro (1+1 p) da lugar a la coexistencia de soluciones pulsátiles y armónicas, que aparecen dependiendo de las condiciones iniciales, ambas enganchadas 1:1 al forzante. Cian (2+2p) da lugar a soluciones de enganchado 2:1. Los otros colores denotan las regiones del espacio de parámetros con las soluciones en otros regímenes de enganchado.

### 7.2. Rompimientos en el diagrama

A continuación analizamos tres resultados experimentales y de modelado de sílabas cantadas por los canarios #31 y #37 con el HVC a temperatura normal y enfriado. Las flechas horizontales correspondientes (figura 7.1 A- C) en el mapa indican el posible camino en nuestro espacio de parámetros del modelo que resulta de la disminución de la temperatura experimental de HVC. La figura 7.3 muestra una sílaba (la misma que en la figura 5.3), originalmente cantada en el régimen 2 (verde, enganchado 2:1) que termina en la región 1 (rojo, enganchado 1:1). La flecha del camino recorrido en el espacio de parámetros es la etiquetada con la letra A en la figura 7.1.



**Figura 7.3:** Rompimiento correspondiente a la flecha A del diagrama de bifurcaciones de la figura 7.1. Sílaba (igual que la figura 5.3, canario #31) cantada originalmente en el régimen 2:1 (color verde) a 10 Hz (f = 20 Hz) que termina en la región 1 (color rojo) a 13,5 Hz, con A = 3,15 (au). La presión modelada tiene en la parte superior un patrón reescaleado de la actividad de HVC para visualizar el régimen de enganchado. La presión es 0-1 en unidades arbitrarias.

En la figura 7.4 se ve una sílaba que se encontró en un régimen 1p (naranja, enganchado 1:1 sobre una espiración prolongada) que cruza la frontera de la región 2 (color verde). En este caso, a la temperatura más fría, encontramos un patrón experimental con un régimen de enganchado 3 (azul, enganchado 3:1). La flecha correspondiente es la que tiene la letra B en la figura 7.1. Por último, la figura 7.5 tiene una sílaba de la región de 1p (el mismo que en la figura 5.3.B) que cruza a la región 2+2p (coexistencia de enganchado 2:1, y 2:1 con una espiración constante). La falta de una estructura repetitiva en este patrón roto se explica por la coexistencia de soluciones en nuestro modelo. La flecha correspondiente es la etiquetada con la letra C en la figura 7.1.



**Figura 7.4:** Rompimiento correspondiente a la flecha B del diagrama de bifurcaciones de la figura 7.1. Sílaba en régimen 1p (de color naranja) a 30Hz del canario #37 cruza la frontera para terminar en la región 2 (color verde) a 9,7 Hz (f = 19.4Hz), con A = 2,25. En este caso, a la temperatura más fría, hay un patrón experimental que coincide con un régimen de enganchado 3 (de color azul), que está muy próximo, a f = 17,2 Hz y A = 2,0 (u.a.).

Los tres ejemplos anteriores, presentan pasajes de fronteras entre las regiones, que se identifican con cambios de colores en el diagrama al modificarse los parámetros. Estos pasos representan diferentes bifurcaciones del modelo que pueden ser utilizados para interpretar el experimento de enfriamiento y muestran su capacidad predictiva para un amplio rango de parámetros. Los resultados cuantitativos analizados en el capítulo anterior son consistentes con las observaciones cualitativas de que sílabas pertenecientes al grupo 3 (según la clasificación del capítulo 6, figura 6.1) tienen más probabilidades de verse afectadas por "rompimientos". Debemos notar que esto es sólo una condición necesaria: las sílabas que se rompen no sólo deben ser subarmónicos sino que también deben estar cerca de los límites de una lengua de Arnold. Por ejemplo, las sílabas largas con modulación de presión respiratoria sostenida (patrón pulsátil de la figura 5.2.B) se rompen en pulsos de presión espiratorios más cortos y son clasificados entonces como diferentes elementos de menor duración dentro de los grupos 1 a 3, de tal manera que ya no se producen los elementos más largos del grupo 3. Típicamente, las sílabas de



**Figura 7.5:** Rompimiento correspondiente a la flecha C del diagrama de bifurcaciones de la figura 7.1. Las sílabas de la región 1p (la misma que la figura 5.2B, canario #37) pasan a la región 2+2 p (coexistencia de periodo 2 y periodo 2 por encima de una espiración constante). El patrón a temperatura fría demuestra la falta de una estructura repetitiva que se puede explicar con la coexistencia de las soluciones de nuestro modelo. Se utilizaron dos condiciones iniciales diferentes que se modificaron en el medio de la simulación, lo que resultó en un gran parecido con el patrón reescaleado de la actividad de HVC para visualizar el régimen de enganchado. La presión es 0-1 en unidades arbitrarias.

las categorías más altas tienden a romperse a temperaturas más altas que las sílabas pertenecientes a la categoría 1 (rojo), que suelen ser muy similares a oscilaciones armónicas [Alonso et al., 2009, Alliende et al., 2010]. Por lo tanto, rompimientos de esta naturaleza conducen a dos efectos para el análisis cuantitativo, (1) que aumenta la aparición de los grupos uno y dos, y (2) que resulta en un acortamiento de la duración media para el grupo tres.

### 7.3. Resumen

En este capítulo retornamos al estudio del modelo propuesto en el capítulo 3, esta vez ya con los resultados experimentales analizados cualitativa y cuantitativamente. Para hacerlo, construimos un diagrama de bifurcaciones del modelo en un rango amplio de parámetros en donde se pudieron ubicar las sílabas experimentales cantadas por los canarios. Este mapa da cuenta del enganchado entrada/salida de nuestro modelo, relacionando la actividad HVC/patrones-respiratorios durante el canto. Vimos que son posibles de encontrar en el modelo distintos tipos de enganchado ("lockeo").

A continuación, interpretamos el fenómeno de enfriamiento experimental como una reducción en la frecuencia de la actividad modelada de HVC. En consecuencia, un camino horizontal hacia la izquierda en el diagrama de bifurcaciones representa en su inicio y final, la temperatura normal y la temperatura fría en el experimento. Los rompimientos son interpretados como el pasaje de una región de enganchado a otra debido a este camino generado por el enfriamiento.

Luego, analizamos distintos rompimientos de sílabas experimentales, que pudieron ser relacionadas con distintos tipos de cambio de región en el diagrama de bifurcaciones. Encontramos cambios entre enganchados 2:1 a 1:1, entre 1:1 pulsátil a 2:1, y también interpretamos la falta de la regularidad en otro rompimiento como la coexistencia de soluciones en algunas zonas del mapa, a donde el enfriamiento situó al canto de los canarios.

## Capítulo 8

# Evidencia y control de bifurcaciones que ocurren naturalmente

Continuando con el estudio de patrones de presión en canarios, encontramos evidencia de que algunas transiciones ubicuas entre sílabas pueden ser interpretadas como bifurcaciones del sistema dinámico de baja dimensión propuesto en esta tesis. Interpretamos estos resultados como evidencia complementaria a nuestro "modelo interactivo" en el que diferentes escalas de tiempo interactúan no linealmente, y se se suman a la serie de evidencias teóricas descriptas en el capítulo 3 y los resultados de "rompimiento" de sílabas vistos en los capítulos anteriores.

Mostraremos las bifurcaciones encontradas, que pueden tener diferentes orígenes: debido a una modificación de la amplitud o debido a una modificación de la frecuencia de la actividad forzante a la entrada del modelo. Utilizaremos la manipulación local de la temperatura en HVC para inducir cambios en una de estas bifurcaciones. Finalmente, ampliaremos el mapa de bifurcaciones del modelo con los caminos en el espacio de parámetros que las aves pueden utilizar para generar los gestos motores estudiados.

### 8.1. Bifurcación en amplitud

Como vimos en los capítulos 3 y 6, los gestos de presión utilizados para generar las sílabas acústicas pueden ser descriptos y clasificados a través de su morfología. Los diferentes elementos son reconocidos como la serie temporal entre dos inspiraciones consecutivas, donde la presión del saco aéreo es negativa con respecto a la presión ambiente. Además, vimos que la diversidad de patrones de presión obtenidos del sistema no lineal propuesto en la sección 3.3.3 y analizado en profundidad en el capítulo anterior, son soluciones subarmónicas de la actividad que se encuentra en HVC. Identificamos dos escalas de tiempo separadas que interactúan en forma no lineal en la vía motora del canto de los pájaros apoyando el esquema de clasificación que proviene de los diferentes regímenes de enganchado entre la señal forzante modelada y la salida de sistema [Goldin et al., 2013]. Las relaciones que se encuentran principalmente son 1:1, 2:1 y 1:1 sobre un valor constante (espiración prolongada), que llamamos p1, p2 y pulsátil respectivamente. Recordemos que en general, las p1 son sílabas que recuerdan a las oscilaciones sinusoidales, las  $p^2$  tienen uno o dos mínimos locales durante la espiración, y las *pulsátiles* parecen sinusoidales sobre una constante. Toda esta diversidad se pudo obtener en el modelo cambiando sólo dos parámetros de la señal del forzante. Más allá de la observación dinámica de la posibilidad de dos escalas de tiempo interactuando no linealmente, la diversidad como una secuencia de elementos distintos se puede entender bajo un paradigma de bifurcaciones [Goldin and Mindlin, 2013]. En los resultados que siguen presentamos gestos de presión que pueden derivarse de bifurcaciones que ocurren naturalmente, y son ejemplos representativos de comportamientos ubicuos en el canto de canarios.

En la la figura 8.1 se muestran tres ejemplos de un segmento del canto de un canario con una primera parte del patrón de presión con sílabas tipo p2, seguido por sílabas simples tipo p1. Por el contrario, cuando se examina el sonograma, se ve un único tipo de sílaba que varía levemente a través de las distintas repeticiones. Dentro de esta clasificación, nos encontramos con que



**Figura 8.1:** Patrones de presión en los que ocurre naturalmente una bifurcación en el parámetro de amplitud. (A) - (C) Tres ejemplos de sílabas cantadas por el canario #20 donde se puede ver una transición natural entre una sílaba de período 2 (p2, sombreada en gris) a una de período de 1 (p1, blanco). Los paneles superiores experimentales muestran el sonograma, y los de simulación la actividad media del forzante del modelo (u.a.). Los paneles inferiores muestran los patrones de presión en u.a. Una vocalización casi idéntica aparece dos veces en cada período respiratorio del patrón p2. Las sílabas modeladas pasan por una bifurcación de período de 2 cuando la amplitud cambia con un aumento lineal (7/s) desde A = 2,5 en un régimen de enganchado 2:1, hasta A = 3,7 en un régimen 1:1.

dos vocalizaciones casi idénticas acústicamente se producen dos veces en un patrón de presión p2. A partir de estudios experimentales y el modelado de la biomecánica de la siringe (capítulo 2) sabemos que la tensión en los músculos de la siringe está fuertemente relacionada con la frecuencia de la vocalización, lo que sugiere que el principal cambio en este patrón está en el gesto de presión [Mindlin and Laje, 2005]. La longitud silábica permanece constante antes y después de la transición y el patrón p2 dura el doble de tiempo que el p1 (figura 8.2). Esta observación apoya un punto de vista en donde el cambio se debe a una modificación suave en algunas de las instrucciones fisiológicas que controlan la respiración, lo que lleva a reducir el período a la mitad en la evolución temporal del patrón de presión.



**Figura 8.2:** Duración de las sílabas de la figura 8.1 en función del tiempo alineadas a la primer sílaba de periodo 1. Los ajustes lineales antes y después de la transición muestran una frecuencia silábica constante (f = 1/periodo) antes y después de la transición, con pendiente 0 y una ordenada al origen reducida a la mitad. Los símbolos pintados y la línea llena son los datos experimentales y los símbolos abiertos y la línea de puntos son para los datos modelados. Las ordenadas al origen antes de la transición son de  $(76 \pm 11)ms$  y  $(76 \pm 4)ms$  para el experimento y el modelo respectivamente, y  $(39 \pm 1)ms$  después de la transición para ambos.

Simulamos los patrones de presión descriptos arriba con una frecuencia fija de 25.8Hz en el espacio de parámetros, que se obtiene a partir de los datos experimentales. Se utilizó una amplitud donde encontramos la mayor similitud entre el experimento y la simulación, en un régimen de enganchado 2:1, A = 2, 5 en u.a. (figura 8.1, paneles inferiores). A continuación, variamos sólo la amplitud con un aumento lineal hasta alcanzar A = 3.7 en donde el resultado está en una relación 1:1 de enganchado con el forzante. Ajustamos los tiempos de prendido y apagado de la rampa en función de la cantidad de sílabas encontradas antes de la transición de cada canto. Como resultado, se halló una marcada similitud morfológica entre el experimento y la simulación. Postulamos que el origen de esta transición en los patrones de presión es debido a una bifurcación que ocurre naturalmente en el parámetro de la amplitud del forzante en el modelo. Los ajustes lineales del período de las sílabas experimentales y simuladas en el tiempo muestran sus valores reducidos a la mitad y muestran buena concordancia entre el experimento y la simulación (figura 8.2). Una pendiente de 0 muestra que la frecuencia silábica no varía en la transición y, aunque el cambio en la amplitud del forzante no se puede medir directamente, se podría interpretar como la cantidad de la neuronas proyectoras a RA activas en HVC, o como el grado de sincronía entre ellas.

### 8.2. Bifurcación en frecuencia

Una transición silábica distinta fue hallada en otra ave, la cual consiste en un régimen *pulsátil* que se transforma en un patrón tipo p2 (figura 8.3, paneles superiores). En este caso también dos sílabas acústicas idénticas se producen en cada gesto de presión del tipo p2, y el cambio entre la sílaba *pulsátil* y la sílaba p2 es suave, habiendo un ligero aumento en la frecuencia de vocalización. El periodo de la presión aumenta, con tasas de repetición silábica que van de 33Hz a 22Hz, a lo largo de las oscilaciones del patrón *pulsátil* antes de la transición, y se mantiene casi constante en el régimen p2. La longitud silábica del patrón oscilatorio es aproximadamente el doble después de la transición (figura 8.3.B, panel superior). Nuevamente, esta observación se puede considerar como una modificación suave, en este caso de la frecuencia de las instrucciones fisiológicas que controlan la respiración, lo



que lleva a una duplicación de período en el gesto de presión.

**Figura 8.3:** Bifurcación que ocurre naturalmente en el parámetro de frecuencia se puede manipular con la variación de temperatura en el HVC. (A) Tres ejemplos de cantos experimentales en el pájaro #37 con sílabas pulsátiles (sombreada en gris), seguidas por sílabas de período 2 (p2, blanco), para distintas variaciones de temperatura en HVC: normal,  $-3, 4^{o}C$  y  $-5,5^{o}C$ . Cuando se disminuye la temperatura, el tiempo del cambio de régimen se desplaza a la izquierda. (B) Períodos silábicos en función del tiempo alineados con la primera sílaba p2. El período aumenta con la disminución de la temperatura, lo cual muestra el efecto de reducción de la frecuencia silábica con enfriamiento. Hay además un aumento paulatino de origen natural del periodo antes de la transición.

### 8.3. Manipulación de la bifurcación

El ave recién descripta, con la transición pulsátil - p2, se sometió al protocolo de enfriamiento descripto en el capítulo 4. Enfriamos bilateralmente el HVC, y obtuvimos siete temperaturas locales diferentes, mientras que el ave producía el segmento de canto descripto anteriormente. En la figura 8.3.A,



**Figura 8.4:** La duración total de las sílabas pulsátiles disminuye con la variación de temperatura en HVC, lo que muestra un segundo efecto del enfriamiento: la transición entre sílabas ocurre más temprano en el tiempo. El ajuste lineal tiene una pendiente de  $(35 \pm 6)ms/^{o}C$ . La cantidad de cantos analizados es de 71 a través de todas las temperaturas.

los paneles segundo y tercero muestran el canto a  $\Delta T = -3, 4^{\circ}C$  y  $-5,5^{\circ}C$ . La duración del segmento *pulsátil* disminuye, y en la temperatura más baja aparece un régimen 3:1 antes de pasar al p2. El período del gesto de presión aumenta para ambos tipos de patrones con temperaturas decrecientes (figura 8.3.B, segunda y tercer fila). Como se describe en los capítulos 4 y 5, y en [Long and Fee, 2008, Goldin et al., 2013], el enfriamiento tiene el efecto de estirar todas las escalas de tiempo del canto, lo que implica que todas las frecuencias silábicas disminuyen. Además de esto, encontramos en nuestros datos un acortamiento de la duración total de las sílabas *pulsátiles*, que se cuantifica en la figura 8.4. El tiempo hasta llegar a la transición puede variar, posiblemente debido a las fluctuaciones fisiológicas estadísticas en las instrucciones en cada repetición del canto (ver figura 8.1.A-C), pero por sobre esta fluctuación vemos una clara tendencia de acortamiento en todas las repeticiones grabadas de las sílabas *pulsátiles*. Esto puede explicarse postulando que se trata de una transición que ocurre naturalmente en la frecuencia que se manipuló con el enfriamiento, induciendo la llegada temprana al umbral de la transición de frecuencia silábica. Aunque no podemos descartar un cambio de amplitud en el forzante, es suficiente para explicar el efecto solamente una variación de la frecuencia.

### 8.4. Diagrama de bifurcaciones

Los resultados presentados arriba son evidencia que apoya firmemente nuestra hipótesis, en donde la diversidad de patrones complejos surgen de instrucciones sencillas. Los cambios suaves en la amplitud y la frecuencia de estas instrucciones forzantes dieron como resultado las bifurcaciones en los patrones de presión. Con el fin de tener una amplia visualización de estos resultados, se construyó un mapa de bifurcaciones que se muestra en la figura 8.5.A, para el forzante de la ecuación (3.4), esta vez con un ancho de la gaussiana de siqma = 11, 1% del periodo T. Diferentes regímenes de enganchado se indican con diferentes colores, y las flechas continuas representan el camino utilizado en la simulación de los patrones mostrados en la figura 8.1 y la figura 8.3. Las bifurcaciones ocurren de forma natural cuando hay un cambio de región a lo largo de la trayectoria. La reducción del periodo a la mitad de su valor se produce variando el parámetro de amplitud cuando, siguiendo la flecha vertical que proviene de un régimen de enganchado 2:1 (verde), termina en uno 1:1 (rojo), que es el camino utilizado en figura 8.1. La duplicación de periodo se produce variando el parámetro de frecuencia cuando se sigue la flecha horizontal desde un régimen de enganchado pulsátil 1:1 (naranja) que termina en uno 2:1 (verde), que es un posible camino utilizado para generar los patrones de la figura 8.3 (la figura 8.5.B muestra la simulación). La manipulación de las frecuencias en el camino horizontal se representa por la flecha a trazos. El enfriamiento de HVC, que se supone está relacionado con la escala de tiempo del forzante del sistema, reduce la frecuencia de su actividad, desplazando el parámetro de la frecuencia hacia la izquierda. Por lo tanto, el segundo tipo de régimen de enganchado se alcanza antes en un camino con enfriamiento.

Un segundo forzante que hemos explorado es uno con un ancho fijo de  $2\sigma = 8.6ms$ , para todas las frecuencias f. Un solo pulso de la actividad es:

$$F(t) = 2AN(\nu, \sigma, t) - A \tag{8.1}$$

donde  $N(\nu, \sigma, t)$  es un la distribución normal centrada en  $\nu = 0$  y que se repi-



Figura 8.5: Diagrama de bifurcaciones para el modelo de generación de gestos de presión en canarios. (A) Los distintos colores representan los regímenes de enganchado entre la frecuencia del forzante y el patrón de presión de salida del modelo. Las flechas llenas vertical y horizontal corresponden al camino postulado en el espacio de parámetros que se usa para la generación de las sílabas de la figura 8.1 y la figura 8.3, respectivamente. El enfriamiento de HVC induce a la disminución de la frecuencia forzante, llevando hacia la izquierda los valores de los parámetros. La flecha punteada muestra este efecto: la longitud de la sílaba pulsátil es más corta, ya que la región verde se alcanza antes. Las bifurcaciones ocurren cuando se sigue una flecha y se cambia a una región de enganchado diferente. Las relaciones de enganchado son, rojo 1:1, verde 2:1, naranja 1:1 por encima de una constante, cian 2:1 por encima de una constante, gris 4:1. (B) Patrón de presión modelado a lo largo del camino dado por la flecha horizontal llena en (A). Partiendo de 33Hz y 2,25 en amplitud, se aplica una reducción lineal de 7Hz/sen la actividad forzante (panel superior en u.a.), finalizando en 22Hz, igual que el gesto experimental de la figura 8.3. (C) Esquema modificado mediante un forzante con deltas de duración constante (ecuación (8.1)). Aquí también encontramos enganchados en regímenes 3:1 y 6:1 en azul y en blanco.

te cada T. La multiplicación por 2A y la posterior sustracción de A modifica sólo el ancho del pulso y su amplitud, no realizando variaciones cualitativas con respecto a la que dio la multiplicación sinusoidal en la ecuación (3.4). Este segundo tipo de forzante permite evitar el angostamiento, no compatible fisiológicamente, de los pulsos a frecuencias más altas, y a su vez conserva la característica más importante del forzante, su componente de baja frecuencia f. También representa un avance razonable en el modelado de la actividad cerebral como breves ráfagas de actividad neuronal en el HVC, que duran alrededor de 10 ms y que están en estrecha relación con eventos importantes de los gestos motores [Amador et al., 2013]. También resulta compatible con las observaciones realizadas en zebra finch de baja actividad neuronal en HVC [Fee et al., 2004]. Este tipo de modelado en la actividad permitiría generar gestos motores tanto para canarios como para zebra finch, en donde los pulsos de actividad representarían las señales de la actividad de las neuronas proyectoras de este núcleo. De esta manera, uno puede independizarse de la variable de frecuencia en los modelos. En el caso de sílabas que se repiten, como en los canarios, basta proponer un pulso de actividad situado en cada sílaba. En la figura 8.5.C, se muestra cómo el mapa se modifica con un forzante como el de la ecuación (8.1). El reordenamiento de las regiones retiene las principales bifurcaciones del mapa.

Estos mapas ayudan a la visualización de los regímenes de enganchado y las bifurcaciones presentes en el modelo. Presentan una visión sencilla de cómo la interacción no lineal entre las diferentes escalas de tiempo en un sistema con instrucciones simples da lugar a la diversidad.

### 8.5. Resumen

Se midieron los gestos de presión en canarios y el canto que se genera con ellos, encontrando que las transiciones entre los diferentes patrones de presión se pueden explicar con la ayuda de un paradigma de bifurcaciones. Esto significa que la diversidad en el comportamiento de salida en este sistema motor puede ser explicada en términos de cambios suaves en las instrucciones que controlan el comportamiento fisiológico.

Se utilizó el modelo de baja dimensión de la ecuación (3.5), que permi-

te reproducir los tiempos y el cambio de los patrones medidos modificando sólo dos parámetros. El modelo ayudó en la identificación de dos mecanismos diferentes que dan lugar a una bifurcación de duplicación de periodo, la modificación de la amplitud y de la frecuencia de las instrucciones del forzante del modelo. Estos se interpretan como los parámetros que describen la actividad media a la salida del núcleo telencefálico HVC.

Utilizamos la técnica de enfriamiento para manipular la actividad de HVC, y por lo tanto modificamos una característica de sus instrucciones, su frecuencia . Con esta herramienta, se obtuvo un cambio en la transición entre los gestos de presión de una manera que es compatible con las bifurcaciones observadas que ocurren naturalmente, y el modelo presentado para explicarlas.

## Capítulo 9

## Conclusiones

En este trabajo presentamos evidencia de que los patrones motores complejos que subyacen la producción del canto de aves son consistentes con la interacción no lineal entre las escalas de tiempo de los diferentes componentes de la red de control del motor. Nuestro modelo minimal predice que un pequeño cambio en la frecuencia de una instrucción promedio procedente de HVC puede provocar un cambio drástico en el patrón temporal de las sílabas resultantes y, por lo tanto, facilita un mecanismo de control en donde se pueden dar como resultado ritmos complejos en los patrones de salida, a partir de unas instrucciones neuronales sencillas que interactúan con la arquitectura neuronal subsiguiente en la conectividad ("río abajo" o "downstream").

Se logró construir un dispositivo de enfriamiento especialmente diseñado para el experimento propuesto en esta tesis y se obtuvieron enfriamientos bilaterales controlados en el núcleo HVC de los canarios. Llevamos a cabo mediciones simultáneas del sonido vocalizado y de los gestos presión dentro de los sacos aéreos mientras las aves cantaban durante el enfriamiento. La manipulación de la escala de tiempo telencefálica manifestada en HVC a través de enfriamientos locales resultaron en los efectos previstos de estiramiento inicial y luego "rompimiento" de sílabas. Estos patrones de "rompimiento" pueden interpretarse en términos de las bifurcaciones del modelo. El mapa de bifurcaciones de nuestro modelo muestra su poder predictivo para una amplia gama de parámetros. Se encontraron cualitativamente diferentes tipos de "rompimiento" de sílabas que coinciden con los caminos horizontales en este mapa. Además, los resultados cuantitativos de las diferentes sílabas se corresponden con las explicaciones derivadas del modelo. Los cruces de fronteras entre regiones cambian la clasificación de las sílabas.

Una escala de tiempo adicional a la presente en el HVC es necesaria para explicar nuestros resultados. En un paradigma de interacción no lineal, el primer fenómeno es el estiramiento en el tiempo, manteniendo una relación específica de enganchado entre las escalas de tiempo que interactúan. Por lo tanto, el estiramiento del canto en el zebra finch [Long and Fee, 2008] puede interpretarse como un efecto de enganchado no lineal, en lugar verse como el resultado de una vinculación unívoca entre las ráfagas de actividad en HVC con breves segmentos del canto [Long and Fee, 2008, Andalman et al., 2011, Schmidt and Ashmore, 2008, Schmidt et al., 2004]. Esto desafía la opinión ampliamente aceptada, según la cual los disparos de actividad neuronal en HVC determinan el único tiempo en el sistema de canto de pájaros [Long and Fee, 2008, Fee et al., 2004]. A partir de la combinación de los resultados de este estudio y los obtenidos en zebra finch, es más parsimonioso postular un mecanismo interactivo en todas las aves canoras. Nosotros no proponemos una ubicación específica de la segunda escala de tiempo necesaria para explicar la forma y el ritmo de los patrones de presión medidos y su rompimiento. Una implementación matemática de un modelo minimal capaz de reproducir los patrones observados consiste en una población excitatoria y una inhibitoria, e incluso en la escala de un núcleo esta estructura es posible (por ejemplo, en el núcleo RA). Otras arquitecturas proporcionan un sustrato plausible para la aparición de esta segunda frecuencia, como la propuesta en [Trevisan et al., 2006], o el circuito integrador que describe la interacción entre los núcleos del cerebro anterior y el tallo cerebral que se describe en [Ashmore et al., 2005, Ashmore, 2008]. Los resultados reportados para los zebra finch representan los cambios esperados de enfriamiento inicial, pero podría ocurrir que no se hayan alcanzado las temperaturas de "rompimiento" en esos estudios. El modelo interactivo que aquí se propone puede representar un mecanismo más general que permite la generación de patrones motores altamente complejos con relativamente instrucciones telencefálicas sencillas.

Si este modelo alternativo e interactivo de cómo diferentes escalas de tiempo se pueden generar en el patrón respiratorio de los pájaros es correcto, se requiere un replanteamiento de la función específica del HVC en el control motor del canto. En este modelo están presentes, al menos, dos escalas de tiempo interactuando no linealmente en el tiempo y separadas en el espacio. Los ritmos resultantes cualitativamente diferentes dan lugar a diferentes patrones respiratorios del canto. Es importante destacar que este modelo es totalmente compatible con los patrones de disparo observados las neuronas que proyectan al núcleo RA [Hahnloser et al., 2002, Fee et al., 2004] y los resultados de los experimentos de enfriamiento en los zebra finch [Long and Fee, 2008, Andalman et al., 2011].

El control motor del canto requiere la integración de los músculos respiratorios y los músculos de los dos generadores de sonido controlados independientemente del órgano vocal aviar, la siringe. El control de la siringe contribuye a las escalas de tiempo más cortas de las características del canto (por ejemplo, aparición de vibraciones, cambios rápidos de frecuencia y modulación de amplitud, etc.), mientras que la tasa de repetición silábica y la modulación de amplitud más lentas pueden surgir de la modulación de la presión respiratoria [Zeigler and Marler, 2008, Goller and Suthers, 1996a, Mindlin and Laje, 2005. No se sabe si los patrones de salida específicos de HVC a las zonas de proyección respiratorias y siríngeas difieren dentro del RA o si el siguiente circuito en la conectividad ("río abajo" o "downstream") genera los patrones de control específicos respiratorios y siríngeos para las señales de HVC. Una propuesta reciente en la cual las neuronas que proyectan a RA en los zebra finch se relacionan específicamente a los estados de transición (acústicos y respiratorios) [Amador et al., 2013] apoya el trabajo teórico que propone un mecanismo interactivo y no lineal para el control motor de la siringe [Trevisan and Mindlin, 2007]. Aunque se necesita más trabajo experimental y teórico para iluminar los mecanismos de control motor de la siringe, estos estudios también cuestionan la idea de que HVC controla directamente todas las escalas de tiempo del canto.

Una amplia gama de mecanismos se especula pueden determinar el origen dinámico de los gestos de presión, que van desde el control total de cada escala de tiempo en el telencéfalo [Fee et al., 2004, Long and Fee, 2008] a otros más integrativos [Méndez et al., 2012, Schmidt et al., 2011, Ashmore, 2008]. En esta perspectiva, vimos que la diversidad de gestos se puede generar como respuestas subarmónicas de dos escalas de tiempo que interactúan no linealmente [Goldin et al., 2013]. Mostramos que los patrones estudiados pueden ser reproducidos en este paradigma y que los cambios descriptos pueden ser interpretados como bifurcaciones en el modelo. Esto abre la posibilidad de interpretar cambios comportamentales significativos con mínimas modificaciones en la fisiología.

Por último, nuestros resultados ayudan a construir confianza en un punto de vista que considera la actividad motora generada por el sistema del canto como el resultado de al menos dos escalas de tiempo no lineales que interactúan. Las bifurcaciones paradigmáticas encontradas representan una signatura característica de la dinámica no lineal que se encuentra implícita en el sistema. Esto podría tener amplias implicaciones en el estudio de comportamientos biológicos complejos, en particular la actividad cerebral, y sugiere que la diversidad puede surgir a través de cambios suaves en instrucciones muy sencillas.

## Bibliografía

- [Abarbanel et al., 2004] Abarbanel, H. D. I., Gibb, L., Mindlin, G. B., and Talathi, S. (2004). Respiratory patterns in oscine birds during normal respiration and song production. J. Neurophysiol., 92:96–110. 42
- [Ahrens and Kleinfeld, 2004] Ahrens, K. F. and Kleinfeld, D. (2004). Current flow in vibrissa motor cortex can phase-lock with exploratory rhythmic whisking in rat. J Neurophysiol, 92:1700–1707. 4
- [Alliende et al., 2010] Alliende, J. A., Méndez, J. M., Goller, F., and Mindlin, G. B. (2010). Hormonal acceleration of song development illuminates motor control mechanism in canaries. J Develop Neurobiol, 14:943–60. 3, 5, 38, 105
- [Alonso et al., 2009] Alonso, L. M., Alliende, J. A., Goller, F., and Mindlin, G. B. (2009). Low-dimensional dynamical model for the diversity of pressure patterns used in canary song. *Phys. Rev. E*, 79:041929. 3, 5, 38, 40, 41, 52, 105
- [Alonso and Andreani, 2013] Alonso, R. and Andreani, M. N. (2013). Mediciones electromiográficas del músculo vs en canarios. no publicado, Laboratorio de Sistemas Dinámicos, Dto de Física, Universidad de Buenos Aires. 18
- [Amador et al., 2008] Amador, A., Goller, F., and Mindlin, G. B. (2008). Frequency modulation during song in a suboscine does not require vocal muscles. J. Neurophysiol, 99:2383–2389. 25, 27

- [Amador and Margoliash, 2013] Amador, A. and Margoliash, D. (2013). A mechanism for frequency modulation in songbirds shared with humans. *The Journal of Neuroscience*, 33(27):11136–11144. 18, 28
- [Amador et al., 2013] Amador, A., Perl, Y. S., Mindlin, G. B., and Margoliash, D. (2013). Elemental gestures dynamics are encoded by song premotor cortical neurons. *Nature*. 3, 18, 24, 30, 43, 48, 57, 116, 121
- [Andalman et al., 2011] Andalman, A. S., Foerster, J. N., and Fee, M. S. (2011). Control of vocal and respiratory patterns in birdsong: Dissection of forebrain and brainstem mechanisms using temperature. *PloS one*, 6:e25461. 6, 70, 76, 120, 121
- [Arneodo et al., 2012] Arneodo, E., Perl, Y., F, F. G., and GB, G. M. (2012). Prosthetic avian vocal organ controlled by a freely behaving bird based on a low dimensional model of the biomechanical periphery. *PLoS Comput Biol*, 8(6):e1002546. 3, 28
- [Ashmore, 2008] Ashmore (2008). Bottom-up activation of the vocal motor forebrain by the respiratory brainstem. The Journal of Neuroscience, 28(10):2613-2623. 43, 120, 122
- [Ashmore et al., 2005] Ashmore, R. C., Wild, J. M., and Schmidt, M. F. (2005). Brainstem and forebrain contributions to the generation of learned motor behaviors for song. *Jorunal of Neuroscience*, 25:37. 54, 120
- [Berg and Kleinfeld, 2003] Berg, R. W. and Kleinfeld, D. (2003). Vibrissa movement elicited by rhythmic electrical microstimulation to motor cortex in the aroused rat mimics exploratory whisking. *J Neurophysiol*, 90:2950– 2963. 4
- [Boersma and Weenink, 2013] Boersma, P. and Weenink, D. (2013). Praat: doing phonetics by computer. [Computer program], Version 5.3.56:retrieved 15 September 2013 from http://www.praat.org/. 13

- [Bottjer et al., 1984] Bottjer, S., Miesner, E. A., and Arnold, P. A. (1984). Forebrain lesions disrupt development but not maintenance of song in passerine bird. *Science*, 224:901–903. 45
- [Brainard and Doupe, 2002] Brainard, M. and Doupe, A. (2002). What birdsong teaches us about learning? *Nature*, 417:351–358. 45
- [Calder, 1970] Calder, W. A. (1970). Respiration during song in the canary (serinus canaria). Comp. Biochem. Physiol., 32:251–258. 35
- [Catchpole and Slater, 1995] Catchpole, C. K. and Slater, P. J. B. (1995). Neuroscience of birdsong. Cambridge Univ Pr. 2
- [Chi and Margoliash, 2001] Chi, Z. and Margoliash, D. (2001). emporal precision and temporal drift in brain and behavior of zebra finch song. *Neuron*, 32:899–910. 46
- [Cramer and Keller, 2006] Cramer, N. and Keller, A. (2006). Cortical control of whisking central pattern generator. J Neurophysiol, 96:209 –217. 4
- [Doupe and Kuhl, 1999] Doupe, A. and Kuhl, O. (1999). Birdsong and human speech: common themes and mechanisms. Annual Review of Neuroscience, 22:567–631. 1
- [Fee, 2002] Fee, M. S. (2002). Measurement of the linear and nonlinear mechanical properties of the oscine syrinx: implication for function. J. Comp. Physiol. A, 188:829–839. 15
- [Fee et al., 2004] Fee, M. S., Kozhevnikov, A. A., and Hahnloser, R. H. (2004). Neural mechanisms of vocal sequence generation in the songbird. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1016:153–170. 4, 6, 43, 45, 46, 116, 120, 121, 122
- [Friedman et al., 2006] Friedman, W. A., Jones, L. M., Cramer, N. P., Kwegyir-Afful, E. E., Zeigler, H. P., and Keller, A. (2006). Anticipatory activity of motor cortex in relation to rhythmic whisking. *J Neurophysiol*, 95:1274–1277. 4
- [Friedman et al., 2011] Friedman, W. A., Zeigler, H. P., and Keller, A. (2011). Vibrissae motor cortex unit activity during whisking. J Neurophysiol, 107:551–563. 5
- [Gardner et al., 2001] Gardner, T., Cecchi, G., Magnasco, M., Laje, R., and Mindlin, G. B. (2001). Simple motor gestures for birdsongs. *Phys. Rev. Lett.*, 87:208101. 3, 19, 20
- [Goldin et al., 2013] Goldin, M. A., Alonso, L. M., Alliende, J. A., Goller, F., and Mindlin, G. B. (2013). Temperature induced syllable breaking unveils nonlinearly interacting timescales in birdsong motor pathway. *PLoS ONE*, 8(6):e67814. 55, 62, 108, 113, 122
- [Goldin and Mindlin, 2013] Goldin, M. A. and Mindlin, G. B. (2013). Evidence and control of bifurcations in a respiratory system. *Chaos*, 23:043138. 108
- [Goller and Larsen, 1997] Goller, F. and Larsen, O. N. (1997). A new mechanism of sound generation in songbirds. Proc. Natl. Acad. Sci., 94:14787– 14791. 14
- [Goller and Suthers, 1996a] Goller, F. and Suthers, R. (1996a). Role of syringeal muscles in controlling the phonology of bird song. J Neurophysiol, 76:287–300. 14, 16, 21, 68, 121
- [Goller and Suthers, 1996b] Goller, F. and Suthers, R. (1996b). Role of syringeal muscles in in gating airflow and sound production in singing brown thrashers. J Neurophysiol, 75:867–876. 16, 17, 18
- [Guckenheimer and Holmes, 1997] Guckenheimer, J. and Holmes, P. (1997). Nonlinear oscillations, dynamical systems, and bifurcations of vector fields. Springer-Verlag. 50, 52, 100, 101
- [Hahnloser et al., 2002] Hahnloser, R. H. R., Kozhevnikov, A. A., and Fee, M. S. (2002). An ultra-sparse code underlies the generation of neural sequences in a songbird. *Nature*, 419:65–70. 4, 6, 45, 46, 47, 56, 121

- [Hartley and Suthers, 1989] Hartley, R. S. and Suthers, R. A. (1989). Airflow and pressure during canary song: evidence for mini-breaths. J. Comp. Physiol., 165:15–26. 34
- [Hildebrand, 1995] Hildebrand, M. (1995). Analysis of Vertebrate Structure. Wiley, New York. 34
- [Hoppensteadt and Izhikevich, 1997] Hoppensteadt, F. and Izhikevich, E. M. (1997). Weakly connected neural networks. Springer-Verlag, New York. 42
- [Kakei et al., 1999] Kakei, S., Hoffman, D. S., and Strick, P. L. (1999). Muscle and movement representations in the primary motor cortex. *Science*, 285:2136–2139. 4
- [Kraftmakher, 2005] Kraftmakher, Y. (2005). Simple experiments with a thermoelectric module. *Eur. J. Phys.*, 26(6):959. 62
- [Laje et al., 2002] Laje, R., Gardner, T. J., and Mindlin, G. B. (2002). Neuromuscular control of vocalizations in birdsong: a model. *Phys. Rev. E*, 65:051921. 21, 22, 23
- [Larsen and Goller, 2002] Larsen, O. N. and Goller, F. (2002). Direct observation of syringeal muscle function in songbirds and a parrot. J. Exp. Biol., 205. 15, 19
- [Long and Fee, 2008] Long, M. A. and Fee, M. S. (2008). Using temperature to analyse temporal dynamics in the songbird motor pathway. *Nature*, 456:189–194. 4, 6, 48, 49, 56, 62, 70, 76, 113, 120, 121, 122
- [Méndez et al., 2012] Méndez, J., Mindlin, G., and Goller, F. (2012). Interaction between telencephalic signals and respiratory dynamics in songbirds. J. Neurophysiol., 107(11):2971–2983. 5, 122
- [Mindlin et al., 2003] Mindlin, G. B., Gardner, T. J., Goller, F., and Suthers, R. (2003). Experimental support for a model of birdsong production. *Phys. Rev. E*, 68:041908. 3, 27, 28, 29

- [Mindlin and Laje, 2005] Mindlin, G. B. and Laje, R. (2005). The Physics of Birdsong. Springer, New York. 2, 110, 121
- [Nottebohm, 1976] Nottebohm, F. (1976). Phonation in the orange-winged amazon parrot amazona amazonica. J. Comp. Physiol., 108:157–170. 4, 43
- [Perl et al., 2011] Perl, Y. S., Arneodo, E. M., Amador, A., Goller, F., and Mindlin, G. B. (2011). Reconstruction of physiological instructions from zebra finch song. *Phys. Rev. E*, 84:051909. 3, 24, 30
- [Poole et al., 2005] Poole, J., Tyack, P., Stoeger-Horwath, A., and Watwood, S. (2005). Animal behaviour: Elephants are capable of vocal learning. *Nature*, 434:455–455. 1
- [Prather et al., 2008] Prather, J., Peters, S., Nowicki, S., and Mooney, R. (2008). Precise auditory-vocal mirroring in neurons for learned vocal communication. *Nature*, 451:305–310. 50
- [R.A.Suthers et al., 1999] R.A.Suthers, Goller, F., and Pytte, C. (1999). The neuromuscular control of birdsong. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 354:927–39. 16
- [Riede et al., 2006] Riede, T., Suthers, R. A., Fletcher, N. H., and Blevins, W. E. (2006). Songbirds tune their vocal tract to the fundamental frequency of their song. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(14):5543–5548. 23
- [Scharff and Nottebohm, 1991] Scharff, C. and Nottebohm, F. A. (1991). A comparative study of the behavioural deficits following lesions in various part of the zebra finch song system: implications for vocal learning. J. Neurosci., 11:2896–2913. 45
- [Schmidt and Ashmore, 2008] Schmidt, M. and Ashmore, R. (2008). Integrating breathing and singing: forebrain and brainstem mechanisms, in: Zeigler and marler, eds. neuroscience of birdsong. In: Zeigler and Marler, eds. Neuroscience of Birdsong (Cambridge Univ. Press), pages 115–135. 57, 58, 120

- [Schmidt et al., 2011] Schmidt, M., McLean, J., and Goller, F. (2011). Breathing and vocal control: The respiratory system as both a driver and target of telencephalic vocal motor circuits in songbirds. *Exp Physiol.*, in press. 122
- [Schmidt et al., 2004] Schmidt, M. F., Ashmore, R. C., and Vu, E. T. (2004). Bilateral control and interhemispheric coordination in the avian song motor system. Ann. N Y Ac. of Sc., 1016:171–186. 120
- [Sitt et al., 2008] Sitt, J. D., Amador, A., Goller, F., , and Mindlin, G. B. (2008). Dynamical origin of spectrally rich vocalizations in birdsong. *Phys. Rev. E*, 78:011905. 3, 18, 26
- [Sitt et al., 2010] Sitt, J. D., Arneodo, E. M., Goller, F., and Mindlin, G. B. (2010). Physiologically driven avian vocal synthesizer. *Phys. Rev. E*, 81:031927. 3, 28, 29
- [Smotherman et al., 2006] Smotherman, M., Kobayasi, K., Ma, J., Zhang, S., and Metzner, W. (2006). A mechanism for vocal-respiratory coupling in the mammalian parabrachial nucleus. J Neurosci, 26:4860–4869. 4
- [Spiro et al., 1999] Spiro, J. E., Dalva, M. B., and Mooney, R. (1999). Longrange inhibition within the zebra finch song nucleus ra can coordinate the firing of multiple projection neurons. J. Neurophysiol., 81:3007–3020. 44
- [Strogatz, 2001] Strogatz, S. (2001). Nonlinear dynamics and chaos: with applications to physics, biology, chemistry, and engineering (studies in nonlinearity). Westview Press, Boulder. 5
- [Suthers, 2001] Suthers, R. A. (2001). Peripheral vocal mechanisms in birds: are songbirds special? *Netherlands J. Zool.*, 51:217–242. 18
- [Suthers and Margoliash, 2002] Suthers, R. A. and Margoliash, D. (2002). Motor control of birdsong. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 12:684–690. 45
- [Suthers et al., 2004] Suthers, R. A., Vallet, E., Tanvez, A., and Kreutzer, M. (2004). Bilateral song production in domestic canaries. *Developmental Neurobiology*, 60:3. 35

- [Titze, 1998] Titze, I. R. (1998). The physics of small-amplitude oscillation of the vocal folds. J. Acoust. Soc. Am., 83:1536–1550. 19, 20
- [Trevisan and Mindlin, 2007] Trevisan, M. and Mindlin, G. (2007). The constraints to learning in birdsong. *Eur Phys Journal*, 146:199–204. 121
- [Trevisan et al., 2006] Trevisan, M. A., Mindlin, G. B., and Goller, F. (2006). Nonlinear model predicts diverse respiratory patterns of birdsong. *Phys. Rev. Lett.*, 96:058103. 3, 5, 54, 120
- [van der Pol and van der Mark, 1927] van der Pol, B. and van der Mark, J. (1927). Frequency demultiplication. Nature, 120:363–364. 5
- [Vicario, 1991] Vicario, D. (1991). Contributions of syringeal muscles to respiration and vocalization in the zebra finch. J. Neurobiol., 22:63–73. 18, 27
- [Williams, 2004] Williams, H. (2004). Birdsong and singing behavior. Annals of the NY Acad. of Science, 1016:1–30. 1
- [Yu and Margoliash, 1996] Yu, A. C. and Margoliash, D. (1996). Temporal hierarchical control of singing in birds. *Science*, 273:1871–1875. 4, 30, 43, 45
- [Zeigler and Marler, 2008] Zeigler, H. and Marler, P. (2008). Neuroscience of birdsong. Cambridge Univ Pr. 2, 4, 121
- [Zollinger and Suthers, 2004] Zollinger, S. A. and Suthers, R. A. (2004). Motor mechanisms of a vocal mimic: implications for birdsong production. *Proc. R. Soc. London B*, 271:483–491. 36